



HAL
open science

Hypercoagulabilité associée aux anticorps anti-phospholipides : approches descriptives et mécanistiques

Aurélie Membre

► **To cite this version:**

Aurélie Membre. Hypercoagulabilité associée aux anticorps anti-phospholipides : approches descriptives et mécanistiques. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10125 . tel-01748518

HAL Id: tel-01748518

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748518>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**Université Henri Poincaré – Nancy 1
Faculté de médecine de Nancy**

Ecole Doctorale Biologie Santé Environnement

THESE

**Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'université Henri Poincaré, Nancy 1
Spécialité Biologie Cellulaire**

par

Aurélie MEMBRE

**Hypercoagulabilité associée aux anticorps anti-phospholipides :
approches descriptives et mécanistiques.**

Soutenue publiquement le 27 février 2008

Directeur de thèse : Véronique REGNAULT

Membres du Jury :

Président :

Dr Martine JANDROT-PERRUS (Paris)

Rapporteurs :

Pr Delphine BORGEL (Paris)

Pr Philippe DE MOERLOOSE (Genève)

Examineurs :

Dr Marc TROSSAËRT (Nantes)

Dr Véronique REGNAULT (Nancy)

Pr Thomas LECOMPTE (Nancy)

Je remercie le Professeur Thomas Lecompte, Directeur de l'unité Inserm U734 pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour son intérêt, son implication dans mon travail ainsi que pour ses conseils durant ces quatre années. Soyez assuré de mon profond respect.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse le Docteur Véronique Regnault. Je lui exprime toute ma gratitude pour avoir dirigé mon travail, m'avoir fait bénéficier de ses conseils, de sa grande curiosité et rigueur scientifique ainsi que pour son implication et son suivi de mon travail. Ces quatre années ont été jalonnées de bons et de moins bons moments qui m'ont permis d'évoluer et d'en arriver là où j'en suis. En espérant avoir été à la hauteur de vos attentes.

Que Mme le Professeur Delphine Borgel et Mr le Professeur Philippe de Moerloose trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Un grand merci au Docteur Martine Jandrot-Perrus et au Docteur Marc Trossaërt. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assurés de tout mon respect.

Je tiens également à remercier le Professeur Denis Wahl pour son intérêt et son implication dans mon travail. Un grand merci pour vos conseils et pour votre grande disponibilité. Soyez assuré de toute ma reconnaissance.

A Jean-Pierre Max, Ingénieur de Recherche Inserm, à qui je voudrais tout d'abord dire un grand merci pour toutes les expériences de résonance plasmonique de surface. Vous avez contribué en grande partie à mon travail de thèse.

Je tiens également à vous exprimer toute ma reconnaissance pour votre grande disponibilité, pour les résolutions de problèmes informatiques et j'en passe.... Merci pour toutes les heures passées à relire, les articles, résumés, rapports ainsi que la thèse. Enfin, merci pour vos coups de poing sur la table qui mettaient de la vie dans le laboratoire ...

Merci à Agnès, Rose et Nicolas, mes voisins de bureau pour leur soutien et leur conseil durant ma thèse. Merci également à Faten Soussi, Maître de Conférence et à Sanjiv Sonkaria pour leurs conseils.

Merci au Professeur Jean-Pierre Villemot, Directeur de l'école de chirurgie, ainsi qu'au Professeur Jean-Pierre Carteaux pour leur accueil dans leur laboratoire.

Merci également aux membres de l'équipe INSERM U684 dirigé par le Dr Patrick Lacolley qui m'ont toujours accueillie avec un grand sourire. Un merci tout particulier au Dr Patrick Lacolley pour son intérêt dans mon travail ainsi que pour ses conseils.

Recevez Professeur Simon Thornton tous mes remerciements pour le temps passé à corriger mes multiples versions de publication et de résumés en anglais. Merci pour votre disponibilité et votre bonne humeur.

Merci à Luc Marchal pour sa gentillesse, son accueil et son implication pour les expériences de microscopie électronique. Soyez assuré de mon plus profond respect.

Merci à Véronique Latger-Canard pour sa disponibilité concernant la cytométrie en flux.

Je tiens à remercier le Professeur S. Krilis (Australie) et le Docteur J. Arnout (Belgique) pour nous avoir donné leurs anticorps monoclonaux murins qui sont la base de ce travail.

Merci à Brigitte, Ghislaine et Monique pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur écoute lors des moments de doute.

Je tiens à remercier aussi tous les volontaires qui ont participé aux différents protocoles en me donnant de leur sang. Sans vous il n'y aurait pas eu d'expériences.

J'ai une pensée également pour Yveline toujours prête à faire les prélèvements, pour sa bonne humeur et sa gentillesse.

Merci également aux techniciennes du laboratoire d'hématologie du CHU de Nancy qui m'ont toujours accueillie avec un grand sourire.

Merci à la région Lorraine et à l'Inserm ainsi qu'à la société Novo-nordisk et au LFB pour leur soutien financier. Merci également au Conseil Scientifique de la Faculté de Médecine de Nancy pour l'attribution du Prix Wittner.

Je ne dirais pas que c'est la page la plus dure à écrire mais elle n'est pas si facile à faire. La difficulté de la page des remerciements tient dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je tiens à remercier par avance ceux dont le nom n'apparaît pas et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Ils se reconnaîtront.

Merci à Aude, Roselyne, Juliette, Nicolas et Nguyen (l'équipe de Chir ex) pour m'avoir supportée et m'avoir apporté leur soutien. Merci pour l'accueil chaleureux que vous m'avez fait lors de mon arrivée. Une petite dédicace pour les repas du lundi et tous les autres qui m'ont fait voyager dans beaucoup de pays du monde et qui j'en suis sûre vont me manquer.

Petite dédicace à Aude, Agnès et Fred pour les pauses repas du midi. Nous avons passé de bons moments. Aude, change rien t'es géniale !!!! Agnès, bon courage pour la fin de ta thèse et beaucoup de bonheur dans ta vie personnelle.

Un grand Merci tout particulier à ma petite Fred, pour ton amitié, ton dynamisme, ta bonne humeur et ton soutien tout au long de ma thèse. J'ai adoré les séances photos avec Emma, j'espère que j'en recevrai des tonnes par mail pour la voir grandir. Tu vas beaucoup me manquer.

Une petite pensée aussi pour Marion qui n'était pas souvent là mais qui se rattrapait lors de ses venues. Merci pour ton mimi bonhomme, il m'a porté chance... Grâce à toi je ne verrai plus jamais les « pinpin » de la même manière...

Petit mot pour toi Romain, je ne te remercie pas pour tes messages quotidiens et différés sur msn qui me donnaient de la motivation pour rédiger !!! Je ne te remercie pas non plus de préférer les Etats-Unis plutôt que de venir m'écouter et faire la fête pour ma soutenance !!! J'aurais bien changé la date mais ce ne fut pas possible !!!!!

Merci à tous mes amis, que je ne citerai pas de peur d'en oublier et de m'en mordre les doigts. Merci d'avoir été là pour me changer les idées dans les moments de déprime et de galère !!!! Vous avez été une bouffée d'oxygène!!!! Merci pour vos délires, pour les soirées de fêtes mémorables mais aussi les longues discussions sur la vie.

Un merci tout particulier à Claire qui a toujours été là pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies. Tu auras toujours pour moi une grande place dans mon cœur. Trouve en ces mots la reconnaissance de mon amitié et une dédicace pour toutes ces années.

Merci à toute ma famille,

Merci à mes grands-parents qui me suivent et m'encouragent depuis que je suis toute petite.

Un très grand Merci en particulier à mes parents pour leur amour et leur soutien depuis un certain dimanche d'octobre. Vous m'avez encouragée soutenue et portée dans toutes mes décisions. Vous avez toujours cru en moi, même dans les moments difficiles, et je vous en remercie. Cette thèse est un peu la votre, elle représente pour moi la reconnaissance de votre éducation car c'est grâce à vous si j'en suis là.

Merci à Amandine ma petite sœur, qui a toujours été là, dans les bons comme dans les mauvais moments, pour partager les joies mais aussi pour m'aider à remonter la pente tant

sur le plan personnel que professionnel. Merci pour le temps passé à m'écouter répéter mes présentations, la thèse sera la plus longue mais peut être pas la dernière !!

Merci à Régis, qui fait pour moi partie de la famille, pour ta présence, tes délires et pour m'avoir montré que la pétanque est un sport !!! *Viva la salsa !!!!!*

Merci à Jacqueline et Jean-Marie Gaude pour leur soutien et leur encouragement au long de la thèse.

Merci à François, Nico et Sophie pour les moments passés à Paris, Amsterdam et à Lille et qui m'ont permis de déconnecter de Nancy et de la thèse.

Enfin merci à Luc, d'être lui, d'être avec moi, et de me laisser mon indépendance et ma liberté.

SOMMAIRE

1	CONTEXTE DU SUJET	1
2	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	2
2.1	LES PLAQUETTES	2
2.1.1	<i>Structure et fonction</i>	3
2.1.1.1	La zone périphérique	3
2.1.1.2	La zone cytoplasmique	7
2.1.1.3	La zone des organelles	7
2.1.2	<i>L'activation plaquettaire</i>	9
2.1.2.1	Adhérence et changement de forme	10
2.1.2.2	Agrégation	12
2.1.2.3	Sécrétion	14
2.1.2.4	Microvésiculation	16
2.1.3	<i>Les inhibiteurs plaquettares</i>	17
2.1.3.1	Les inhibiteurs de l'activation plaquettaire	17
2.1.3.2	Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire	18
2.1.4	<i>Les récepteurs FcγR</i>	19
2.1.4.1	Les récepteurs Fc γ RI	19
2.1.4.2	Les récepteurs Fc γ RII	19
2.1.4.3	Les récepteurs Fc γ RIII	20
2.1.4.4	Anticorps activateurs plaquettares par un mécanisme Fc γ RII-dépendant... ..	20
2.1.5	<i>Activation plaquettaire dans le cadre de pathologies d'origine immunologique</i> 21	
2.1.5.1	Pathologies impliquant des auto-anticorps	21
2.1.5.2	Mise en évidence des auto-anticorps activateurs plaquettares	22
2.1.5.3	Mécanisme d'action des auto-anticorps	22
2.2	LE SYSTEME DE LA COAGULATION	23
2.2.1	<i>Les protéines de la coagulation</i>	23
2.2.1.1	Les facteurs de la coagulation	24
2.2.1.2	Les inhibiteurs de la coagulation	26
2.2.2	<i>Les différentes étapes de la coagulation</i>	27
2.2.2.1	Initiation	27
2.2.2.2	Amplification et propagation du système	28
2.2.2.3	Régulation	30
2.2.3	<i>Méthode d'évaluation intégrative de la coagulation : la thrombinographie</i>	38
2.2.3.1	Principe	38
2.2.3.2	Cohérence phénotype biologique et clinique	43
2.3	LES ANTICORPS ANTI-PHOSPHOLIPIDES	44
2.3.1	<i>Définition</i>	44
2.3.2	<i>Les cibles</i>	47
2.3.2.1	La β_2 -glycoprotéine I	47
2.3.2.2	La prothrombine	51
2.3.3	<i>Les anticorps détectés par méthode ELISA : aCL</i>	52
2.3.3.1	Les anticorps anti-cardiolipide	53
2.3.3.2	Les anticorps anti- β_2 GPI	53
2.3.3.3	Les anticorps détectés par les tests de coagulation	54
2.3.4	<i>Les mécanismes d'action des anticorps</i>	56
2.3.4.1	Interférence entre les aPL et les systèmes pro- et anticoagulants au niveau des surfaces phospholipidiques	59
2.3.4.2	Mécanisme d'activation cellulaire par les complexes anticorps/antigène... ..	61

3	OBJECTIF DE LA THESE	65
4	MATERIELS ET METHODES	69
4.1	LES ANTICORPS	69
4.1.1	<i>Les anticorps monoclonaux murins.....</i>	69
4.1.1.1	Caractéristiques des AcMm	69
4.1.1.2	Production en ascites	70
4.1.2	<i>Obtention des AcMm et auto-anticorps humains</i>	70
4.1.2.1	Purification des anticorps	70
4.1.2.2	Dosage des anticorps	70
4.1.2.3	Pureté.....	71
4.2	OBTENTION DE LA β_2 -GLYCOPROTEINE I	72
4.2.1	<i>Purification de la β_2-glycoprotéine I</i>	72
4.2.2	<i>Mesure de l'activité cofacteur de la β_2-glycoprotéine I.....</i>	73
4.2.3	<i>Dosage de la β_2-glycoprotéine I.....</i>	73
4.3	PREPARATION DE PLAQUETTES LAVÉES HUMAINES	73
4.3.1	<i>Plaquettes lavées humaines pour l'étude d'une activation plaquettaire</i>	73
4.3.2	<i>Plaquettes lavées humaines pour la préparation de microvésicules plaquettaires.....</i>	74
4.4	PREPARATION DE SURFACES PHOSPHOLIPIDIQUES	74
4.4.1	<i>Préparation de vésicules phospholipidiques moléculairement définies (VP)..</i>	74
4.4.2	<i>Préparation de microvésicules plaquettaires.....</i>	75
4.5	AGREGATION PLAQUETTAIRE	75
4.6	MESURE DE LA SECRETION DES GRANULES ALPHA PLAQUETTAIRES ET DE LA SYNTHÈSE DU THROMBOXANE B ₂	75
4.6.1	<i>Dosage du facteur plaquettaire 4.....</i>	76
4.6.2	<i>Dosage du thromboxane B₂.....</i>	76
4.7	MESURE DE L'ACTIVITE PROCOAGULANTE DES PHOSPHOLIPIDES	77
4.7.1	<i>Principe du test.....</i>	77
4.7.2	<i>Détection d'une activation plaquettaire induite par les AcMm ou des auto- anticorps humains</i>	78
4.7.2.1	Patients	78
4.7.2.2	Détection d'une activation plaquettaire anticorps-dépendante	78
4.8	LA THROMBINOGRAPHIE	79
4.8.1	<i>Donneurs et patients.....</i>	79
4.8.2	<i>Préparation des spécimens plasmatiques</i>	80
4.8.2.1	Plasma riche en plaquettes = PRP	80
4.8.2.2	Plasma riche en plaquettes congelé/décongelé = PRPcd	80
4.8.2.3	Plasma pauvre en plaquettes en présence de microvésicules plaquettaires = PPP/MVP collagène	81
4.8.2.4	Plasma pauvre en plaquettes centrifugé à 13000 g = PPP 13000 g.....	81
4.8.2.5	Dosage du facteur tissulaire utilisé en thrombinographie	83
4.8.3	<i>Conditions de réalisation du test.....</i>	83
4.9	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.....	86
4.9.1	<i>Préparation des échantillons</i>	86
4.9.1.1	Spécimens plasmatiques.....	86
4.9.1.2	Plaquettes lavées et microvésicules plaquettaires	86
4.9.2	<i>Fixation des échantillons</i>	86
4.9.3	<i>Microscopie électronique à balayage</i>	86

4.10	IMPACT DE LA COMPOSITION EN SURFACES PHOSPHOLIPIDIQUES SUR LES REACTIONS PRO- ET ANTICOAGULANTES	87
4.10.1	<i>Mesure de la génération de thrombine</i>	87
4.10.2	<i>Mesure d'inactivation du FVa par la PCa.....</i>	87
4.11	LA RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE.....	88
4.11.1	<i>Instrumentation</i>	88
4.11.2	<i>Détermination de constantes cinétiques.....</i>	88
4.11.3	<i>Interaction des AcMm, de leur antigène et des complexes AcMm/Antigène avec des surfaces physiologiques</i>	89
4.11.4	<i>Interaction de facteurs de la coagulation avec des surfaces phospholipidiques</i> 90	
4.11.5	<i>Réalisation d'une carte épitopique</i>	90
4.11.5.1	1 ^{ère} méthode.....	90
4.11.5.2	2 ^{ème} méthode.....	91
4.12	ANALYSE EN CYTOMETRIE EN FLUX	91
5	RESULTATS.....	93
5.1	METHODOLOGIE DE L'ETUDE	93
5.1.1	<i>Quantification du facteur tissulaire utilisé en thrombinographie.....</i>	93
5.1.2	<i>Les spécimens plasmatiques étudiés en thrombinographie.....</i>	93
5.1.3	<i>Etude du système de la protéine C en thrombinographie</i>	94
5.1.3.1	Protéine C activée.....	94
5.1.3.2	Thrombomoduline	95
5.1.4	<i>Microscopie électronique.....</i>	96
5.1.5	<i>Quantification de la quantité de phospholipides procoagulants présents dans différents spécimens plasmatiques</i>	97
5.1.5.1	Influence de la préparation du PPP 13000 g sur la quantité de phospholipides procoagulants apportés.....	97
5.1.5.2	Comparaison de la quantité de phospholipides procoagulants apportés par les différents spécimens plasmatiques.....	99
5.1.5.3	Comparaison de l'effet et de la concentration de différentes surfaces phospholipidiques sur l'activité de la thrombine	99
5.1.6	<i>Détermination en thrombinographie d'une activation plaquettaire immunologique.....</i>	103
5.1.6.1	Effet d'un anticorps activateur plaquettaire sur différents spécimens plasmatiques	103
5.1.6.2	Activation plaquettaire et polymorphisme FcγRIIIa	104
5.1.6.3	Effet d'une activation plaquettaire sur la sensibilité à la PCa.....	105
5.2	ETUDE DE L'HYPERCOAGULABILITE ASSOCIEE AUX APL.....	106
5.2.1	<i>Comparaison de l'effet d'auto-anticorps humains et d'anticorps monoclonaux murins sur la génération et l'inhibition de la thrombine.....</i>	106
5.2.1.1	Effet des auto-anticorps humains en thrombinographie.....	106
5.2.1.2	Effet des AcMm en thrombinographie.....	108
5.2.2	<i>Les AcMm peuvent-ils induire une activation plaquettaire ?.....</i>	110
5.2.2.1	Caractérisation des plaquettes lavées	110
5.2.2.2	Capacité des AcMm, des antigènes et des complexes AcMm/antigène à se lier sur des plaquettes lavées humaines.....	111
5.2.2.3	Effet des AcMm sur l'activité procoagulante des phospholipides.....	112
5.2.2.4	Effet des AcMm sur la sécrétion plaquettaire	115

5.2.2.5	Comparaison de l'effet activateur plaquettaire des complexes AcMm/antigène avec des auto-anticorps humains	116
5.2.3	<i>Interférence des complexes AcMm-antigène avec la génération et l'inhibition de la thrombine.....</i>	<i>119</i>
5.2.3.1	Influence de l'interférence des AcMm en présence de leur antigène au niveau des surfaces phospholipidiques.....	119
5.2.3.2	Influence de l'activation plaquettaire sur le phénotype procoagulant induit par l'interférence des complexes AcMm/antigène.....	122
5.2.3.3	Influence de la concentration en 28F4 sur l'effet activateur plaquettaire ..	123
5.2.4	<i>Influence d'inhibiteurs plaquettaires sur l'action des AcMm.....</i>	<i>125</i>
5.2.4.1	Influence d'inhibiteurs plaquettaires sur l'activation des plaquettes en agrégation photométrique.....	126
5.2.4.2	Influence d'inhibiteurs plaquettaires en thrombinographie.....	126
5.3	ETUDE DE L'INFLUENCE DES SURFACES PHOSPHOLIPIDIQUES SUR LES REACTIONS PRO-ET ANTICOAGULANTES.	129
5.3.1	<i>Influence de la composition en phospholipides sur la génération et l'inhibition de la thrombine.....</i>	<i>129</i>
5.3.1.1	Influence de la composition en phospholipides sur l'activité de la thrombine générée	130
5.3.1.2	Influence de la composition en phospholipides sur le système de la PCa .	132
5.3.2	<i>Liaison de protéines de la coagulation en fonction des surfaces phospholipidiques.....</i>	<i>133</i>
5.3.2.1	Liaison de la prothrombine	134
5.3.2.2	Liaison de la PCa.....	135
5.3.2.3	Constantes cinétiques d'interaction du FII et de la PCa.....	137
5.3.3	<i>Génération de thrombine en fonction de la composition en phospholipides .</i>	<i>139</i>
5.3.4	<i>Inactivation du FVa par la PCa.....</i>	<i>140</i>
5.3.4.1	Effet de la protéine S sur l'inactivation du FVa par la PCa	140
5.3.4.2	Effet de la composition en surface phospholipidique sur l'inactivation du FVa par la PCa	142
5.4	CARACTERISATION EPITOPIQUE ET CINETIQUE DES ACMM	143
5.4.1	<i>Carte épitopique.....</i>	<i>143</i>
5.4.2	<i>Détermination des constantes cinétiques d'interaction des AcMm</i>	<i>147</i>
6	DISCUSSION	151
7	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	167
8	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	171
	RESUME.....	13

**ABREVIATIONS
ET
SYMBOLES**

α	alpha
δ	dense
λ	lysosomes
β_2 GPI	β_2 -glycoprotéine I
sd	écart type (standard error en anglais)
SEM	erreur à la moyenne (standard error of the mean en anglais)

ACD	acide citrate et dextrose
aCL	anticorps anticardiolipides
AcMm	anticorps monoclonaux murins
aPL	anticorps anti-phospholipide
APTT	thromboplastine partiellement activé
ASA	acide acétylsalicylique
BSA	bovine serum albumine
DAG	diacylglycérol
DRVVT	test de venin de vipère Russell dilué
EDC	N-éthyl-N'-(3-diéthylaminopropyl)carbodiimide
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPCR	récepteur endothélial de la protéine C
ETP	potentiel thrombinique
FII	prothrombine
FIIa	thrombine
FT	facteur tissulaire
Gla	acide- γ -carboxyglutamique
Gp	glycoprotéine
IP3	inositol-3-phosphate
IL8	interleukine 8
KCT	temps de coagulation avec kaolin
LA	lupus anticoagulant
LDL	low density lipoprotein
MVP	microvésicules plaquettaires
NHS	N-hydroxysuccimide
PC	Protéine C
PCa	protéine C activée
PCI	inhibiteur de la protéine C
PF4	facteur 4 plaquettaire
PhtdChol	phosphatidylcholine
PhtdSer	phosphatidylsérine
PhtdEth	phosphatidyléthanolamine
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PKC	protéine kinase C
PPA	activité procoagulante des phospholipides
PPP	plasma pauvre en plaquettes
PRP	plasma riche en plaquettes
PRPcd	plasma pauvre en plaquettes congelé/décongelé
PS	Protéine S
RU	unité de résonance
SAPL	syndrome des anti-phospholipides
SHBG	sex hormone binding protein

SPR	résonance plasmonique de surface
TCA	temps de céphaline activée
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TIH	thrombopénie induite par l'héparine
TLR	toll like receptors
TM	thrombomoduline
TQ	temps de quick
TSR	région sensible à la thrombine
TT	temps de thrombine
TX	thromboxane
TX A2	thromboxane A2
TX B2	thromboxane B2
VP	vésicules phospholipidiques :
vWF	facteur von Willebrand

1 CONTEXTE DU SUJET

Le syndrome des anticorps anti-phospholipides (SAPL) est une thrombophilie singulière de nature immunologique avec des déterminants multiples, constitutionnels et fondamentaux. Il est défini par l'association d'un évènement clinique thrombotique ou obstétrical avec la présence durable d'anticorps dits anti-phospholipides (aPL). Schématiquement, les aPL reconnaissent des protéines se liant aux phospholipides anioniques. Ce sont des anticoagulants circulants de type lupique qui prolongent les temps de coagulation et/ou des anticorps anti-cardiolipide détectés par des méthodes immunoenzymatiques. Paradoxalement, les aPL prolongent les temps de coagulation *in vitro* alors qu'ils prédisposent à la thrombose *in vivo*.

Plusieurs mécanismes pathogéniques ont été proposés pour expliquer l'effet prothrombotique de ces complexes anticorps/antigène dans le SAPL [1-3]. Le plus souvent ces mécanismes sont étudiés avec des auto-anticorps. Il est bien établi que les auto-anticorps humains sont hétérogènes quant à leur cible antigénique, leur concentration plasmatique et leurs caractéristiques d'interaction avec leur cible [4] et que vraisemblablement plusieurs sous-ensembles d'auto-anticorps présentant des spécificités hétérogènes coexistent chez certains malades [5]. Cette hétérogénéité rend difficile l'identification des phénomènes moléculaires impliqués et des anticorps pathogènes. Pour cette raison, nous avons utilisé, comme modèle d'étude, des anticorps monoclonaux murins (AcMm). Ces AcMm dirigés contre les cibles principales des aPL présentent des caractéristiques homogènes.

Les outils biochimiques actuels pour explorer la coagulation *in vitro* ne permettent qu'une approche fragmentaire. La thrombinographie [6, 7] consiste en l'enregistrement du travail de la thrombine au cours de la coagulation *in vitro* de plasma en présence de plaquettes, par fluorescence « in situ ». Plus de 90 % de la thrombine est formée après la gélification détectable du sang. Les systèmes inhibiteurs stoechiométriques (antithrombine) et dynamique (protéine C activée - PCa) agissent largement au-delà de la gélification détectable du sang. La thrombinographie permet donc une approche intégrative du système de la coagulation.

Dans le contexte du SAPL, nous avons été les premiers à mettre en évidence grâce à la thrombinographie, un phénotype hypercoagulable (résistance acquise à la PCa qui se traduit par un défaut de diminution de la quantité de travail enzymatique accompli par la thrombine ; par cet inhibiteur) malgré le retard à la coagulation [8]. De plus, l'étude d'une série de 40 patients aPL [9] nous a permis de confirmer que cette hypercoagulabilité (effet anticoagulant et diminution de la sensibilité à la PCa) était associée au risque thrombotique.

2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Les plaquettes

Les plaquettes (**Figure 1 A et B**) également appelées thrombocytes, sont des fragments anucléés de mégacaryocytes. Formées dans la moelle osseuse, elles sont ensuite libérées dans les sinusoides. A l'état normal 2/3 circulent dans le sang et 1/3 est stocké dans la rate. La numération plaquettaire normale d'un individu se situe entre 150 et 400 G/L.

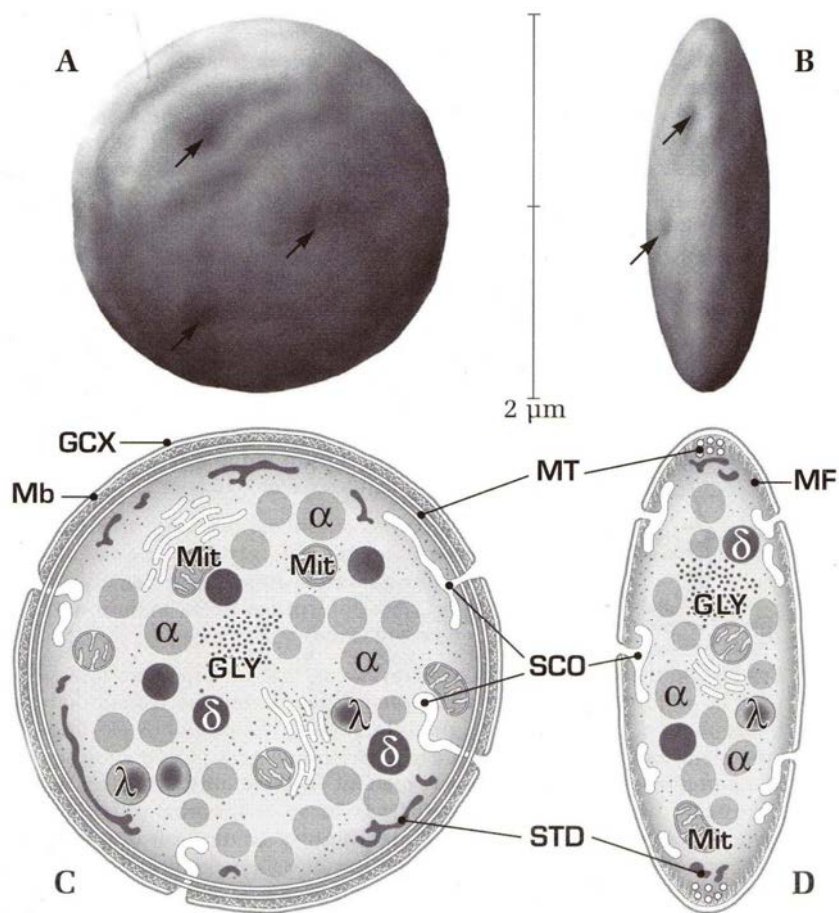


Figure 1 : Caractéristiques ultrastructurales d'une plaquette.

(A) et (B) plaquettes en microscopie électronique à balayage. Les flèches représentent des dépressions correspondant à l'émergence vers l'extérieur du système canaliculaire ouvert. (C) et (D) coupe équatoriale et longitudinale d'une plaquette : la zone périphérique est formée du glycocalix (GCX), de la membrane plasmique trilaminaire (Mb) et d'une zone sous membranaire riche en microfilaments (MF). Le cytoplasme de la plaquette contient des filaments d'actine, les microtubules (MT) et des grains de glycogène (GLY). Les organelles contenues dans le cytoplasme sont les mitochondries (Mit), les granules alpha (α), les granules denses (δ), et les lysosomes (λ). Les systèmes membranaires de la plaquette sont le système canaliculaire ouvert (SCO) relié à la surface et le système tubulaire dense (STD) [10].

Les plaquettes non activées circulent dans le sang sous la forme de disques d'environ 2 μm de diamètre et possèdent un volume moyen de 7 à 12 μm^3 . Lorsqu'elles sont activées, leur morphologie se modifie, elles deviennent sphériques et émettent des pseudopodes.

D'une durée de vie comprise entre 7 et 12 jours, les plaquettes sont ensuite éliminées par phagocytose grâce au système monocytaire macrophagique de la rate, du foie et de la moelle osseuse principalement.

2.1.1 Structure et fonction

Des études en microscopie électronique ont permis de diviser la plaquette en trois zones principales correspondant à des spécialisations fonctionnelles et biochimiques (**Figure 1 C et D**) : la zone périphérique, la zone cytoplasmique et la zone des organelles

2.1.1.1 La zone périphérique

□ La membrane plaquettaire

La membrane plasmique plaquettaire est une bicouche phospholipidique classique dans laquelle se trouvent des glycoprotéines (**Figure 2**).

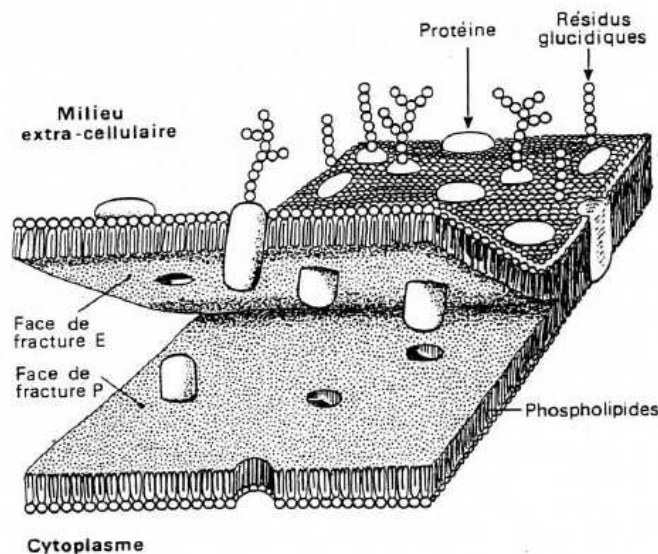


Figure 2 : Schéma de la membrane plaquettaire.
(double couche phospholipidique et glycoprotéines).

La membrane plaquettaire contient plusieurs variétés de lipides : les lipides neutres et les phospholipides. Concernant les lipides neutres, elle contient 90% de cholestérol libre, quelques traces de cholestérol estérifié ainsi que des acides gras libres, des triglycérides et des diglycérides. La composition en phospholipides de la membranaire plaquettaire, présentée **Tableau I**, a été largement étudiée [11-14].

phospholipide	Bevers <i>et al</i> [11]	Perret <i>et al</i> [12]	Skeaff <i>et al</i> [13]	Marcus <i>et al</i> [14]
phosphatidylsérine	10,9 ± 0,7	9,9 ± 0,2	9-10	9,9 ± 1,0
phosphatidylcholine	38,3 ± 1,4	35,0 ± 1,7	36-39	
phosphatidyléthanolamine	26,8 ± 0,8	26,1 ± 1,4	28-30	27,2 ± 0,6
sphingomyéline	19,0 ± 1,4	23,4 ± 0,7	19-24	16,9 ± 0,6
phosphatidylinositol		5,6 ± 0,6	2-4	6,1 ± 0,6

Tableau I : Composition en phospholipides de la membrane plaquettaire.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de phospholipides totaux (moyenne ± écart type).

La membrane plaquettaire est constituée d'un feuillet externe et d'un feuillet interne où les phospholipides sont distribués asymétriquement [11, 12]. Les phospholipides neutres principalement la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont localisés au niveau de la membrane externe tandis que les phospholipides anioniques (phosphatidylsérine et phosphatidylinositol) sont situés dans le feuillet interne (**Figure 3**). Néanmoins, de la phosphatidylsérine ainsi que de la phosphatidyléthanolamine sont détectés dans le feuillet externe [15].

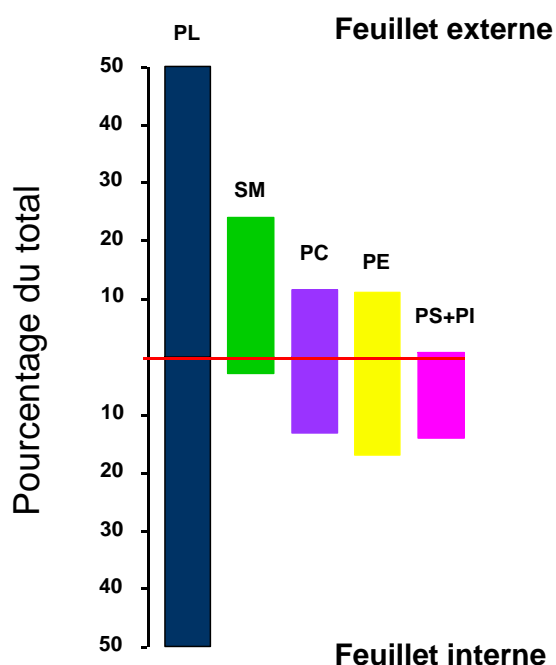


Figure 3 : Répartition asymétrique des phospholipides au niveau de la membrane plaquettaire.

PL = phospholipides totaux, SM = sphingomyéline, PC = phosphatidylcholine, PE = phosphatidyléthanolamine, PS = phosphatidylsérine, PI = phosphatidylinositol.

Ligne rouge : délimitation feuillet interne/externe.

Cette organisation asymétrique est maintenue grâce à des enzymes agissant en coopération de manière synchrone [16, 17]. Deux protéines assurant le transport des phospholipides maintiennent l'équilibre de cette asymétrie au niveau de la membrane plaquettaire. Une aminophospholipide translocase (flippase) spécifique pour la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine induit un flux net de la face externe vers la face interne de ces phospholipides par un mécanisme nécessitant de l'ATP mais inhibé par le calcium. Une deuxième enzyme, la floppase induit un transport de phosphatidylcholine et d'aminophospholipides de la face interne vers la face externe des plaquettes. Ce phénomène est calcium dépendant et nécessite également la présence de molécules d'ATP. Une action concertée de la flippase et de la floppase permet de maintenir l'asymétrie dans les cellules au repos [16, 18]. Lors de l'activation des plaquettes la concentration en calcium cytosolique augmente. La flippase est inhibée et une troisième enzyme est activée, la scramblase, induisant une perte de l'asymétrie des phospholipides. Les phospholipides anioniques se retrouvent dans le feuillet externe par un mécanisme de « flip-flop » [19]. La scramblase, qui ne nécessite pas d'ATP, assure un transport bidirectionnel et aspécifique des phospholipides entre les deux feuillets de la membrane. La quantité d'exposition des phospholipides anioniques au niveau de la membrane externe est variable et dépend de l'intensité de l'activation comme le montre une étude réalisée en présence de différents agonistes par Bevers *et al* [11] (**Tableau II**).

AGONISTE	Phosphatidyl-sérine	Phosphatidyl-choline	Phosphatidyl-éthanolamine	sphingomyéline
Contrôle	0,5 ± 0,5	6,5 ± 1,5	2,0 ± 0,9	12,0 ± 1,5
Thrombine (2-20 nM)	1,6 ± 1,0	12,9 ± 4,6	5,1 ± 3,1	13,2 ± 3,8
Collagène (10 µg/ml)	2,1 ± 2,0	14,4 ± 4,3	5,9 ± 3,9	12,4 ± 0,6
Thrombine + collagène	5,0 ± 0,3	15,1 ± 1,6	16,0 ± 0,9	8,3 ± 1,5
Diamide (5 mM)	5,3 ± 0,4	15,5 ± 0,5	10,3 ± 0,1	8,6 ± 0,2
A23187 (1 µM)	8,2 ± 0,7	19,2 ± 1,5	23,3 ± 0,8	14,3 ± 0,6

Tableau II : Composition en phospholipides exposés à la surface de la membrane plaquettaire lors de l'activation de plaquettes lavées par différents agonistes.
Les résultats sont exprimés en pourcentage du contenu total' (moyenne ± écart type) [11].

Comparées aux plaquettes contrôles, les plaquettes activées par les agonistes physiologiques (thrombine et collagène) se caractérisent par une augmentation de l'exposition des différents phospholipides sauf de la sphingomyéline. La phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine sont augmentées de façon plus importante quand les plaquettes sont activées par un mélange de collagène + thrombine, ou par des agonistes non physiologiques (diamide et ionophore calcique comme le A23187).

En dehors des phospholipides, la membrane plaquettaire contient également des glycoprotéines (Gp) qui sont attachées ou ancrées dans la membrane (un à sept domaines transmembranaires hydrophobes). La partie glucidique de ces protéines est orientée vers l'extérieur et interagit avec le contenu plasmatique. Leur repartition, comme celle des phospholipides membranaires, est asymétrique. Elles sont nombreuses et bien caractérisées et les principales Gp sont regroupées dans le **Tableau III**. Les Gp participent aux fonctions plaquettaires et jouent un rôle de récepteurs.

Gp Ib	Récepteur du facteur von Willebrand
Gp IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)	Récepteur du fibrinogène, du facteur von Willebrand et de la prothrombine
Gp Ic/IIa	Récepteur de la fibronectine
Gp Ia/IIa	Récepteur du collagène
Gp IIIb	Récepteur de la thrombospondine
Gp Ic'/IIa	Récepteur de la laminine
Gp VI	Récepteur du collagène

Tableau III : Principales glycoprotéines plaquettaires transmembranaires.

□ Le système canaliculaire ouvert

Le système canaliculaire ouvert est constitué de profondes invaginations de la membrane plaquettaire connectées à la surface. Il représente ainsi une source importante de membrane pour la plaquette utilisée par exemple pour la formation de pseudopodes et lors de l'étalement plaquettaire. Il est également le lieu de sécrétion des granules plaquettaires et d'endocytose des substances plasmatiques.

□ Le système tubulaire dense

Le système tubulaire dense est un système membranaire non connecté à la surface et correspondant à du réticulum endoplasmique lisse résiduel du mégacaryocyte. Il est le lieu de stockage du calcium responsable de la contraction des plaquettes et des enzymes de la voie de synthèse des prostaglandines (thromboxane A2).

2.1.1.2 La zone cytoplasmique

Le cytoplasme plaquettaire contient des filaments d'actine, un réseau de microtubules servant de squelette à la plaquette et participant au maintien de sa forme discoïde. Le cytoplasme contient également des grains de glycogène qui constituent une réserve énergétique.

2.1.1.3 La zone des organelles

La zone des organelles comprend des mitochondries, des grains de glycogène et des granules de sécrétion. Les granules de sécrétion sont répartis en trois groupes et contiennent de nombreuses protéines libérées au cours de l'activation plaquettaire (**Tableau IV**).

Granules α	<u>protéines plaquettaires spécifiques :</u> facteur 4 plaquettaire β -thromboglobuline <u>protéines de la coagulation :</u> facteurs V, XI et XIII protéine S kininogène de haut poids moléculaire <u>glycoprotéines adhésives :</u> facteur von Willebrand thrombospondine fibrinogène fibronectine vitronectine <u>facteurs de croissance :</u> PDGF TGF β EGF... <u>inhibiteurs de la fibrinolyse :</u> α_2 -antiplasmine PAI-1 <u>albumine</u> <u>immunoglobulines</u> <u>P-sélectine (CD 62)</u>
Granules δ	ADP ATP pyrophosphate calcium sérotonine
Granules λ	hydrolases acides cathepsine élastase collagénase héparinase LAMP-1

Tableau IV : Principales substances contenues dans les granules intraplaquettaires.

□ Les granules alpha (α)

Ce sont les granules prédominants dans les plaquettes. De 0,3 à 0,5 μm de diamètre, les granules α acquièrent leur contenu protéique par deux mécanismes distincts : (1) une biosynthèse principalement au niveau du mégacaryocyte et (2) par endocytose et pinocytose tant au niveau du mégacaryocyte que des plaquettes sanguines circulantes [20]. Ils sont le lieu de stockage de protéines plaquettaires spécifiques comme le facteur 4 plaquettaire et la β -thromboglobuline. Les granules α contiennent également des facteurs de la coagulation tels que les facteurs V, XI, XIII et un cofacteur la protéine S (PS). Le facteur V contenu dans les granules représente 20 % du facteur V total [21]. Ils renferment également des glycoprotéines d'adhérence comme le facteur von Willebrand (vWF) (20 % du contenu total en vWF) et la thrombospondine, ainsi que des facteurs de croissance, des protéines plasmatiques et des inhibiteurs de la fibrinolyse. La membrane des granules α contient des récepteurs incluant la GpIIbIIIa et la P-sélectine qui s'expriment lors de la sécrétion des plaquettes au niveau de la membrane plasmique.

□ Les granules denses (δ)

Contenus également dans les plaquettes, les granules denses sont de forme ovale et mesurent de 0,2 à 0,3 μm de diamètre [22]. Les plaquettes normales contiennent entre 5 et 8 granules denses. Ces granules possèdent une forte densité aux électrons en microscopie électronique ce qui explique leur nom [23]. Ils renferment de fortes concentrations en ATP et ADP. L'ADP stocké dans ces granules provient du mégacaryocyte et représente 60 % du contenu total de la plaquette. Les granules contiennent également une grande quantité de calcium ainsi que de la sérotonine provenant du plasma (**Tableau IV**) [24].

L'ADP sécrété par les granules δ lors de l'activation des plaquettes agit sur les récepteurs P2Y1 et P2Y12 permettant une stabilisation de l'agrégation plaquettaire ainsi que l'activation de plaquettes circulantes par leur recrutement au site de la lésion [22, 25]. L'ADP provoque un influx de calcium qui induit la sécrétion du calcium intracellulaire ainsi que l'inhibition de l'adénylate cyclase. L'adénylate cyclase est une enzyme de la membrane plasmique qui participe à la transduction des signaux vers le cytoplasme. Elle synthétise l'AMP cyclique à partir de l'ATP, en présence de Mg^{2+} . L'ATP sécrété par les granules δ est rapidement convertit en AMP, qui est à son tour convertit en adénosine, un inhibiteur des réactions plaquettaires [24].

□ Les lysosomes (granules λ)

De forme arrondie de 0,2 μm de diamètre, les lysosomes ou granules λ contiennent en particulier des hydrolases acides, de la cathepsine, une collagénase et une proélastase (**Tableau IV**). Ces enzymes ne sont sécrétées qu'en cas de stimulation maximale des plaquettes.

2.1.2 L'activation plaquettaire

Les plaquettes interagissent avec la paroi vasculaire. Les vaisseaux sont schématiquement composés de trois couches : intima, média et adventice (**Figure 4**). L'intima est composée d'une mono-couche de cellules endothéliales séparée du sous endothélium, par la membrane basale. La média se compose d'une ou plusieurs couches de cellules musculaires lisses selon le calibre du vaisseau. Quant à l'adventice, elle est constituée de tissu conjonctif.

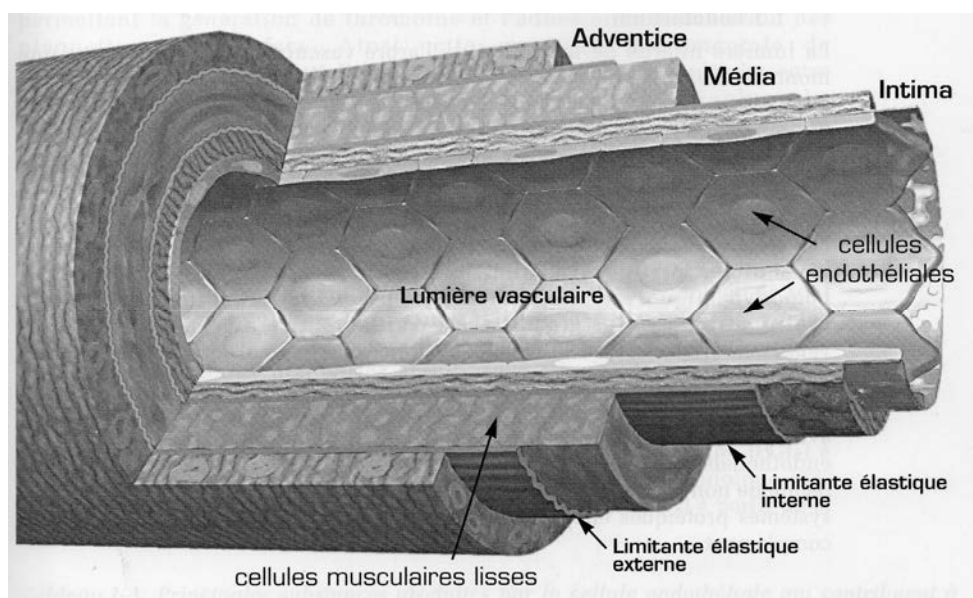


Figure 4 : Structure schématique d'un vaisseau [10].

L'endothélium sain empêche le déclenchement de l'hémostase. Ainsi, au repos la cellule endothéliale n'est pas thrombogène. Ses propriétés anti-thrombotiques sont dues à la composition et à l'arrangement des phospholipides et des glycoprotéines de la membrane qui ne permettent pas l'interaction avec les plaquettes. La cellule endothéliale est une cellule polarisée dont la surface luminale est thromborésistante alors que sa face abluminale adhère fortement aux molécules thrombogènes contenues dans le sous-endothélium. La thromborésistance de l'endothélium est le résultat de propriétés actives et passives des cellules endothéliales qui empêchent l'activation du système de la coagulation. Lors d'une lésion de la paroi vasculaire, le sous endothélium est mis à nu et les plaquettes réagissent avec

les constituants thrombogènes du sous endothélium (collagène, vWF, facteur tissulaire ...) conduisant au déclenchement de l'activation des plaquettes.

L'activation plaquettaire est un phénomène comprenant plusieurs étapes (**Figure 5**) : adhérence et changement de forme, agrégation, sécrétion et microvésiculation (exposition des phospholipides procoagulants) [18, 26].

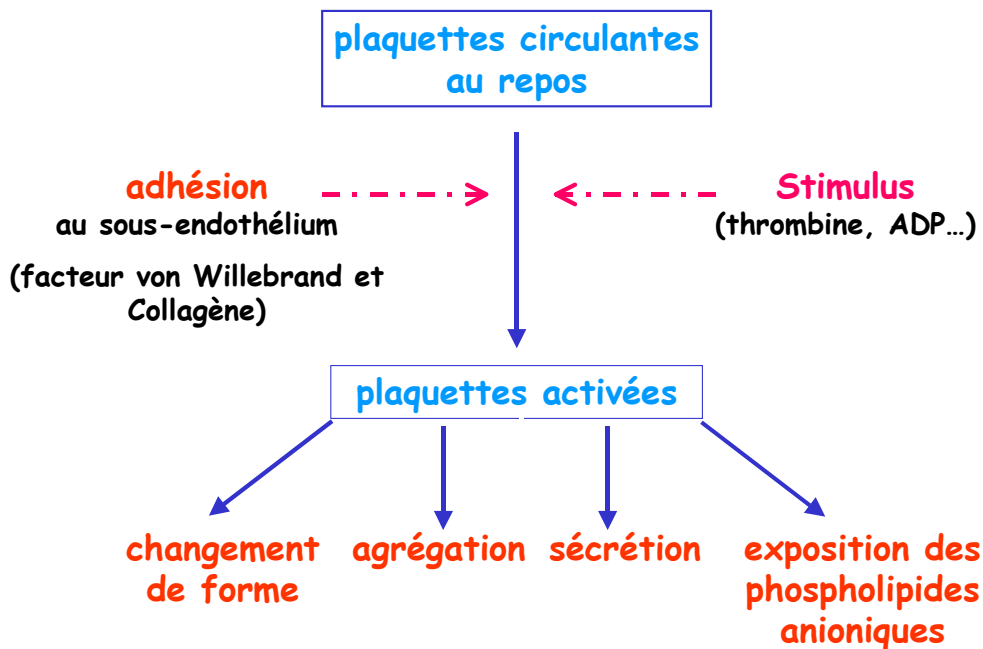


Figure 5 : Etapes de l'activation plaquettaire.

2.1.2.1 Adhérence et changement de forme

L'adhérence des plaquettes à la surface sous-endothéliale est un mécanisme faisant intervenir de nombreux facteurs dont le vWF et la GpIb sous forme d'un complexe GpIb-IX-V.

Le vWF est une protéine synthétisée par les cellules endothéliales de la paroi vasculaire et les mégacaryocytes [27]. Le vWF formé dans les cellules endothéliales est soit sécrété de façon constitutive dans le plasma soit stocké dans les grains de Weibel Palade jusqu'à une sécrétion induite par un stimulus approprié comme la thrombine ou la fibrine [28]. Le vWF synthétisé dans les mégacaryocytes est lui stocké dans les granules α plaquettaires et est sécrété lors de l'activation des plaquettes [29]. Sous forme libre dans le plasma, le vWF n'adhère pas aux plaquettes tant qu'elles n'ont pas été activées. Lors d'une brèche vasculaire, le vWF se fixe au collagène contenu dans le sous-endothélium ce qui se traduit par un changement conformationnel du vWF lui permettant d'interagir avec le complexe GPIb-V-IX présent à la surface plaquettaire [30].

Le complexe GpIb-IX-V est un complexe de quatre glycoprotéines possédant des domaines riches en leucine et contenues dans la membrane plaquettaire : GpIb α et GpIb β reliées par un pont disulfure et associées de façon non covalente avec GpIX et GpV [30].

La liaison du vWF au complexe GPIb-V-IX déclenche des signaux intracellulaires conduisant à l'élévation du calcium cytosolique, à des réarrangements du cytosquelette et à la dégranulation [31] :

- La fixation du vWF au complexe GPIb-V-IX induit des signaux d'activation aboutissant à l'activation de la phospholipase C γ 2 qui va induire la génération de deux messagers, l'inositol tri-phosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) par hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP2). L'IP3 formé mobilise le calcium cytoplasmique et le DAG active la protéine kinase C (PKC) et induit le réarrangement du cytosquelette d'actine. La résultante est une activation de la GpIIbIIIa, par modification conformationnelle de la protéine, qui pourra alors lier le fibrinogène [30, 32]
- La forme discoïde des plaquettes au repos est maintenue par les réseaux de microtubules et de filaments d'actine situés sous la membrane plaquettaire. L'adhérence des plaquettes à la surface cellulaire induit des modifications morphologiques importantes. Ainsi, lors de l'activation plaquettaire, les microtubules dépolymérisent, tandis que la polymérisation des filaments d'actine débute. Ces phénomènes aboutissent à un changement de forme de la plaquette qui devient sphérique et à la formation de pseudopodes (**Figure 6**).

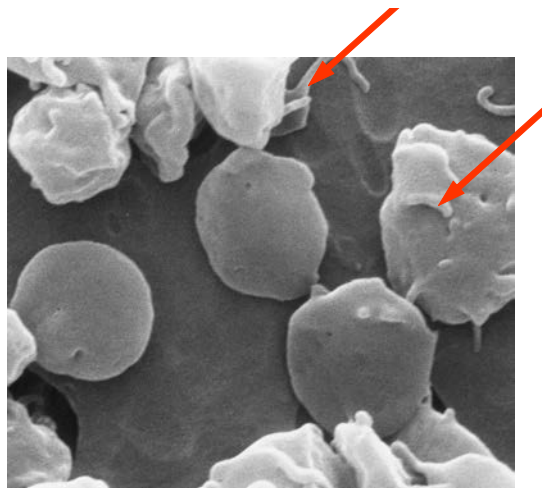


Figure 6 : Plaquettes non activées et plaquettes formant des pseudopodes (flèches) en microscopie électronique à balayage.

- Dans les plaquettes activées, les granules se regroupent et leurs membranes fusionnent avec celle du système canaliculaire ouvert. Les molécules thrombogènes sécrétées tels l'ADP, la sérotonine, la thrombospondine, le fibrinogène et le vWF vont participer au recrutement de plaquettes non activées circulantes au niveau du site de la lésion et initier ainsi l'agrégation.

2.1.2.2 Agrégation

L'agrégation plaquettaire est médiée par le complexe GpIIbIIIa (**Figure 7**). Ce complexe nommé également $\alpha_{IIb}\beta_3$ fait partie de la famille des intégrines, qui se lient à des séquences d'acides aminés particulières : RGD (Arginine – Glycine – Asparagine). Ces séquences se retrouvent au niveau de protéines comme le fibrinogène, le vWF, la prothrombine, la fibronectine ou la vitronectine.

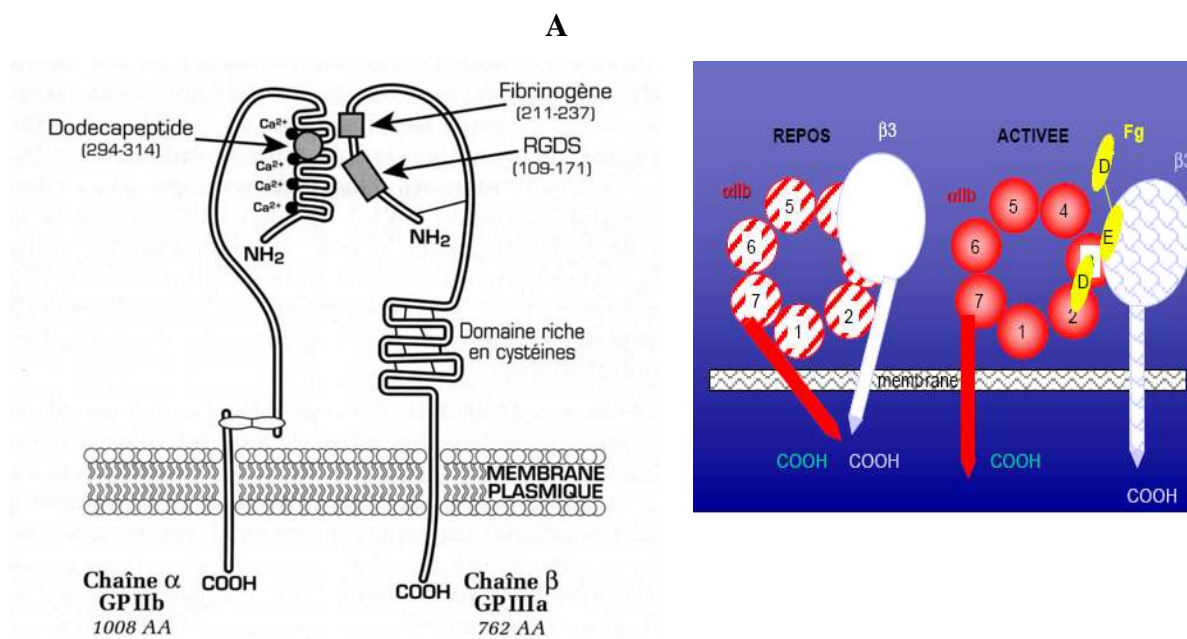


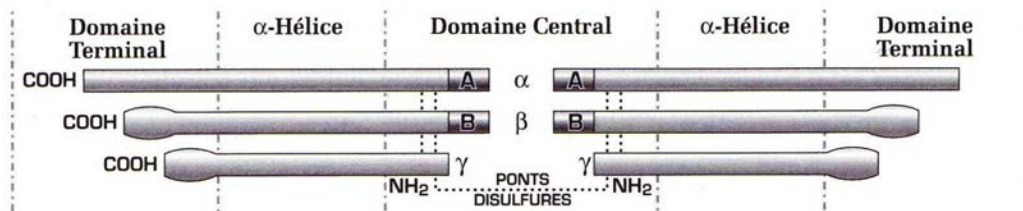
Figure 7 : Structure schématique du complexe GpIIbIIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) au repos (A et B) et activé (B).

L'intégrine GpIIbIIIa est composée d'une GpIIb liant les ions calcium divalents associée à une GpIIIa riche en cystéines. Trois sites de liaison pour des peptides du fibrinogène ont été localisés sur le complexe GpIIbIIIa [10].

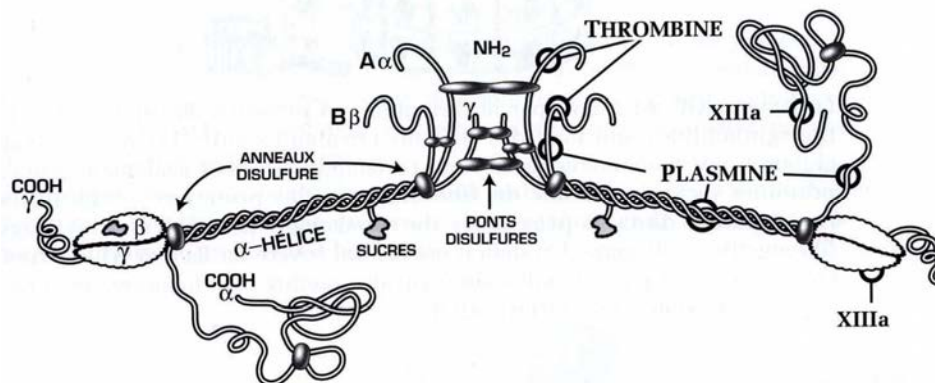
La GpIIbIIIa est un hétérodimère calcium dépendant constitué de deux glycoprotéines : IIb et IIIa. La GpIIb est composée de deux chaînes reliées par un pont disulfure, une chaîne lourde (β) extra-cellulaire et une chaîne légère (α) transmembranaire. La GpIIIa est constituée d'une chaîne polypeptidique unique, comportant plusieurs ponts disulfures intracaténaux. Le

nombre de complexes présents à la surface des plaquettes est d'environ 50 000 et augmente lors de l'activation plaquettaire par libération de molécules contenues dans les granules α . Une fois activé par le collagène, l'ADP ou bien encore la thrombine, le complexe peut lier les protéines adhésives (fibrinogène, vWF, fibronectine et vitronectine). Cette activation est due à un changement de conformation de l'intégrine par un mécanisme de signalisation « inside-outside » permettant alors la liaison des ligands sur l'intégrine.

Le fibrinogène, est une glycoprotéine de poids moléculaire 340000 Da synthétisée par les hépatocytes. Il est constitué de 3 paires de chaînes polypeptidiques (α , β et γ) liées de façon covalente par des ponts disulfures situés aux extrémités N-terminales des chaînes polypeptidiques (**Figure 8**).



A



B

Figure 8 : (A) et (B) Structure schématique du fibrinogène et site de clivage par la thrombine.

Le fibrinogène est une glycoprotéine formée de 6 chaînes polypeptidiques α , β et γ identiques 2 à 2. La cohésion est assurée par de nombreux ponts disulfures dans la région NH₂ terminale des chaînes polypeptidiques. Il contient des fibrinopeptides A et B au niveau des domaines N-terminaux des chaînes A α et B β respectivement pour le clivage par la thrombine [10].

Le fibrinogène possède trois paires de sites de liaison pour la GpIIb/IIIa : une séquence de douze acides aminés à l'extrémité C-terminale de ses chaînes γ , une séquence RGDS et une

séquence RGDF situées sur ses chaînes α (**Figure 8B**). Le fibrinogène se lie au complexe GpIIbIIIa au niveau d'un domaine RGDS situé sur la chaîne β , au niveau du dodécapeptide situé sur la chaîne α ainsi qu'à un troisième site de liaison situé entre les résidus 211 et 237 (**Figure 7**).

Le fibrinogène établit ainsi des ponts entre les plaquettes par liaison au niveau de deux GpIIbIIIa situés sur deux plaquettes différentes (**Figure 9**) entraînant ainsi leur agrégation.

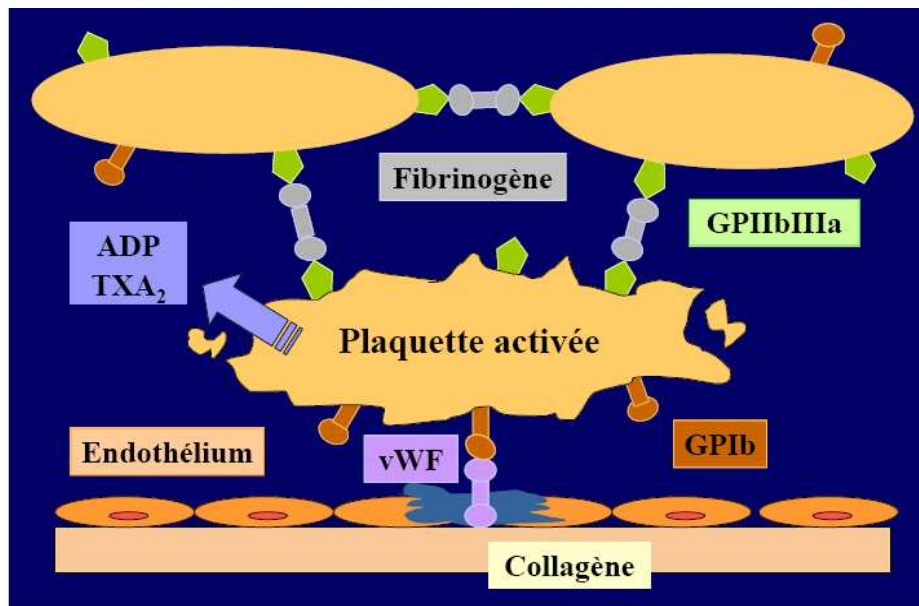


Figure 9 : Mécanisme d'agrégation plaquettaire.

Les complexes formés sont stabilisés par la thrombospondine (protéine intraplaquettaire) qui se fixe sur son récepteur (GpIIIb) et au fibrinogène par trois sites d'interactions situés sur les chaînes α (région 113-126 et 241-476) et β (région 243-252) du fibrinogène [33-35].

Le vWF se lie également à la GpIIbIIIa ce qui conduit à l'étalement des plaquettes, à leur adhérence irréversible ainsi qu'à l'agrégation en établissant des ponts entre les glycoprotéines GpIIbIIIa de plaquettes voisines activées. Le vWF intervient aussi dans le système de la coagulation en se liant au facteur VIII [36].

2.1.2.3 Sécrétion

L'adhérence et la contraction des plaquettes lors de l'activation induit une centralisation des granules ainsi que la sécrétion de leur contenu à l'extérieur de la plaquette par deux mécanismes dépendants ou non de la voie de l'acide arachidonique selon l'intensité de la stimulation. La sécrétion concerne les trois types de granules. Les substances libérées sont biologiquement actives et peuvent renforcer l'agrégation et la sécrétion des plaquettes (ADP,

calcium, fibrinogène et sérotonine), influencer la coagulation (facteur V, fibrinogène, vWF, PS) et modifier la perméabilité vasculaire (VEGF) et le tonus vasculaire (sérotonine).

En présence de faibles concentrations d'agonistes, une libération d'acide arachidonique endogène est observée (**Figure10**).

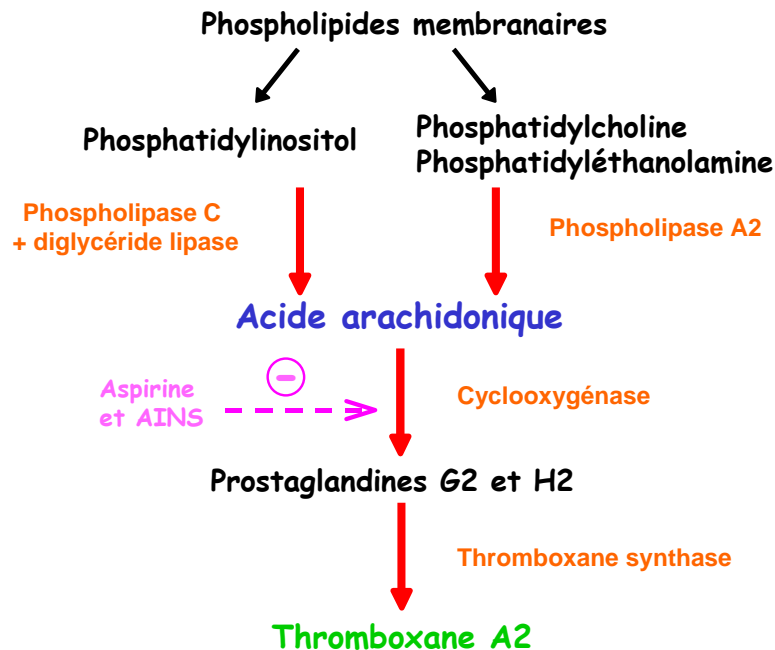


Figure 10 : Métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes et rôle d'inhibiteurs plaquettaires.

AINS = anti-inflammatoire non stéroïdien.

L'acide arachidonique est libéré des phospholipides membranaires par au moins deux voies : (1) à partir du phosphatidylinositol sous l'action de la phospholipase C et de la diglycérique lipase (2) à partir de la phosphatidylcholine ou de la phosphatidyléthanolamine sous l'action de la phospholipase A2 (**Figure 10**). Une partie de l'acide arachidonique libéré est transformé en prostaglandines endoperoxydes (prostaglandine G2 et prostaglandine H2) sous l'effet de la cyclooxygénase. La prostaglandine H2, sous l'action de la thromboxane synthase, est transformée en thromboxane A2 (TX A2). Le TX A2 inhibe l'activité de l'adénylate cyclase membranaire induisant une diminution du taux d'AMPc intraplaquettaire et la libération de calcium. Le TX A2 est un puissant agent inducteur de l'agrégation et de la sécrétion des plaquettes. De plus, c'est un puissant vasoconstricteur.

En présence de fortes concentrations en agonistes liés sur leurs récepteurs à sept domaines transmembranaires, la sécrétion plaquettaire est déclenchée par un mécanisme indépendant de la voie de l'acide arachidonique. (**Figure 11**).

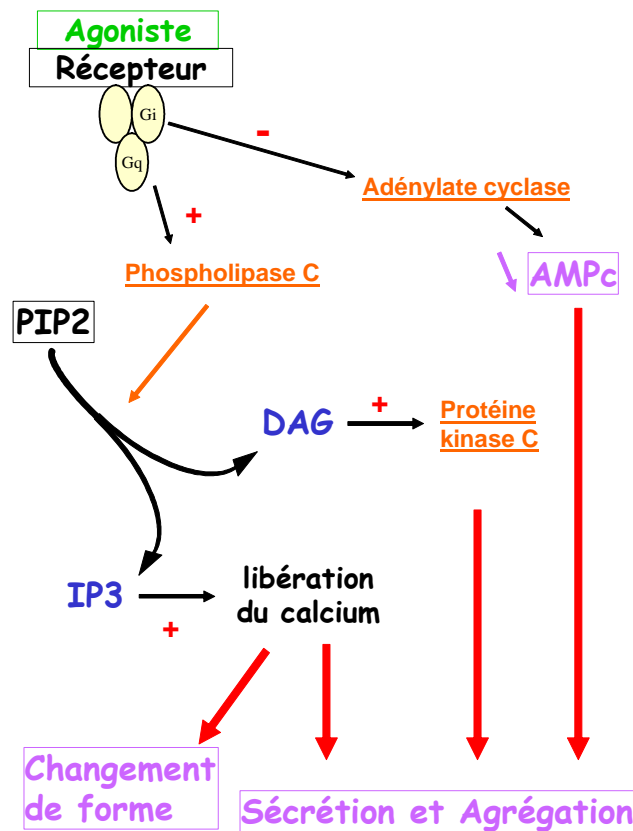


Figure 11 : Métabolisme de la sécrétion plaquettaire lors de la liaison d'agonistes activateurs à fortes concentrations sur leurs récepteurs plaquettaire.

PIP2 = phosphatidylinositol 4,5-diphosphate, IP3 = inositol tri-phosphate, DAG = diacylglycérol.

Cette voie fait intervenir des protéines G couplées aux récepteurs des agonistes, la protéine Gp qui active la phospholipase C et la protéine Gi qui inhibe l'activité de l'adénylate cyclase et réduit donc le taux d'AMPc. L'activation de la phospholipase C va induire la génération de deux messagers, l'IP3 et le DAG par hydrolyse du PIP2. L'IP3 formé mobilise le calcium cytoplasmique et le DAG active la PKC (**Figure 11**). Ce mécanisme favorise la sécrétion ainsi que l'agrégation [32, 37].

2.1.2.4 Microvésiculation

L'étape ultime de l'activation plaquettaire est le « flip-flop » membranaire (**Figure 12**) qui conduit à l'expression de phospholipides anioniques et procoagulants (phosphatidylsérine principalement) à la face externe des membranes plaquettaire et la libération de microvésicules riches en phospholipides anioniques dans la circulation sanguine [18]. La

surface plaquettaire ainsi que celle des microvésicules permet la fixation des facteurs de la coagulation.

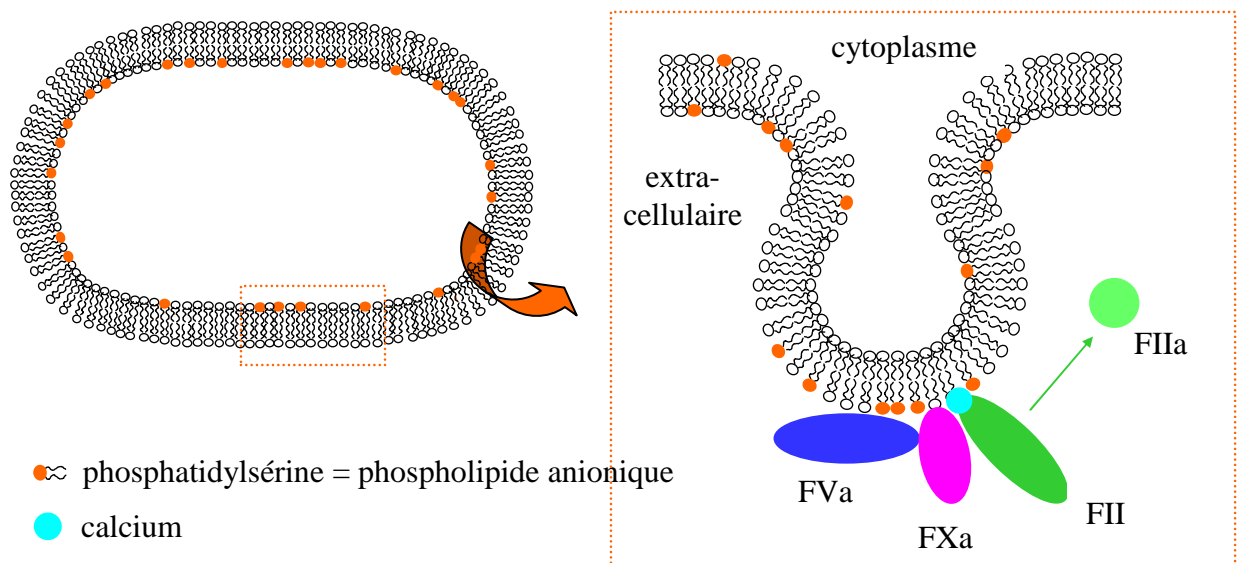


Figure 12 : Représentation schématique du « flip-flop » membranaire conduisant à l'expression de phospholipides anioniques et procoagulants à la surface plaquettaire. Formation du complexe prothrombinase (FVa, FXa, FII, phospholipides et calcium).

2.1.3 Les inhibiteurs plaquettaires

Les inhibiteurs des fonctions plaquettaires, appelés anti-plaquettaires sont utilisés pour la prévention de la thrombose artérielle compliquant l'athérosclérose. Ils se regroupent en deux catégories : les anti-activateurs plaquettaires et les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire.

2.1.3.1 Les inhibiteurs de l'activation plaquettaire

L'inhibition de l'activation plaquettaire peut se faire *via* différents mécanismes : en agissant (1) sur la voie d'activation liée au TX ou (2) sur la voie d'activation liée à l'ADP (**Figure 10 et 13**).

L'**aspirine** ou acide acétylsalicylique (ASA) bloque la voie du TX A2 en acétylant de façon irréversible la cyclo-oxygénase plaquettaire de type 1 [38, 39]. Les autres anti-inflammatoires non stéroïdiens comme l'indométacine, l'ibuprofène ou le flurbiprofène agissent de façon réversible en fonction de leur concentration dans le sang et de leur pouvoir inhibiteur sur la cyclo-oxygénase de type 1 [40]. Les thiénopyridines, **ticlopidine** et **clopidogrel**, agissent sur la voie d'activation liée à l'ADP en bloquant de manière irréversible les récepteurs à l'ADP présents sur les plaquettes (P2Y12). Ces molécules sont activées au niveau du foie avant de se lier de façon irréversible sur le récepteur P2Y12 [38]. Il en découle une élévation de l'AMPc

intraplaquettaire et par conséquent une diminution de la mobilisation du calcium intraplaquettaire et une inhibition de l'agrégation.

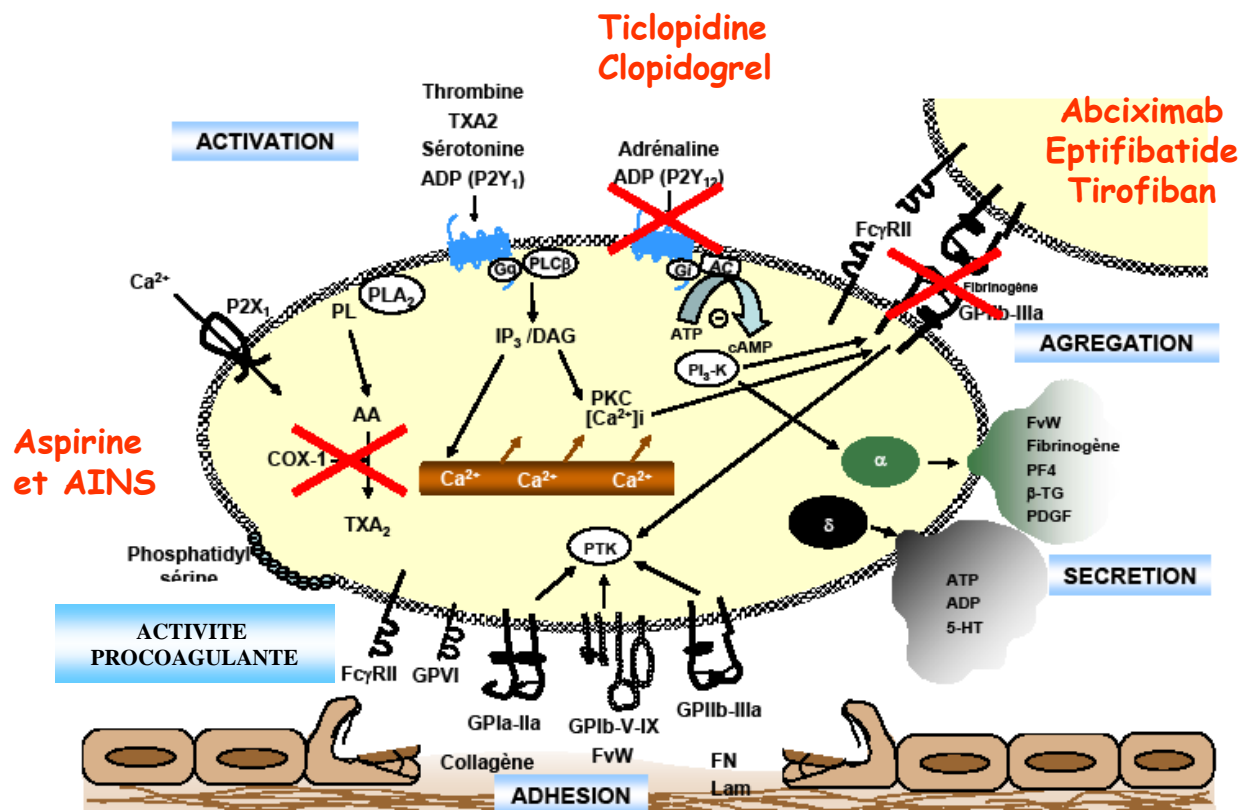


Figure 13 : Inhibiteurs de l'activation plaquettaire.

2.1.3.2 Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire

Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire se lient au complexe GpIIbIIIa empêchant ainsi la liaison du fibrinogène à son récepteur plaquettaire (**Figure 13**). On distingue trois molécules antagonistes de la GpIIbIIIa : abciximab, eptifibatide et tirofiban [38, 41]. L'**abciximab**, qui a la demi-vie la plus longue, est un fragment Fab d'un anticorps monoclonal murin humanisé (7e3) qui bloque de façon non compétitive le récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ (il se lie également au niveau du récepteur $\alpha_v\beta_3$), entraînant une modification de sa conformation. L'**eptifibatide** est un peptide de synthèse qui bloque de façon compétitive et réversible la liaison du fibrinogène au récepteur plaquettaire IIbIIIa. Le **tirofiban** lui est un peptidomimétique de synthèse qui inhibe de façon compétitive la liaison du fibrinogène à GpIIbIIIa en mimant la charge et la conformation spatiale de la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) du fibrinogène [38, 40, 41]. L'abciximab possède une forte affinité pour le récepteur au contraire des deux autres molécules qui sont des inhibiteurs de petite taille et de faible affinité [38, 40, 41].

D'autres agents anti-plaquettaires sont également décrits comme le **dipyridamole** qui est connu pour avoir une multitude de propriétés biochimiques responsables de ses effets sur les plaquettes [38]. La plus importante est sa capacité à inhiber la phosphodiesterase de type V qui inactive la GMP cyclique. Cette inhibition entraîne une augmentation des effets anti-plaquettaires de la voie de signalisation NO/GMP cyclique. Un autre effet consiste en une inhibition, de manière concentration dépendante, de l'adénosine déaminase induisant une augmentation de la concentration en adénosine dans le plasma. Cette inhibition de la recapture d'adénosine résulte en une stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase plaquettaire augmentant le taux d'AMPc [38-40]. L'AMPc inhibe la libération des granules d'ADP et donc l'agrégation plaquettaire. Un autre agent, **milrinone**, agit en inhibant les phosphodiésterases de type 3 ce qui entraîne une diminution de l'hydrolyse de l'AMPc endogène conduisant à une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Cette augmentation d'AMPc inhibe la libération des granules d'ADP et donc l'agrégation plaquettaire.

2.1.4 Les récepteurs FcγR

L'interaction des IgG avec des récepteurs Fc spécifiques (FcγR) présents au niveau des surfaces membranaires initie de nombreux processus biologiques pouvant être responsables de manifestations pathologiques. Un polymorphisme de structure pour ces récepteurs est bien connu. Ils sont regroupés en trois classes : FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16) avec cependant des sous-classes [42].

2.1.4.1 Les récepteurs FcγRI

Les FcγRI sont les premiers à avoir été décrits. Ce sont des protéines membranaires intégrales de 72000 Da avec une forte affinité pour les IgG monomériques. Des valeurs comprises entre 10^8 et 10^9 M^{-1} ont été décrites [43-45] pour les IgG₁. Ces récepteurs sont présents au niveau des monocytes, macrophages, neutrophiles et éosinophiles. Ces récepteurs sont spécifiques des sous-classes IgG₁ et IgG₃, cependant les IgG₄ se lient avec une plus faible affinité ainsi que les IgG₂ [42].

2.1.4.2 Les récepteurs FcγRII

Les FcγRII sont des protéines membranaires de 40000 Da. Ils sont présents au niveau des monocytes, macrophages, granulocytes incluant les neutrophiles et les éosinophiles, les cellules B et les plaquettes [42]. Il existe trois classes au niveau de ce récepteur : FcγRIIa,

Fc γ RIIb et Fc γ RIIc. Plusieurs anticorps monoclonaux sont spécifiques du Fc γ RII. Les plus étudiés sont les anticorps IV3 [46, 47] et KU79 [48].

Seule la forme Fc γ RIIa est présente au niveau des plaquettes [49]. Les quatre sous-classes d'IgG peuvent se lier au Fc γ RIIa cependant les IgG₁ sont celles qui se lient les plus facilement. Il existe au niveau du Fc γ RIIa un polymorphisme majeur situé sur l'acide aminé 131 codant soit pour une arginine (Arg131) ou une histidine (His131). Ces allèles sont co-dominants et conduisent à trois phénotypes possibles, Arg131Arg, Arg131His et His131His. Il a été rapporté une influence de ce polymorphisme sur la capacité à activer les plaquettes [50-52]. Cependant, il est classiquement admis que la liaison d'anticorps aux plaquettes quelle que soit leur cible induit une activation plaquettaire par l'intermédiaire des récepteurs Fc γ RIIa [53, 54].

2.1.4.3 Les récepteurs Fc γ RIII

Les Fc γ RIII sont des protéines membranaires comprises entre 50000 et 70000 Da. Ils sont présents à la surface des macrophages, neutrophiles, éosinophiles et mastocytes ainsi que sur les cellules NK (Natural Killer) Comme pour les autres récepteurs, le Fc γ RIII présente une spécificité pour les IgG₁ et IgG₃.

2.1.4.4 Anticorps activateurs plaquettaires par un mécanisme Fc γ RII-dépendant

De nombreux anticorps activateurs plaquettaires sont Fc γ RII-dépendants. Ainsi il a été rapporté de façon non exhaustive que des anticorps dirigés contre le CD9 [55, 56], la GpIb [57], la GpIIb [58] la GpIIbIIIa [59-61] ou encore la GpIV [62] induisaient une activation plaquettaire par un cross-linking avec le récepteur Fc γ RII. Il a été rapporté que les anticorps réalisaient un cross-linking entre l'antigène et le récepteur soit sur une même plaquette [53] soit au niveau de cellules proches [53, 54]. L'effet de ces anticorps est inhibé en présence de l'anticorps anti-Fc γ RIIa IV-3.

L'anticorps ALB6, qui est dirigé contre le CD9, est l'anticorps monoclonal activateur plaquettaire le plus décrit. Le CD9 est une protéine de 24000 Da présente au niveau de nombreuses cellules dont les plaquettes. ALB6 induit l'agrégation et la sécrétion des plaquettes. Pour agir, il est nécessaire qu'il exprime sa bivalence puisque qu'une absence d'agrégation est observée en présence de Fab [63]. Une comparaison du mécanisme d'action

de cet anticorps avec la thrombine [55] a montré que l'activation plaquettaire par ALB6 impliquait les mêmes voies de signalisation. Ainsi, ALB6 active la phospholipase C responsable du clivage du PIP2 qui génèrent IP3 et DAG (voie de signalisation présentée paragraphe 2.1.2.3). Cependant l'activation plaquettaire induite par ALB6 diffère quelque peu de celle obtenue par la thrombine. Contrairement à la thrombine, l'agrégation des plaquettes a lieu après un temps de latence [63] quelle que soit la concentration en anticorps utilisée, qui peut s'expliquer par le temps nécessaire à l'activation de la phospholipase C. La sécrétion des granules λ est plus rapide que celle des granules α avec la thrombine, tandis que la sécrétion a lieu de façon simultanée pour ALB6. Enfin contrairement à la thrombine, ALB6 est insensible à l'absence de calcium extracellulaire pour la sécrétion des granules λ et la phosphorylation de P20.

2.1.5 Activation plaquettaire dans le cadre de pathologies d'origine immunologique

2.1.5.1 Pathologies impliquant des auto-anticorps

Il est rapporté dans la littérature pour certaines pathologies des auto-anticorps capables d'activer les plaquettes :

□ La thrombopénie induite par l'héparine

La thrombopénie induite par l'héparine de type 2 (TIH) est une complication due à un traitement par l'héparine résultant du développement d'anticorps le plus souvent dirigé contre le facteur 4 plaquettaire (PF4). Si la cible principale de ces anticorps est la plupart du temps le complexe PF4/héparine, d'autres cibles comme l'interleukine 8 (IL8) ou NAP2 ont également été décrites [64]. Les anticorps pathogènes sont essentiellement des IgG (IgG₁ surtout et parfois IgG₃). Toutefois, certains patients développent des anticorps de type IgA et/ou IgM [65].

□ Les anticorps anti-streptokinase

Une activation plaquettaire induite par des anticorps anti-streptokinase a également été rapportée [66]. La streptokinase, qui était un des agents thrombolytiques les plus utilisés, est une protéine produite et isolée à partir du streptocoque β -hémolytique. Elle n'a pas d'activité enzymatique directe. Dans le sang, elle se complexe au plasminogène libre ou lié à la fibrine. Ce complexe streptokinase-plasminogène convertit ensuite le plasminogène en plasmine. La

streptokinase est une protéine étrangère et allergisante, son injection suscite la production d'anticorps anti-streptokinase. Ces anticorps sont très répandus mais à des taux faibles dans la population. Il a été rapporté que la liaison des anticorps anti-streptokinase à la streptokinase liée à la surface plaquettaire par sa fixation sur le plasminogène induit une agrégation plaquettaire [67].

2.1.5.2 Mise en évidence des auto-anticorps activateurs plaquettaires

Les anticorps associés aux TIH peuvent être mis en évidence par deux types de tests : les tests immunoenzymatiques (ELISA) et les tests d'activation plaquettaire. Les tests ELISA détectent les anticorps dirigés contre le PF4/héparine qu'ils soient de types IgG, IgM ou IgA [68]. Cependant, dans de rares cas, ces tests sont négatifs du fait que le PF4/héparine n'est pas cible antigénique des anticorps. Les tests d'activation plaquettaire (tests d'agrégation plaquettaire ou de relargage de sérotonine marquée [69]) détectent la présence d'anticorps (IgG) héparine-dépendants activant les plaquettes dans le plasma ou sérum des malades. Ces deux types de tests sont complémentaires pour le diagnostic de la TIH.

Les anticorps anti-streptokinase sont mis en évidence par deux types de tests. Ils sont également détectés par ELISA. La deuxième technique est la mesure de la capacité du sérum du malade à neutraliser l'effet fibrinolytique de la streptokinase.

L'influence de ces auto-anticorps sur l'activation des plaquettes repose donc essentiellement sur des expériences d'agrégation turbidimétrique ou sur des mesures de sécrétion. Dans notre laboratoire, l'effet activateur plaquettaire de ces auto-anticorps a été mis en évidence par mesure de l'activité procoagulante des phospholipides [70, 71].

2.1.5.3 Mécanisme d'action des auto-anticorps

Les IgG se liant au PF4 modifié par l'héparine interagissent avec les récepteurs Fc γ RIIa déclenchant une activation plaquettaire intense ainsi qu'une activation de la coagulation pouvant aboutir à des complications thrombotiques veineuses et/ou artérielles [72-74]. Ce mécanisme a été démontré par une inhibition du phénomène en présence de l'anticorps IV-3. L'activation des plaquettes s'accompagne d'une mobilisation du calcium intracellulaire, d'une synthèse de TX A₂ et d'une libération du contenu des granules α et δ . Actuellement, le mécanisme d'action des IgA et IgM reste encore à élucider, cependant plusieurs hypothèses ont été avancées [68]. Les IgA et IgM induiraient une activation plaquettaire par liaison des complexes PF4/héparine/IgA ou IgM sur des récepteurs au PF4 exposés à la surface des plaquettes à la suite d'une légère activation plaquettaire par la thrombine [75]. Une interaction

des plaquettes avec les cellules circulantes dans le sang pourrait également expliquer la pathogénicité des IgA et IgM [68]. Ainsi, les IgA peuvent se lier au niveau des récepteurs Fc α R présents sur les monocytes et neutrophiles induisant leur activation et par la même l'activation des plaquettes. En ce qui concerne les IgM, l'activation plaquettaire peut être médiée par les lymphocytes qui exposent à leur surface des récepteurs Fc μ R. Enfin, une liaison des IgG, IgA et IgM au niveau des cellules endothéliales pourraient induire une activation des cellules endothéliales qui conduirait à une activation des plaquettaire [76, 77]. De même que pour les TIH, il a été montré que l'activation plaquettaire observée dans le cadre d'un traitement avec de la streptokinase était dépendante de l'interaction du domaine Fc des IgG anti-streptokinase avec le récepteur Fc γ RIIa présent au niveau des plaquettes [78, 79]. Il a également été mis en évidence que des IgG anti-IL8 [70] et anti-streptokinase [71] pouvaient déclencher une activation plaquettaire jusqu'à l'étape ultime d'activité procoagulante des phospholipides par le même mécanisme que les IgG anti-PF4/héparine soit par l'intermédiaire du récepteur Fc γ RIIa.

2.2 Le système de la coagulation

L'hémostase est un processus physiologique permettant de colmater une brèche dans un vaisseau sanguin par la formation d'un caillot constitué de plaquettes agrégées entre elles et emprisonnées dans un réseau de fibrine. Ce phénomène est localisé, rapide et régulé pour éviter d'obstruer la lumière du vaisseau. A l'état physiologique, le sang est fluide. Lors d'une brèche vasculaire, la continuité de la monocouche de cellules endothéliales est rompue ce qui expose la couche sous-endothéliale au sang et déclenche l'activation du système hémostatique.

La coagulation, dont l'étape clé est la génération de thrombine, fait intervenir des protéines plasmatiques appelées facteurs de coagulation [80] mais nécessite également une surface phospholipidique ainsi que du calcium.

2.2.1 Les protéines de la coagulation

Les protéines de la coagulation sont d'une part les facteurs de la coagulation qui aboutissent à la génération de thrombine et d'autre part les inhibiteurs de la coagulation. Ce sont des glycoprotéines synthétisées dans le foie sauf le facteur tissulaire (FT).

2.2.1.1 Les facteurs de la coagulation

Les facteurs de la coagulation répertoriés dans le **Tableau V** ont été désignés par un numéro en chiffre romain par un comité international de standardisation en 1954 [10]. Une fois ces facteurs activés, le numéro en chiffre romain est accompagné d'un suffixe « a ».

	PM	Lieu de synthèse	Concentration plasmatique (µg/mL)	Fonction	Vitamine K dépendance
I ou Fibrinogène	333000	foie	2000/4000	substrat	non
II	72000	foie	100	zymogène	oui
V	330000	foie	10	cofacteur	non
VII	51000	foie	0,5	zymogène	oui
VIII	330000	foie	0,1	cofacteur	non
IX	55000	foie	5	zymogène	oui
X	59000	foie	10	zymogène	oui
XI	160000	foie	5	zymogène	non
XII	80000	foie	30	zymogène	non
XIII	300000	foie	20	zymogène	non
Facteur tissulaire	37000	Divers types cellulaires	0	cofacteur	non
Protéine C	62000	foie	5	zymogène	oui
Protéine S	80000	foie	25	cofacteur	oui
Thrombomoduline	60300	endothélium	0	cofacteur	non
Antithrombine	58200	foie	150	inhibiteur	non

Tableau V : Les protéines plasmatiques de la coagulation et leurs principaux inhibiteurs.

Sur le plan fonctionnel, les facteurs de la coagulation se répartissent en trois groupes :

□ Les zymogènes

Ces facteurs (F) sont présents sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes) dont l'activation correspond à une protéolyse limitée et spécifique de la protéine qui devient une enzyme. Les FII, FVII, FIX, FX, FXI et FXII ainsi que la prékallikréine sont des zymogènes de sérine protéase dont le site catalytique, masqué tant que la protéine n'est pas activée, est

situé au niveau de la partie C-terminale de la molécule. Le FXIII (tétramère $\alpha_2\beta_2$) est le zymogène d'une transglutaminase dont le site catalytique est situé sur les deux sous-unités α . De plus, les FII, FVII, FIX, et FX sont des protéines vitamine K dépendantes. La vitamine K est le cofacteur d'une enzyme, la carboxylase, qui convertit des résidus d'acide glutamique en acide- γ -carboxyglutamique (Gla) dans la région amino-terminale de ces protéines (**Figure 14**). Les résidus Gla sont indispensables à l'activité de ces protéines. Ils permettent leur liaison au niveau des phospholipides anioniques en présence de calcium. La protéine C (PC) et la PS, décrites plus bas, sont également des protéines vitamine K dépendantes.

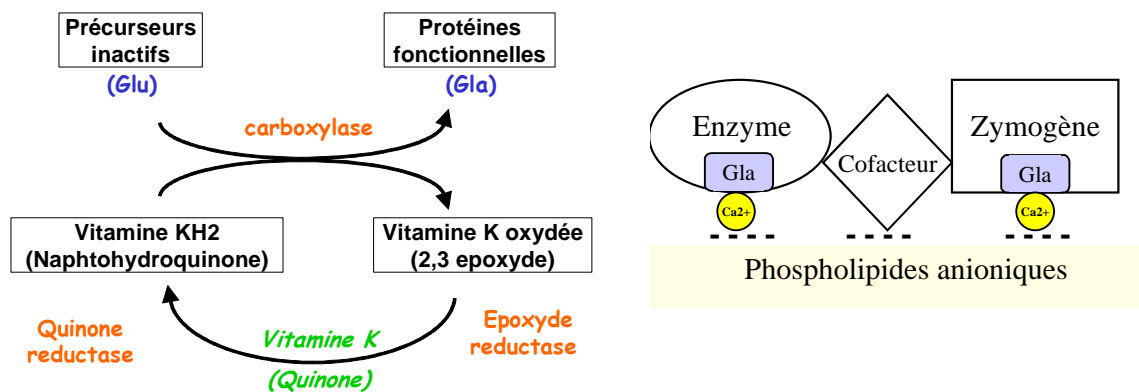


Figure 14 : (A) Carboxylation des protéines vitamine K dépendantes. (B) Complexes formés de protéines vitamine K dépendantes se liant aux phospholipides anioniques.
Glu = acide glutamique, Gla = acide- γ -carboxyglutamique

Attachés au domaine Gla, la prothrombine (FII) porte deux domaines « kringle » (K1 et K2) alors que les FVII, FIX et FX portent deux domaines « epidermal growth factor » (EGF) (**Figure 15**). Ces différents domaines permettent d'établir des interactions entre les différentes protéines de la coagulation de manière à former des complexes [10, 81].

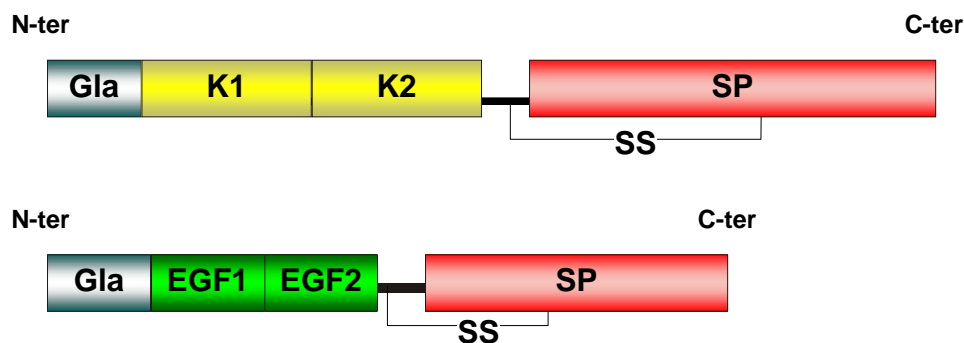


Figure 15 : Structures schématiques des facteurs vitamine K dépendants. En haut : FII, en bas : FVII, FIX et FX.
Gla: acide- γ -carboxyglutamique; K: kringle; SP: sérine protéase; EGF: epidermal growth factor.

Les FXI, FXII ainsi que la prékallikréine ne sont pas vitamine K dépendants. Ils portent néanmoins au niveau de la région N-terminale des domaines (exemple : domaine Apple A3 pour le FXI) leur permettant de se lier aux surfaces phospholipidiques ainsi qu'aux protéines de la coagulation (exemples : domaines A2 et A3 du FXI et du FIX).

□ Les cofacteurs

Trois protéines de la coagulation, les FV et FVIII ainsi que le FT, sont dépourvues d'activité enzymatique mais jouent un rôle de catalyseurs des réactions enzymatiques en accélérant la vitesse d'activation des autres enzymes. Pour acquérir leur rôle de cofacteurs les FV et FVIII doivent être activés par la thrombine ou le FXa. L'activité protéolytique des facteurs de la coagulation (FVIIa, FIXa et FXa) est négligeable en absence de calcium, de phospholipides et de leur cofacteur (FT, FVa et FVIIIa) [80]. Le **Tableau VI** présente l'efficacité de la présence de ces différents constituants sur l'activation des zymogènes [80].

Enzyme	Zymogène	Facteur d'activation
FVIIa	FX	1
FVIIa/FT/phospholipides/Ca ²⁺	FX	1,8 x 10 ⁷
FIXa	FX	1
FIXa/FVIIIa/phospholipides /Ca ²⁺	FX	1,2 x 10 ⁹
FXa	FII	1
FXa/FVa/phospholipides /Ca ²⁺	FII	1.1 x 10 ⁶

Tableau VI : Activation des zymogènes en fonction de la présence ou non de constituants des complexes de la coagulation.

□ Le substrat

Le fibrinogène dont la structure est détaillée plus haut est le précurseur de la fibrine.

2.2.1.2 Les inhibiteurs de la coagulation

Ils appartiennent à des familles différentes des facteurs de la coagulation et ont donc un mode d'action différent par rapport aux facteurs de la coagulation qui est détaillé plus bas.

2.2.2 Les différentes étapes de la coagulation

La coagulation résulte en une cascade ordonnée de réactions enzymatiques conduisant à la génération de thrombine qui transforme le fibrinogène en fibrine insoluble (**Figure 16**).

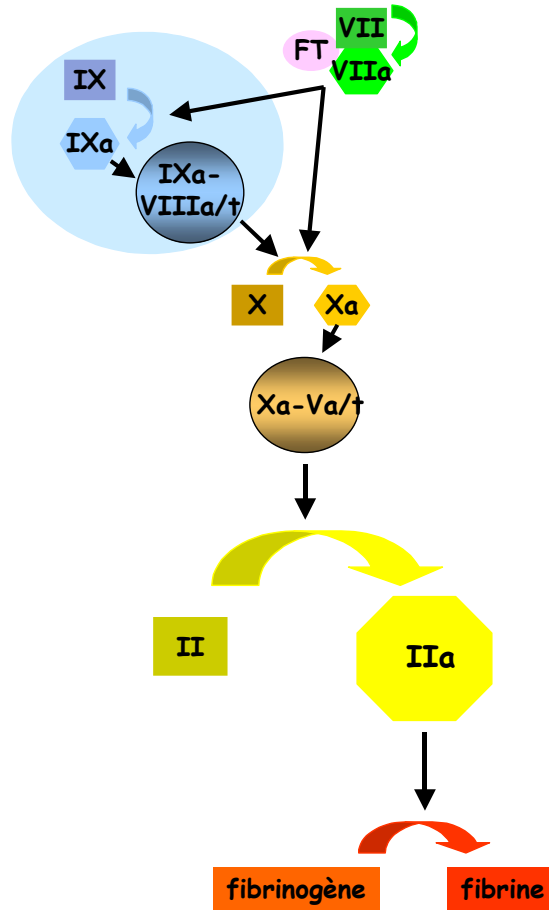


Figure 16 : Cascade de la coagulation.

La coagulation est un phénomène de surface, les réactions enzymatiques ont lieu à la surface de cellules présentant des phospholipides chargés négativement à la face externe de leur membrane. C'est le cas des plaquettes, des monocytes ou des cellules endothéliales lorsqu'ils sont activés. Lors de l'activation des cellules, l'inhibition de la flippase et l'activation de la scramblase induisent un transfert des phospholipides anioniques à la face externe de la membrane.

La coagulation se déroule en plusieurs étapes : **l'initiation, l'amplification et la propagation** [80, 82].

2.2.2.1 Initiation

En absence de FT, le système de la coagulation ne se met pas en route. Dans un vaisseau sain, le FT n'est pas disponible dans la circulation, c'est une protéine membranaire présente dans la

tunique externe du vaisseau, qui est exprimée au niveau du site de la lésion vasculaire lors de la rupture d'un vaisseau. L'interaction entre le FT et le FVIIa, qui représente dans le milieu plasmatique 1 à 2 % de la concentration en FVII total [83], est l'élément déclenchant de la coagulation. La source de FVIIa est controversée. Il a été rapporté qu'il serait issu des cellules sanguines tels les leucocytes, les monocytes ou encore des microvésicules plaquettaires ou bien qu'il circulerait comme une protéine soluble [84-86]. Le FVIIa non lié au FT n'a pas d'activité protéolytique pour les FIX et FX [87] par masquage du site actif ce qui lui permet d'échapper aux inhibiteurs contenus dans le plasma. Le FVII lui est converti par protéolyse limitée en FVIIa par de nombreuses enzymes dont la thrombine, le FXa, le FIXa et le FXIIa. Le FVIIa active également le FVII en présence de FT [88]. Le complexe FT/FVIIa active les FIX et FX fixés sur la surface membranaire avec une efficacité plus importante pour le FX [89]. Le FXa active à son tour le FII à la surface des plaquettes activées ce qui permet la formation des premières molécules de thrombine. (**Figure 17**).

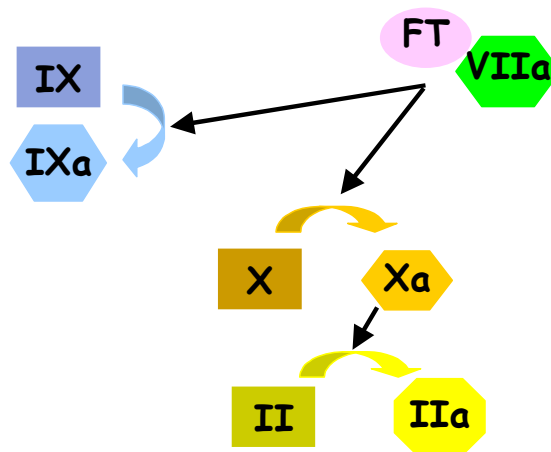


Figure 17 : Phase d'initiation de la coagulation.
II = prothrombine ; IIa = thrombine

2.2.2.2 Amplification et propagation du système

La thrombine amplifie alors immédiatement sa propre formation (**Figure 18**) :

- (1) elle stimule l'activation des plaquettes augmentant ainsi la quantité de phospholipides membranaires nécessaire à la réaction en se fixant sur son récepteur PAR1 et en le clivant.
- (2) elle active les cofacteurs VIII et V ce qui permet d'accélérer l'activation du FX et du FII par formation des deux complexes ténase (FIXa-FVIIIa-Ca²⁺-phospholipides) et prothrombinase (FXa-FVa-Ca²⁺-phospholipides).
- (3) elle peut aussi activer lentement le FXI qui active le FIX.

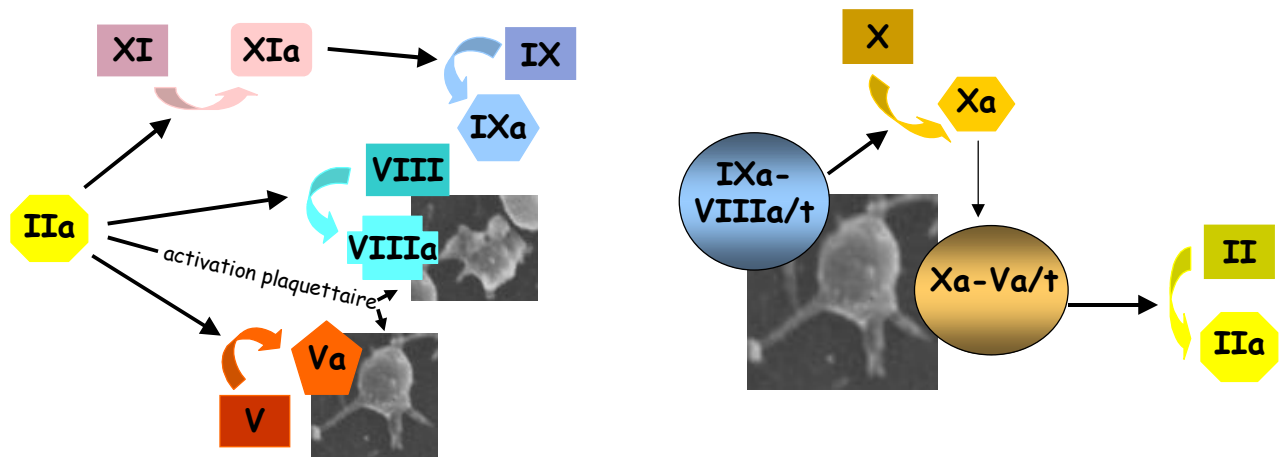


Figure 18 : Phase d'amplification et de propagation de la coagulation.

La thrombine peut également activer d'autres cellules que les plaquettes, principalement les leucocytes et les cellules vasculaires qui contribuent aux mécanismes de réactions inflammatoires, de remodelage du vaisseau ainsi qu'à la cicatrisation.

Lorsque la concentration de thrombine formée est suffisante, la thrombine convertit le fibrinogène, décrit plus haut (**Figure 8 A**), en monomères de fibrine par clivage des fibrinopeptides A et B au niveau des domaines N-terminaux des chaînes A_α et B_β respectivement. Les monomères de fibrine obtenus permettent de former un gel constitué de longs polymères (**Figure 19**). Il y a alors formation du caillot par accumulation de fibrine au niveau de l'agrégat plaquettaire. Le caillot est stabilisé par le FXIII lui-même activé par la thrombine. Cette activation est régulée par la fibrine qui sert de cofacteur et par le calcium.

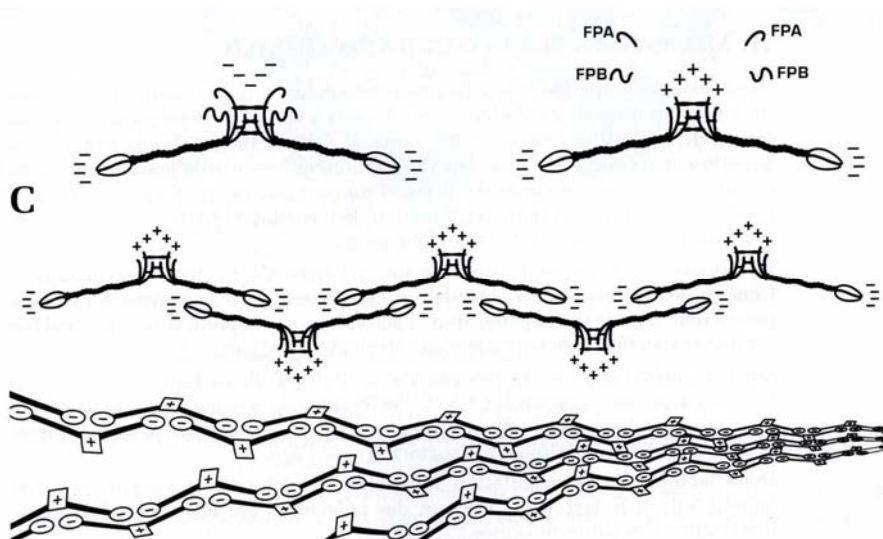


Figure 19 : Polymérisation de la fibrine.
FPA et FPB = fibrinopeptide A et B [10].

2.2.2.3 Régulation

La coagulation est un système soumis à une régulation permettant un maintien de la fluidité du sang. Les réactions de coagulation sont limitées au niveau de la brèche vasculaire grâce à des systèmes de contrôle. Deux systèmes **majeurs** contrôlent la quantité de thrombine générée [90] :

- (1) des **inhibiteurs** stoechiométriques circulant dans le plasma et qui neutralisent directement l'activité de protéases impliquées dans la coagulation.
- (2) le **système de la protéine C** (PC) qui est un système inhibiteur dynamique initié par la thrombine elle-même pour contrôler sa génération.

Parmi les inhibiteurs stoechiométriques, l'antithrombine est l'un des inhibiteurs principaux de la coagulation [91]. Elle réagit avec tous les facteurs activés de la coagulation mais agit surtout comme inhibiteur de la thrombine et du FXa en formant un complexe covalent irréversible entre la sérine de l'enzyme et l'arginine 393 du site réactif de l'antithrombine. Le FVIIa lié au FT est également inhibé par l'antithrombine mais de façon peu efficace. Les FXa et FIXa fixés à la surface membranaire étant protégés de l'inactivation [92], c'est principalement la thrombine libre qui est piégée. La vitesse de formation des complexes thrombine/antithrombine qui est lente est considérablement accélérée en présence d'héparine ou d'héparane sulfate (présent à la surface de l'endothélium) [93]. Leur présence induit un changement conformationnel de l'antithrombine qui lui permet d'augmenter son effet inhibiteur. Lorsque l'antithrombine est saturée en héparine, il a ainsi été décrit un effet inactivateur 2300 fois plus important [94]. Les complexes inactifs formés sont éliminés de la circulation par le foie.

Le TFPI (tissue factor pathway inhibitor) produit principalement par la cellule endothéliale mais également par les hépatocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales coronaires [95, 96] et présent à de faibles concentrations dans le sang [97] régule la voie du FT. Il est le principal régulateur de la phase d'initiation. Il se lie au FXa puis forme un complexe quaternaire FT/FVIIa/FXa/TFPI. Le complexe FT/FVIIa est alors inhibé ce qui bloque l'activation des FXa et FIXa et donc la génération de thrombine. Le mécanisme d'inactivation par le TFPI implique que le TFPI se lie dans un premier temps au FXa puis au complexe FT/FVIIa [98, 99]. Les complexes FT/FVIIa ne peuvent être inhibés qu'après avoir initié la formation de FXa [96].

D'autres inhibiteurs ayant probablement un rôle physiologique secondaire agissent également sur la régulation de la coagulation : α_2 -macroglobuline, le second cofacteur de l'héparine ou encore l' α_1 -antitrypsine.

Les molécules essentielles au système de la PC impliquent la thrombine, la thrombomoduline (TM), le récepteur endothélial de la PC (EPCR pour endothelial cell protein C receptor), la PC et la PS. (**Figure 20**) [36, 100].

Les molécules composant le système anticoagulant de la PC présentent des similitudes structurales. Elles contiennent des motifs présentant une homologie avec les domaines EGF mais en nombre variable, 2 pour la PC, 4 pour la PS et 6 pour la TM. L'EPCR lui ne contient pas de domaines EGF. De plus, toutes les protéines impliquées possèdent un domaine globulaire situé en position C-terminale pour la PC et la PS (domaine SHBG) contenant le site catalytique et en N-terminal pour la TM (domaine « lectine-like ») et l'EPCR.

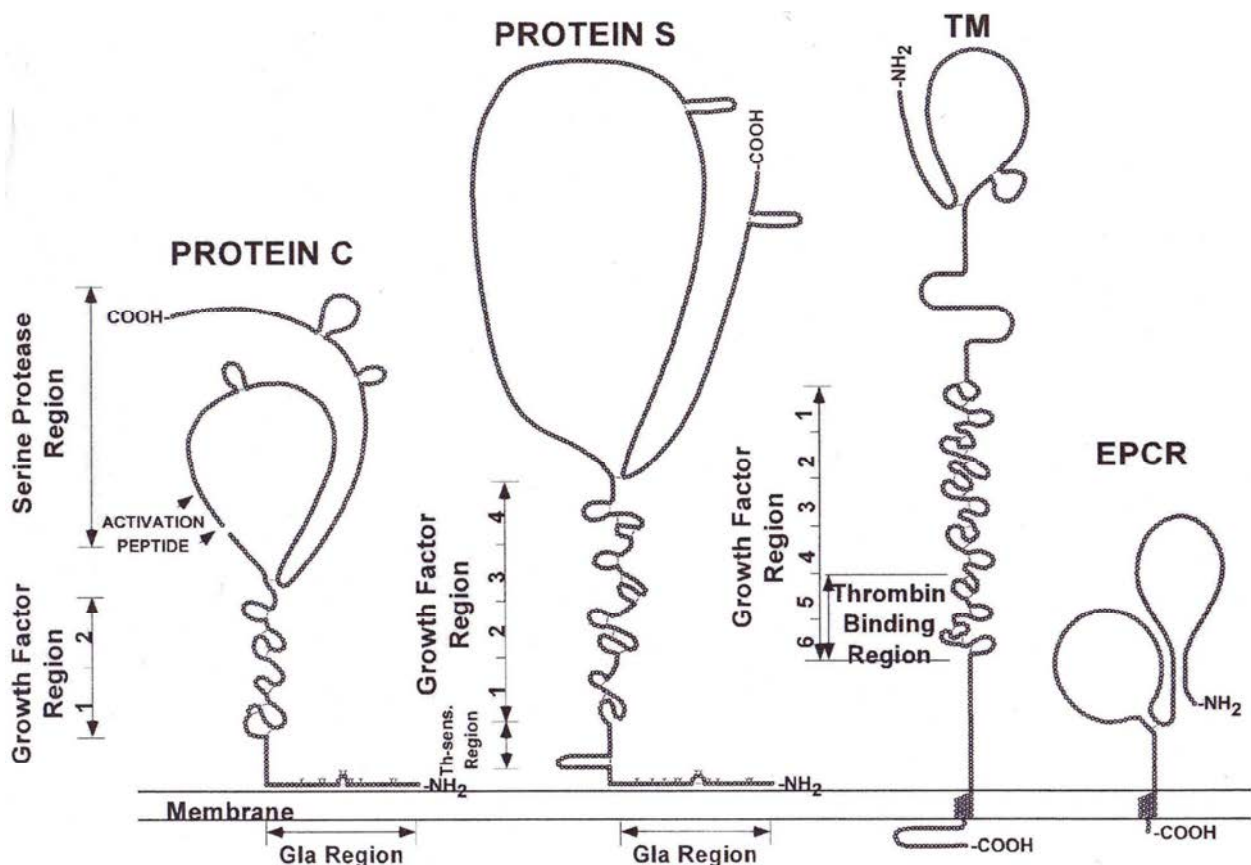


Figure 20 : Représentation schématique de la protéine C, protéine S, la thrombomoduline (TM) et l'EPCR [101].

La **TM (Figure 20)** est une protéine transmembranaire de 68000 Da exprimée par les cellules endothéliales. Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique de 557 acides aminés contenant un domaine riche en sérine-thréonine, six domaines EGF et un domaine globulaire « lectine-like » [100, 102]. La TM, par ces domaines EGF 5 et 6, fixe la thrombine au niveau de l'exosite 1 ce qui bloque les interactions avec les autres protéines se liant à la thrombine et modifie ainsi sa spécificité enzymatique [101, 103, 104] : la thrombine perd alors son activité procoagulante devenant incapable de coaguler le fibrinogène, d'activer les FV [105] et FVIII ainsi que les plaquettes [106] et acquiert des propriétés anticoagulantes en activant la PC en PCa [100, 102, 103]. La thrombine seule est capable d'activer la PC cependant sa vitesse d'activation est environ 1000 fois plus importante en présence de TM [107]. De plus, la liaison de la thrombine à la TM induit une inhibition plus efficace de la thrombine par l'antithrombine mais également par l'inhibiteur de la PC (PCI) [100]. Dans le cas de l'antithrombine, l'accélération de l'inactivation de la thrombine (demi-vie de la thrombine environ 3 secondes) est complètement dépendante de la présence de chaînes de chondroïtine sulfate sur la TM [108].

La **PC (Figure 20)** est une glycoprotéine dont la concentration plasmatique est de 65 nM. De poids moléculaire 62000 Da, la PC comporte 417 acides aminés répartis en deux chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure. Elle est composée pour la chaîne légère d'un domaine γ -carboxyglutamique ainsi que de deux domaines EGF, et pour la chaîne lourde d'un petit peptide d'activation chargé négativement (dodécapeptide situé au niveau des acides aminés Asp 158 – Arg 169) ainsi que d'un domaine sérine protéase [36]. L'activation de la PC par le complexe thrombine/TM/EPCR, permet l'activation du domaine sérine protéase par un changement conformationnel de la protéine. Ce changement conformationnel a lieu lorsque le peptide d'activation est relargué par clivage d'un peptide de liaison entre les résidus Arg 169 – Leu 170.

Comme la thrombine, la PC se fixe au niveau d'un domaine EGF (domaine 4) de la TM par une région chargée positivement et située dans le domaine sérine protéase et est activée en PCa [103]. La présentation de la PC au complexe thrombine/TM est augmentée par fixation de la PC sur son récepteur endothélial (EPCR). L'**EPCR (Figure 20)** est une protéine membranaire de type I constituée de deux hélices α et de 8 feuillets β reliés entre eux et permettant la liaison aux phospholipides. Cette liaison de la PC à l'EPCR par l'intermédiaire de ses domaines Gla permet d'aligner la PC au complexe thrombine/TM [109, 110].

L'activation de la PC par le complexe thrombine/TM est multipliée par 20 lorsque la protéine est fixée à son récepteur [111]. Dix acides aminés (Arg 81, Leu 82, Val 83, Glu 86, Arg 87, Phe 146, Tyr 154, Thr 157 et Glu 160) contenus dans la molécule d'EPCR ont été identifiés comme critique pour la liaison de la PC [112].

La **Figure 21** présente et résume en trois dimensions l'interaction entre les différentes molécules impliquées dans l'activation de la PC en PCa.

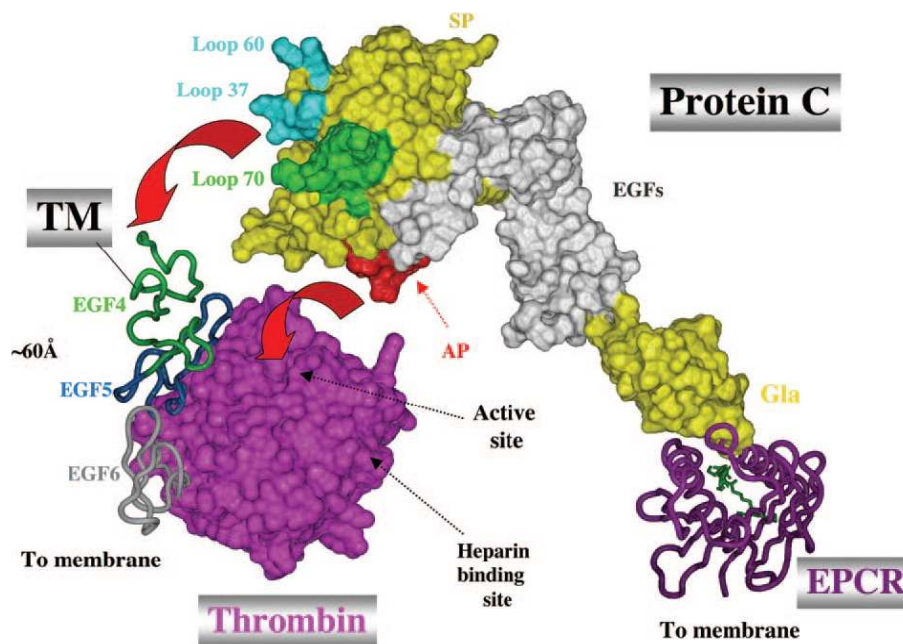


Figure 21 : Représentation en 3D du complexe thrombine-TM-PC-EPCR.
Interaction entre la thrombine et les domaines EGF 5 et 6 de la TM. Interaction entre le domaine Gla de la protéine C et l'EPCR [109].

Une fois activée, la PC se dissocie de son récepteur et se complexe à son cofacteur la PS (**Figure 20**) toutes deux étant liées au niveau des surfaces phospholipidiques.

La **PS** est une protéine plasmatique. Sa concentration plasmatique est d'environ 25 µg/mL. De masse moléculaire 70000 Da, la PS est constituée d'une chaîne polypeptidique de 635 acides aminés répartis en plusieurs domaines : un domaine Gla en position N-terminal suivi d'une région sensible à la thrombine (TSR), de quatre domaines EGF et d'un domaine SHBG (région homologue à la « sex hormone binding protein ») comportant 2 régions type laminine G (LamG) (**Figure 22**) [109, 113]. Dans le plasma humain seulement 30 à 40 % de la PS circule sous forme libre, le reste étant lié à une protéine du complément : la C₄BP par

l'intermédiaire du domaine SHBG. Seule la forme libre a un rôle de cofacteur de la PCa [103, 113].

La PS forme avec la PCa un complexe stoechiométrique à la surface des phospholipides anioniques. La formation du complexe augmente l'affinité de la PCa pour les membranes [113]. L'interaction entre les deux protéines implique la TSR mais également le domaine EGF1 et EGF2 [103, 114-116, 117].

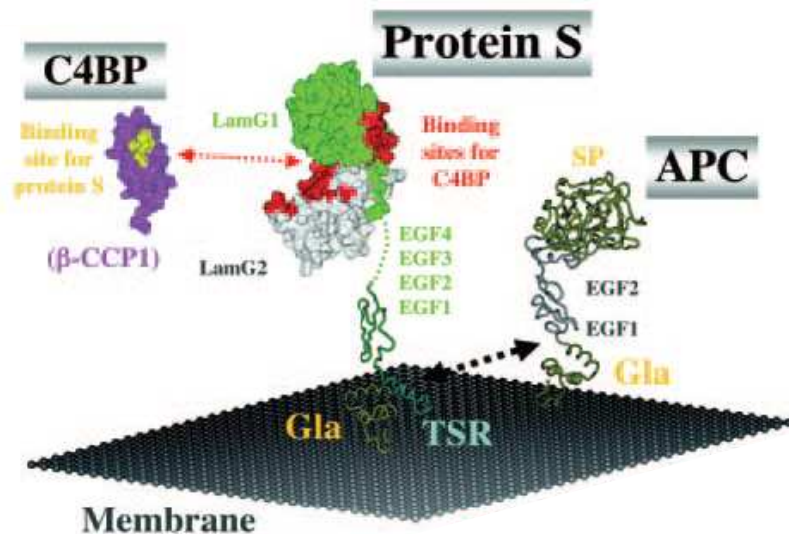


Figure 22 : Structure de la protéine S et ses sites de liaison avec la C₄BP et la protéine C activée [103].

En absence de calcium, la thrombine clive la PS au niveau de deux sites (Arg 49 et 70) de la TSR [118-120] inhibant ainsi son activité de cofacteur pour la PCa [118, 121-123]. La PS peut également être clivée au niveau de la région TSR par le FXa mais en un site différent (Arg 60). Contrairement à la thrombine, la présence de phospholipides et de calcium est nécessaire et ce clivage est inhibé par le FVa [121]. La TSR est également nécessaire pour la liaison de la protéine aux phospholipides anioniques par son domaine Gla. La TSR ne se lierait pas directement aux phospholipides. Elle induirait de manière non spécifique, une conformation du domaine Gla permettant une interaction optimale avec les phospholipides probablement en agissant comme un « spacer » entre le domaine Gla et le domaine EGF1 [114, 118, 124].

La PS possède un effet anticoagulant *in vitro* indépendant de la PCa en inhibant directement les complexes prothrombinase et tenase. Les mécanismes d'action rapportés sont principalement :

- (1) une inhibition du complexe prothrombinase par une liaison directe sur les FVa et FXa [125-128].
- (2) une compétition entre la PS et les complexes tenase et prothrombinase pour la liaison sur les phospholipides anioniques [129].
- (3) une inversion de l'effet protecteur du FXa dans l'inactivation du FVa [130, 131]. Il a été suggéré que la disparition apparente de la protection du FXa par la PS est due à une augmentation du clivage en Arg506 du FVa non lié au FXa, ayant pour résultat l'épuisement de FVa libre et la dissociation des complexes de FXa/FVa [130].

Les complexes PCa/PS fixés sur les phospholipides membranaires permettent à la PCa d'exercer son effet anticoagulant, par protéolyse des FVa et FVIIIa cofacteurs des complexes tenase et prothrombinase respectivement (**Figure 23**). Les FVa et FVIIIa inactivés n'étant plus fonctionnels dans les complexes tenase et prothrombinase cela conduit à une inhibition de la génération de thrombine.

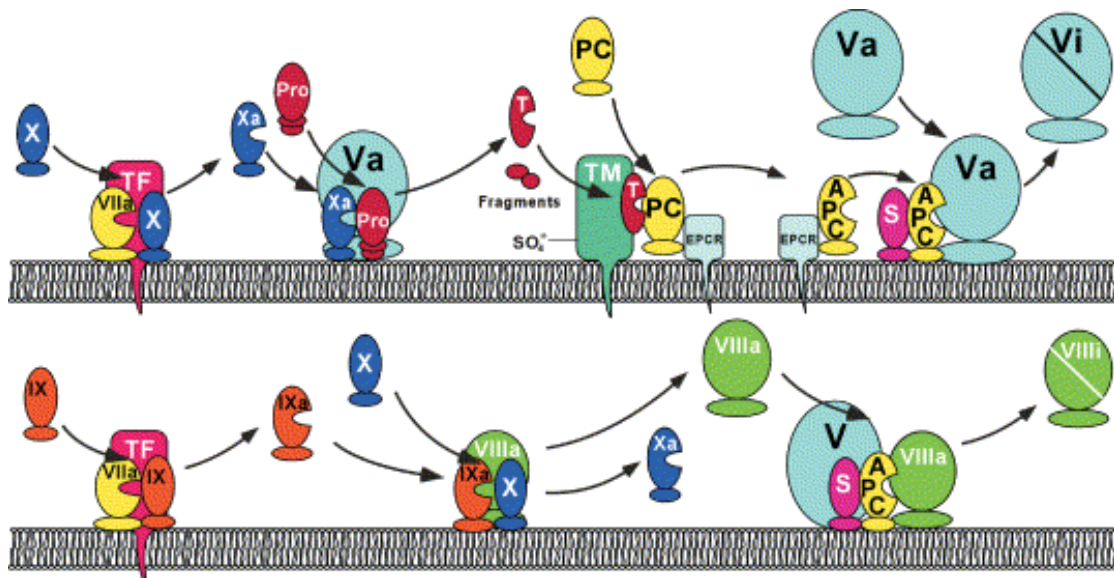


Figure 23 : Régulation de la coagulation par le système de la protéine C.
en haut : inhibition du FVa par la PCa et *en bas* : inactivation du FVIIIa par la PCa [132]

Le FV (**Figure 24 A**) est le précurseur inactif du FVa. Il est composé de 3 domaines A (A1, A2 et A3) reliés par une région B ainsi que de deux domaines C (C1 et C2). Le FV est activé

par la thrombine par une séquence de clivages protéolytiques en position Arg 709, puis en Arg 1018 et enfin en Arg 1545 [133, 134].

Ces clivages conduisent au FVa constitué de deux chaînes (une lourde et une légère) liées par une association non covalente nécessitant des ions calcium [133]. Trois sites de clivage par la PCa ont été identifiés sur le FVa situés au niveau de sa chaîne lourde en position Arg 306, Arg 506 et Arg 679 (**Figure 24 B**) [135].

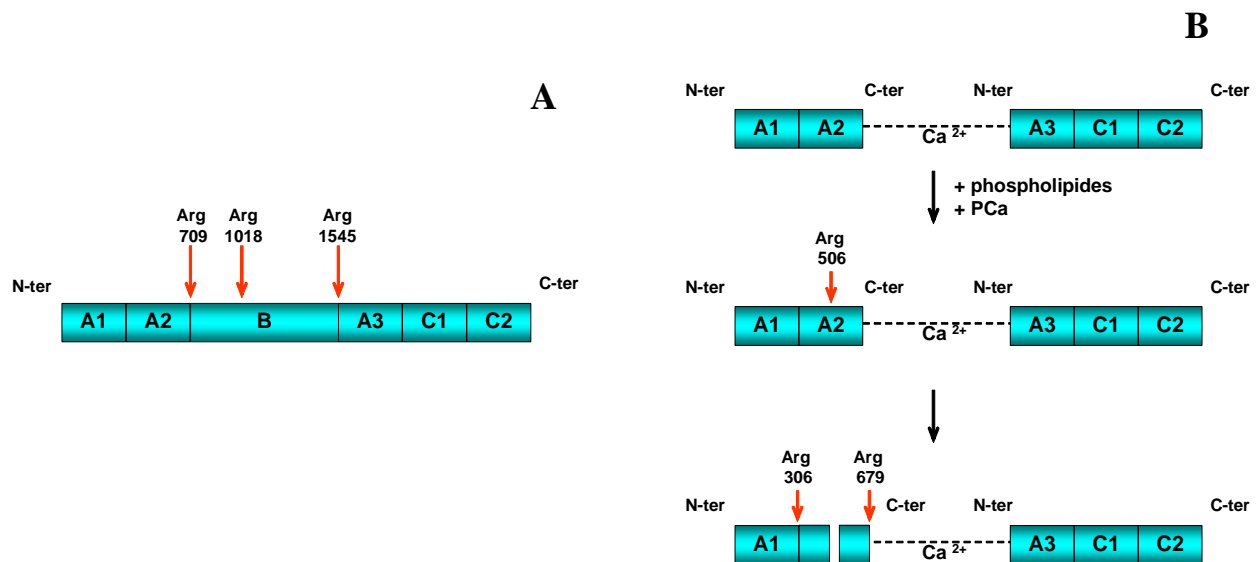


Figure 24 : Représentation schématique (A) de la structure du FV et de ses sites de clivage par la thrombine (B) de l'inactivation protéolytique du FVa par la PCa.

Lorsque le FVa est lié aux phospholipides anioniques, son inactivation par la PCa a lieu via une réaction en deux phases [135, 136] : (1) une phase rapide associée à un clivage en position Arg 506 et (2) une phase lente associée à un clivage en position Arg 306. Le clivage en Arg 506 permet une exposition des autres sites de clivage à la PCa [135, 136]. En présence de phospholipides, le clivage en Arg 679 du FVa contribue peu à la perte de son activité cofacteur mais participe néanmoins à l'inactivation totale du FVa.

Certains facteurs de la coagulation viennent moduler cette inactivation par la PCa [137]. Ainsi, la PS accélère environ 20 fois l'inactivation du FVa en favorisant spécifiquement le clivage en Arg 306 alors qu'au contraire, le FXa protège le FVa de l'inactivation en bloquant le clivage en Arg 506. Le FVa présent dans le complexe prothrombinase est ainsi protégé de l'inactivation [137]. Une augmentation d'un facteur 5 du clivage en Arg 506 en présence de PS a également été montrée [138].

Le FVIII (**Figure 25 A**) est le précurseur inactif du FVIIIa. Comme le FV, il est composé de 3 domaines A (A1, A2 et A3) reliés par une région B ainsi que de deux domaines C (C1 et C2). De manière similaire au FV, le FVIII est activé par la thrombine par une séquence de clivages protéolytiques en position Arg 372, puis en Arg 740 et enfin en Arg 1689 [134, 139]. Ces clivages conduisent au FVIIIa constitué de deux chaînes (une lourde et une légère) reliées par une interaction Mn^{2+} . Le clivage en Arg 740 libère la chaîne lourde tandis que le clivage en Arg 1689 libère la chaîne légère. Le clivage en Arg 372 permet l'exposition d'un épitope cryptique pour la liaison au FXIa [134, 139].

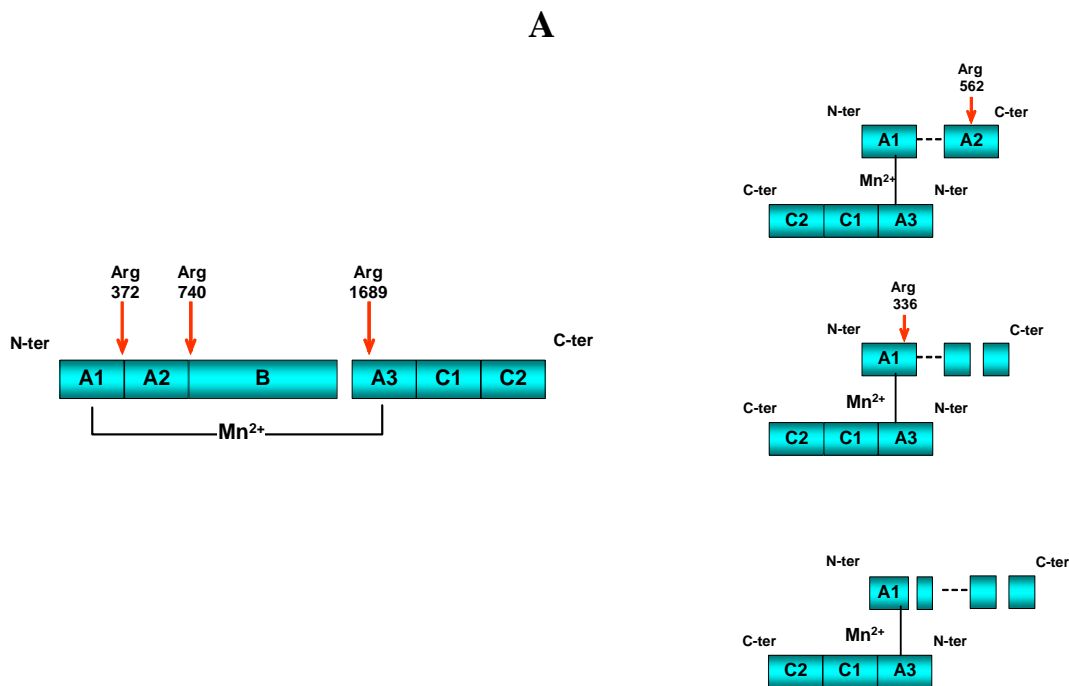


Figure 25 : Représentation schématique (A) de la structure du FVIII et de ses sites de clivage par la thrombine (B) de l'inactivation protéolytique du FVIIIa par la PCa.

L'inactivation du FVIIIa se fait comme pour le FVa par clivage protéolytique. Deux sites de clivage par la PCa ont été identifiés sur le FVIIIa situés au niveau de sa chaîne lourde en position Arg 336 et Arg 562 [139-141] (**Figure 25B**). Un premier clivage rapide a lieu en Arg 562 puis un deuxième clivage lent en Arg 336 [140].

Certains facteurs de la coagulation viennent également moduler cette inactivation par la PCa. Ainsi, le FIXa protège le FVIIIa de l'inactivation par la PCa [142, 143]. Le FVIIIa dans le complexe tenase est ainsi protégé de l'inactivation par la PCa. Cependant sous certaines conditions, il est rapporté que le FIXa inactive le FVIIIa par clivage en Arg 336 [144, 145].

Le système de la PCa est également soumis à une régulation. La PCa peut être neutralisée par différents inhibiteurs de protéase dont l'inhibiteur de la PC (PCI), l' α_1 antitrypsine ou encore l' α_2 macroglobuline. Cependant l'inhibition observée est relativement faible car la demi-vie de la PCa dans la circulation est d'environ 20 min [109].

Néanmoins, le PCI est le principal inhibiteur de la PCa malgré le fait que les deux autres inhibiteurs soient présents en plus grande quantité dans le plasma. Le PCI est une glycoprotéine constituée d'une chaîne polypeptidique de 387 acides aminés dont le poids moléculaire est de 57000 Da. Il appartient à la famille des serpines et son site actif est situé au niveau des résidus Arg 354 et Ser 355 [146]. Synthétisé principalement dans le foie, le PCI est présent, dans le plasma à une concentration de 3,6 à 6,8 $\mu\text{g/mL}$ [146, 147] et dans les granules α des plaquettes, cependant les deux molécules (plasmatiques et plaquettaires) ont des activités différentes. Ainsi, l'activité du PCI contenu dans les granules α est cinq fois plus importante que l'activité du PCI plasmatique [148]. De plus, une partie seulement du PCI plaquettaire (30 %) est libérée lors de l'activation des plaquettes [148, 149].

Le PCI forme un complexe stoechiométrique avec la PCa [150]. Les deux molécules possédant des sites de liaison aux glycosaminoglycanes, la formation des complexes PCa/PCI est facilitée par l'héparine ou les sulfates de dextran. En présence d'héparine ou de sulfates de dextran, l'inhibition de la PCa par le PCI est accélérée de 20 à 200 fois [151, 152].

L'inhibition de la PCa par le PCI dépend également de la présence de phosphatidyléthanolamine au niveau des surfaces [149]. Le PCI se lierait de façon préférentielle au niveau de la phosphatidyléthanolamine de la membrane plaquettaire et des microvésicules [149]. Outre la PCa qui est la molécule inhibée principalement, le PCI peut inhiber d'autres protéases comme le FXa et la thrombine mais également le FXIa.

2.2.3 Méthode d'évaluation intégrative de la coagulation : la thrombinographie

2.2.3.1 Principe

La détection des anomalies de la coagulation s'articule autour de trois tests classiques d'explorations biologiques : le temps de quick (TQ), le temps de thrombine (TT) et le temps de céphaline en présence d'activateur (TCA). L'allongement d'un ou de plusieurs de ces tests oriente vers une étude analytique des différents facteurs de la coagulation.

Le TQ est le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté, recalcifié en présence d'un excès de FT et de phospholipides procoagulants (thromboplastine). Il explore les facteurs de

la voie exogène (FVII) et ceux de la voie commune (FX, FV, FII et fibrinogène). Il permet d'explorer les facteurs de la coagulation dits vitamine K dépendants. En pratique, il permet de juger et d'adapter le traitement anticoagulant par des anti-vitamine K.

Le TCA est le temps de coagulation à 37°C d'un plasma recalcifié en présence de phospholipides comme substituts des plaquettes sanguines apportés à une concentration optimale (céphaline dont la concentration, la source et la nature chimique varient selon le réactif commercial), après activation complète du système contact de la coagulation par un activateur (célite, kaolin ou silice). Il permet d'explorer les facteurs de la voie endogène de la coagulation (prékallicréine, kininogène de haut poids moléculaires ainsi que les FXII, FXI, FIX, FVIII) et ceux de la voie commune (FX, FV, FII et fibrinogène).

Le TT est le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté en présence d'une quantité définie de thrombine calcique. Il permet d'explorer la fibrinoformation. Le TT n'explore pas le FXIII.

Les concepts et outils actuels permettant d'explorer la coagulation *in vitro* connaissent des limites liées au caractère fragmentaire des tests classiques de biologie clinique. Il est ainsi très difficile de déduire la résultante de plusieurs paramètres appréhendés individuellement. De plus, ces paramètres peuvent avoir des fonctions opposées à savoir des effets pro- et anticoagulants. Le paradoxe bien connu des anticorps anti-phospholipides l'illustre parfaitement. Les anticorps anti-phospholipides induisent une prolongation des temps de coagulation réalisés avec des lipides et des activateurs artificiels *in vitro* alors qu'ils prédisposent à la thrombose *in vivo*.

La thrombinographie consiste en l'enregistrement du travail de la thrombine au cours de la coagulation *in vitro* de plasma en présence de plaquettes, par fluorescence « in situ » [6] en réponse à un stimulus approprié et calibré. La thrombinographie permet donc une approche pertinente d'influences multiples (génétiques ou non) sur le phénotype biologique du système hémostatique, au-delà du seul temps de coagulation. Ainsi, plus de 90 % de la thrombine est formée après la gélification détectable du sang et les systèmes inhibiteurs stoechiométriques (antithrombine, TFPI) et dynamique (PCa) agissent largement au-delà de cette gélification du sang [153, 154]. Il est possible, avec la thrombinographie, d'explorer sur l'ensemble du travail enzymatique de la thrombine, l'ensemble des systèmes inhibiteurs [7, 155]. Ce phénotypage du système hémostatique est intégratif puisqu'il est la résultante de paramètres individuels et prend en compte les systèmes inhibiteurs physiologiques. L'étude du système régulateur dynamique de la PC repose traditionnellement sur une mesure de l'allongement des temps de

coagulation, principalement le TCA, en présence de PCa. De même, en utilisant un temps de quick modifié, le TFPI peut être exploré par ajout d'un anticorps anti-TFPI dans le système. La participation endothéliale sur l'inhibition de la génération de thrombine n'est pas prise en compte dans les conditions expérimentales utilisées en thrombinographie. L'addition de PCa ou de TM en thrombinographie permet d'étudier respectivement l'influence de PCa exogène ou endogène sur l'activité thrombinique. La PCa, protéine plasmatique peut être préparée de façon reproductible par une méthode d'immunopurification et d'activation en un temps [156]. La purification de la TM est plus difficile du fait que c'est une protéine transmembranaire. Elle peut être ajoutée sous forme tronquée soluble ou sous forme complète avec insertion dans une bicouche phospholipidique.

En thrombinographie, la coagulation du plasma étudié est déclenchée par la voie dite « exogène » par recalcification en présence de FT recombinant humain. Le FT est ajouté à faibles concentrations, de l'ordre du picomolaire, de sorte que les facteurs anti-hémophiliques d'une part et le FXI d'autre part soient pris en compte. De plus, dans les conditions optimales utilisées au laboratoire, la génération explosive de thrombine par la phase contact survient 10 min environ après l'inhibition totale de la génération de thrombine par la voie du FT [7]. Les plaquettes sont ainsi activées par les premières molécules de thrombine avant extinction par le TFPI [153].

La cinétique de génération de thrombine enregistrée est appelée thrombinogramme (**Figure 26**) et se découpe schématiquement en trois phases :

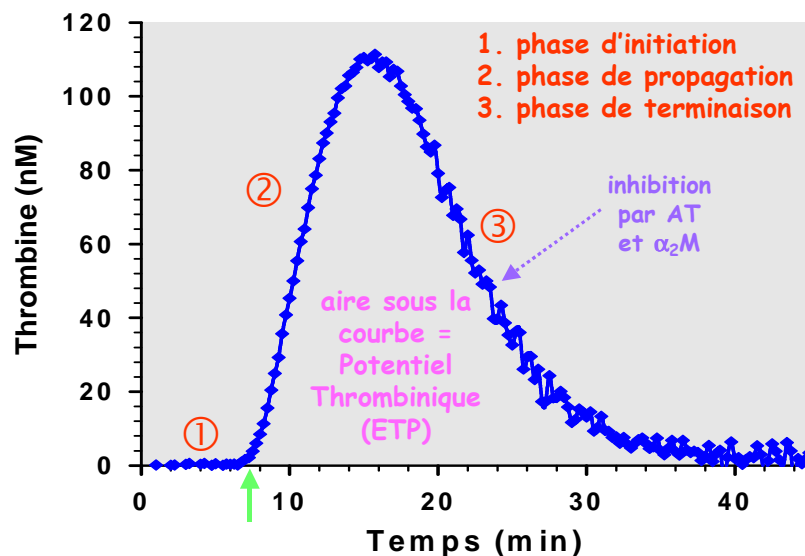


Figure 26 : Thrombinogramme typique obtenu en présence d'un plasma riche en plaquettes.

La flèche verte représente le temps mesuré par les tests de coagulation classiques en présence d'une faible quantité de FT. AT = antithrombine, α_2M = α_2 -macroglobuline.

La phase d'initiation correspond au phénomène mesuré par les différents temps de coagulation. Cependant la concentration en FT utilisé dans les tests classiques est en large excès, donc non physiologique, en comparaison avec la thombinographie où la concentration en FT est de l'ordre du picomolaire [157]. La phase de propagation correspond à la génération explosive de thrombine. Dès que la thrombine apparaît, elle est inhibée par l'antithrombine présente dans le plasma, et ce même pendant la phase d'initiation. La vitesse d'inactivation de la thrombine augmente proportionnellement avec sa concentration. Au pic de thrombine, la génération et l'inhibition de la thrombine sont identiques [157]. La phase de terminaison correspond à l'inhibition de la thrombine générée. Après le pic l'inactivation de la thrombine prend le dessus sur la génération de thrombine [157]. Cette inhibition est principalement due à l'action de l'antithrombine. Elle correspond à une réaction de pseudo 1^{er} ordre car l'antithrombine n'est pas le seul inhibiteur de la thrombine présent mais il est néanmoins le plus concentré dans le plasma.

Le thrombinogramme est la dérivée première de la mesure du signal de fluorescence résultant de l'activité de la thrombine sur un substrat fluorigène [6] après soustraction de la part de signal du complexe thrombine/ α_2 -macroglobuline.

Plusieurs paramètres sont donnés par le thrombinogramme (**Figure 27**) :

- Le temps de latence de génération de thrombine ; il correspond à la durée de la phase d'initiation (min).
- Le pic qui exprime la quantité maximale de thrombine formée (nM).
- Le temps pour atteindre le pic qui donne le temps écoulé au moment du pic de génération de thrombine (min).

Plusieurs paramètres peuvent être déduits (**Figure 27**) du thrombinogramme :

- La pente maximale de génération de thrombine (nM/min)
- Le **potentiel thrombinique (ETP** pour endogenous thrombin potential en anglais). Il est calculé comme l'aire sous la courbe de la concentration de thrombine en fonction du temps par le logiciel Thrombinoscope[®] [6]. L'ETP est le paramètre principal en thombinographie, il représente la quantité totale de travail enzymatique que la thrombine est capable d'accomplir. Il est exprimé en nM.min. En absence de PCa, il est nommé ETP₀.

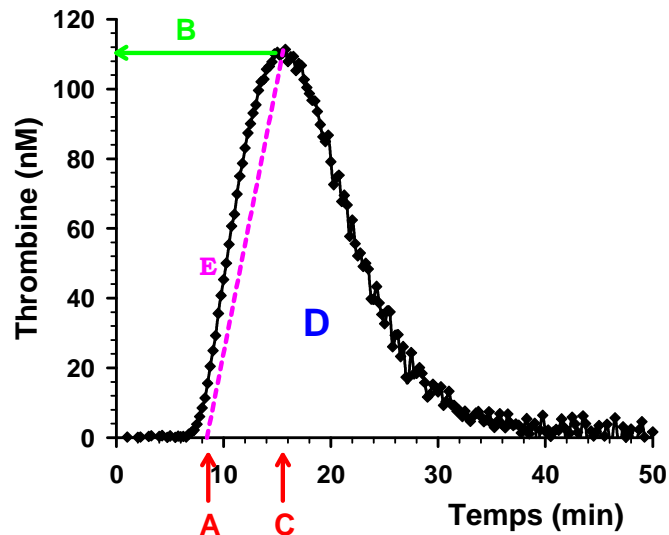


Figure 27 : Paramètres du thrombinogramme.

(A) Phase d'initiation (min), (B) Concentration maximale en thrombine (nM), (C) Temps pour atteindre la concentration en thrombine maximale (min) (D) Potentiel endogène de thrombine (ETP) (nM.min), (E) Pente maximale de génération de thrombine (nM/min) [7].

Pour prendre en compte le système de la PCa, nous avons proposé un paramètre quantitatif continu : l'**IC₅₀-PCa**. Ce dernier paramètre est déduit du thrombinogramme à partir d'une gamme de concentration en PCa. L'**IC₅₀-PCa** rend compte de la concentration en PCa induisant une réduction de 50 % de l'ETP (**Figure 28**). Cette valeur peut être considérée comme un bon indicateur de la sensibilité globale à la PCa. Nous aurions pu choisir une seule concentration en PCa, comme dans la très grande majorité des tests actuels pour rendre compte de cette sensibilité mais cela aurait été arbitraire.

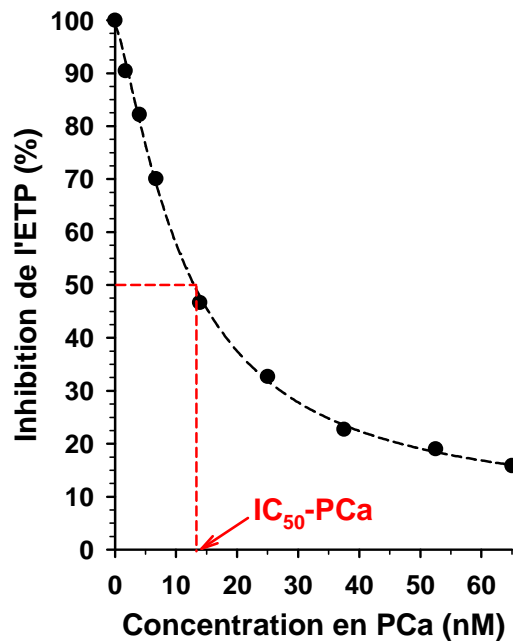


Figure 28 : Détermination de la concentration en PCa induisant une réduction de 50 % de l'ETP : IC₅₀-PCa [7].

2.2.3.2 Cohérence phénotype biologique et clinique

L'implantation d'un test de biologie clinique comporte plusieurs étapes [158, 159]. Plusieurs publications soulignent d'ores et déjà les performances du suivi de la génération de thrombine dans diverses situations pathologiques. La corrélation entre phénotype *in vitro* et phénotype clinique est une étape essentielle à l'implantation d'un nouveau test de biologie.

Nous avons montré au laboratoire qu'il existe une bonne cohérence entre ces deux phénotypes dans des situations pathologiques caractéristiques prédisposant soit à la thrombose soit au saignement (**Figure 29**).

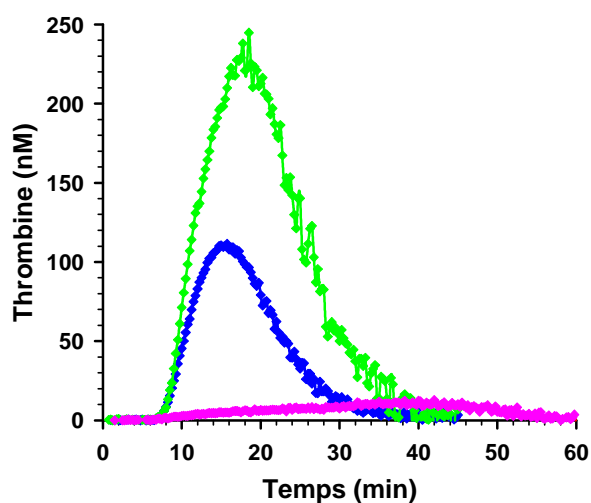


Figure 29 : Exemples de thrombinogrammes de patients.

PRP d'un volontaire sain (bleu), PRP d'un patient ayant une concentration plasmatique en antithrombine de 62 % (vert) due à un déficit constitutionnel de type I et PRP d'un hémophile A avec une concentration en FVIII < 1 % (rose).

Comme attendu, les courbes de génération de thrombine montrent un ETP élevé pour un patient ayant un déficit en antithrombine et très faible pour un hémophile, par rapport au sujet sain.

Dans la littérature, des repères ont été obtenus pour des désordres hémorragiques constitutionnels tels que l'hémophilie [160-164] ou d'autres déficits constitutionnels en facteur de la coagulation [165, 166] ainsi que pour diverses thrombopathies [167, 168]. L'apport possible de la thrombinographie pour les principales thrombophilies constitutionnelles a été établie par plusieurs équipes [169-172].

Sur le plan thérapeutique, des études mettent en évidence les performances d'un tel phénotypage pour étudier l'effet des traitements dans la perspective d'une surveillance biologique pertinente de ces traitements. Ainsi, une augmentation variable de la génération de thrombine liée à une résistance acquise à la PCa est décrite en fonction du type de contraceptifs oraux prescrits [173-175]. De plus, la thrombinographie s'est révélée être un bon

candidat pour mettre en évidence l'effet anticoagulant des héparines ou des inhibiteurs directs de la thrombine [176-178] et l'effet hémostatique du FVIIa recombinant [179].

Les inhibiteurs plaquettaires ont été largement étudiés [180-184] y compris en thrombinographie où leurs effets ont été suivis sur toute la durée du travail thrombinique [185, 186]. Vanschoonbeek *et al* [186] ont ainsi rapporté des différences d'effets entre les différents inhibiteurs plaquettaires sur les paramètres du thrombinogramme. Ainsi, un effet anticoagulant limité a été observé pour ASA (faible diminution du pic de thrombine conduisant à un ETP peu modifié). Les agents qui augmentent l'AMPc, à savoir les prostaglandines (PGE1 et iloprost) et les inhibiteurs des phosphodiesterases, induisent un allongement de la phase d'initiation de thrombine et du temps pour atteindre le pic et diminuent considérablement les valeurs d'ETP et de pic de thrombine. Concernant les inhibiteurs de GpIIb/IIIa, ils ont observé que l'abciximab diminuait fortement le pic de thrombine mais n'avait que peu d'effet sur l'ETP. Des résultats similaires mais avec un effet moindre que celui observé pour abciximab ont également été obtenus avec les antagonistes des récepteurs P2Y12.

2.3 Les anticorps anti-phospholipides

2.3.1 Définition

Les anticorps anti-phospholipides (aPL) représentent un groupe hétérogène d'anticorps présents dans le plasma de patients atteints de lupus érythémateux disséminé, d'autres maladies auto-immunes, d'infections virales associées à la prise de médicaments et aussi en dehors de toute maladie sous-jacente.

A l'origine, il a été proposé que les aPL étaient dirigés contre les phospholipides chargés négativement comme le cardiolipide (aCL « vrais ») [187]. Dans les années 1990, il est apparu que les aPL n'étaient pas dirigés contre les phospholipides anioniques mais contre des protéines plasmatiques se liant aux phospholipides anioniques. La β_2 -glycoprotéine I (β_2 GPI) et le FII sont les deux cibles principales des aPL [1, 3]. Les aPL sont traditionnellement classés en deux groupes [1, 3] en accord avec leurs méthodes de détection [188, 189] :

- (1) Les anticorps détectés par méthode ELISA : anticorps anti-cardiolipide (aCL) qui se lient à du cardiolipide immobilisé
- (2) Les anticorps qui prolongent les tests de coagulation : anticorps de type lupique (LA pour lupus anticoagulant)

Les anticorps détectés par ces tests sont présents dans le plasma des patients à des concentrations très variables [190]. Leur spécificité qui a donné lieu à de nombreuses études est résumée dans le **Tableau VII**.

ELISA anticardiolipide
Anti- β_2 -glycoprotéine I
Anti-cardiolipide
Anticorps dirigés contre d'autres protéines se liant au cardiolipide
Test LA
Anti-FII
Anti- β_2 GPI
Anti-FV
Anti-FX
Anti-phospholipide

Tableau VII : Anticorps détectés dans les tests aPL conventionnels [3].

L'association des aPL à des manifestations cliniques essentiellement de type thrombotique (veineuses et/ou artérielles), des pertes fœtales récurrentes ou des thrombopénies définit le syndrome des anti-phospholipides (SAPL) [1, 3]. En novembre 2004, une réunion internationale de consensus [188] a proposé une évolution des critères préliminaires de classification du syndrome des anti-phospholipides établis en 1998 à Sapporo [191] (**Tableau VIII**). Il a ainsi été proposé pour les critères biologiques d'augmenter l'intervalle de temps de 6 à 12 semaines pour la persistance de positivité des tests. L'augmentation de l'intervalle entre les deux tests permet d'assurer que les aPL détectés prédisposent bien au SAPL. De plus, un critère complémentaire consistant à rechercher la présence d'anticorps anti- β_2 GPI d'isotype IgG et/ou IgM dans le sérum ou le plasma, par un test ELISA standardisé, a été ajouté. Dans cette approche l'antigène immobilisé sur la plaque ELISA est un des véritables antigènes des anticorps dits « anti-cardiolipide », la β_2 GPI [189]. Cette approche se heurte à des problèmes de mise au point délicate et de standardisation plus difficile que prévues [192, 193].

Tableau VIII : Critères de classification révisés du syndrome des anti-phospholipides (critères de Sydney) [189].

Présence d'un syndrome des anticorps anti-phospholipides (SAPL) si l'un au moins des critères cliniques et l'un au moins des critères biologiques sont mis en évidence :

Critères cliniques

1. *Thrombose*

Un ou plusieurs épisodes symptomatiques de thrombose artérielle, veineuse ou d'un petit vaisseau dans n'importe quel tissu ou organe. Cette thrombose doit être objectivée par une stratégie diagnostique validée (c'est-à-dire confirmée par un aspect caractéristique d'un examen d'imagerie de référence ou d'un examen histopathologique). Dans cette dernière situation, il doit s'agir d'une thrombose sans inflammation significative de la paroi vasculaire.

2. *Manifestations obstétricales*

(a) Une ou plusieurs morts inexpliquées, fœtus morphologiquement normal, à la 10^{ème} semaine de gestation ou au-delà (morphologie normale établie par échographie ou examen direct),

ou

(b) Une ou plusieurs naissances prématurées d'un nouveau-né morphologiquement normal avant la 34^{ème} semaine de gestation à cause
(i) d'une éclampsie ou d'une pré-éclampsie grave
ou
(ii) de signes reconnus d'insuffisance placentaire

ou

(c) Au moins 3 avortements spontanés consécutifs avant la 10^{ème} semaine de gestation sans cause anatomique ou hormonale maternelle et sans cause chromosomique maternelle ou paternelle

Critères biologiques

1. *Présence d'un anticoagulant circulant* ("lupus anticoagulant" – LA), à 2 reprises au moins, espacées de 12 semaines au moins, mis en évidence en suivant les recommandations de l'International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH).

2. *Anticorps anti-cardiolipides* (aCL) d'isotype IgG et/ou IgM dans le sérum ou le plasma, avec un titre moyen ou élevé (> 40 GPL ou MPL, ou > 99^{ème} percentile), présents à 2 reprises au moins avec des mesures espacées de 12 semaines ou plus, par ELISA standardisé.

3. *Anticorps anti- β_2 glycoprotéine-I* d'isotype IgG et/ou IgM dans le sérum ou le plasma, avec un titre moyen ou élevé (> 40 GPL ou MPL, ou > 99^{ème} percentile), présents à 2 reprises au moins avec des mesures espacées de 12 semaines ou plus, par ELISA standardisé.

2.3.2 Les cibles

Si la β_2 GPI et le FII sont les antigènes majeurs des aPL, d'autres cibles protéiques se liant aux phospholipides ont été décrites [2, 3]. Ainsi, il a été rapporté de façon non exhaustive, une liaison des aPL à la PS [190, 194, 195], à la PC [2, 194], à la thrombine [2, 3], à l'EPCR [196, 197], au TFPI [198-200] et à l'annexine V [190] et II [201]. Des anticorps également dirigés contre le plasminogène, la plasmine [202, 203] ou encore l'activateur tissulaire du plasminogène [204] ont été décrits. Des anticorps reconnaissant un assemblage entre phospholipides et la C₄BP, la thrombine-antithrombine modifiée ainsi que des LPB ont également été rapportés [205].

2.3.2.1 La β_2 -glycoprotéine I

En 1990, trois groupes ont rapporté indépendamment que les anticorps anti-cardiolipides ne se liaient pas au cardiolipide en absence de sérum ou de plasma [206-208] mais à une protéine la β_2 GPI.

□ Structure et fonction

La β_2 GPI (**Figure 30**), également appelée apolipoprotéine H, est une glycoprotéine plasmatique décrite pour la première fois en 1961 par Schultze *et al* [209]. Elle est synthétisée principalement dans le foie mais également dans les cellules endothéliales et placentaires. De masse moléculaire de 54000 Da, sa concentration plasmatique est de 4 μ M (200 μ g/mL) dont 40 % se trouve sous forme liée aux lipoprotéines [210]. La β_2 GPI est constituée d'une chaîne polypeptidique de 326 acides aminés, contenant de nombreux résidus proline et cystéine, et fortement glycosylée [211]. Elle est répartie en cinq domaines homologues (I à V) appelés domaine 'sushi' ou CCP (control complement protein). Les quatre premiers domaines sont constitués de 60 acides aminés dont quatre cystéines chacun. Des ponts disulfures joignent les domaines I à III et le domaine II au domaine IV pour former une structure « looped-back ». De plus, les domaines III et IV possèdent trois et un sites n-glycosylé respectivement [212]. Le domaine V comprend une extension au niveau C-terminal riche en lysine et comporte une région critique entre la cystéine 281 et la cystéine 288 pour la liaison aux surfaces chargées négativement [213, 214] comme les vésicules phospholipidiques anioniques, les plaquettes et les microvésicules. De plus, une boucle flexible, située au milieu de cette zone chargée positivement, constituée des résidus Serine 311 – Lysine 317 et comprenant un tryptophane en position 316 est essentielle pour la liaison aux phospholipides [215]. Ainsi, de part sa

liaison aux phospholipides anioniques par son domaine V, elle est l'un des antigènes majeurs des aPL.

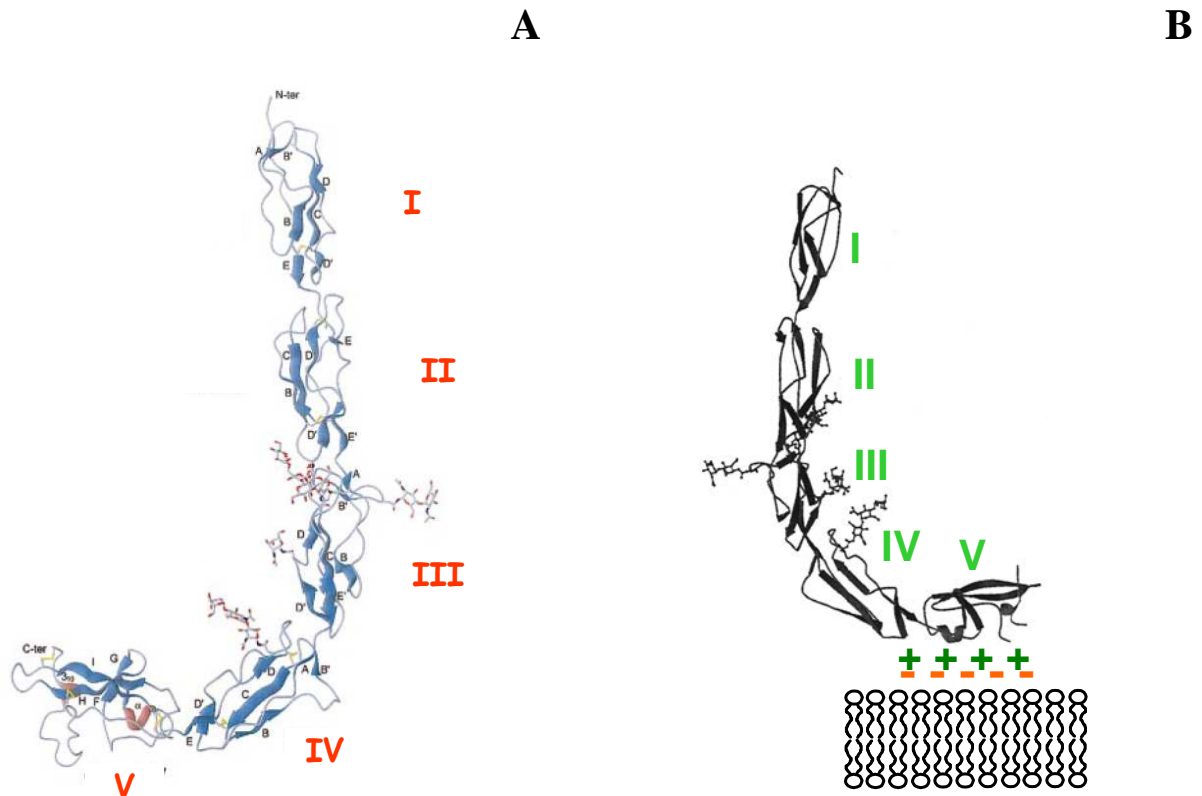


Figure 30 : Représentations structurales de la β_2 GPI.

- (A) Les feuillets β sont en bleu et les hélices α en rouge. Les ponts disulfures sont en jaune. Les domaines de glycosylation sont représentés sous forme d'atomes [216]
 (B) Liaison de la β_2 GPI au niveau des phospholipides anioniques [212].

La β_2 GPI peut être clivée de façon protéolytique au niveau du domaine V entre les résidus Lys 317 et Thr 318 par la plasmine et moins efficacement par le FXa [217, 218]. En présence d'héparine, la protéolyse par la plasmine est augmentée par la liaison de l'héparine au niveau de la région riche en lysine [219]. Cette forme clivée appelée « nicked β_2 GPI » devient incapable de se lier aux phospholipides anioniques [217] et ne peut donc plus être l'antigène des aPL [220]. Par contre, cette forme, trouvée dans le plasma de patients avec LA, inhibe la génération de plasmine par l'activateur tissulaire du plasminogène [221].

In vitro, la β_2 GPI interagit avec des composants de la cascade de coagulation aboutissant à des effets pro- et anticoagulants.

La β_2 GPI a été décrite comme une protéine anticoagulante qui régule la formation de thrombine. Il a été décrit que la β_2 GPI inhibe l'agrégation plaquettaire par l'ADP [222]. Elle interfère avec la voie intrinsèque de la coagulation [223]. Elle régule également la formation

Bien que ces données soient en faveur d'un effet anticoagulant de la protéine, une déficience hétérozygote ou homozygote n'est pas clairement associée à une augmentation du risque de thrombose [230]. Une étude réalisée avec des souris KO pour la β_2 GPI a montré une inhibition de la génération de thrombine *in vitro* en présence de plasma de ces souris. Chez les souris hétérozygotes, la génération de thrombine n'est pas aussi altérée que chez les souris KO. Cela suggère une corrélation entre la génération de thrombine et le taux de β_2 GPI [231]. La β_2 GPI a été décrite comme ayant un effet pro-coagulant. Il a ainsi été rapporté un effet inhibiteur de la β_2 GPI sur l'activation de la protéine C en présence de phospholipides [232] ainsi que sur l'activité de la PCa pour l'inhibition du FVa [233].

Si ses rôles *in vitro* sont bien décrits, *in vivo* cependant ils restent encore obscurs.

□ Avidité de la protéine pour les phospholipides

La β_2 GPI se lie aux phospholipides anioniques [234] ainsi que sur d'autres surfaces chargées négativement telles l'héparine [235] ou le sulfate de dextran [236]. L'affinité de la β_2 GPI pour les phospholipides est bien décrite mais la plupart du temps sur des surfaces phospholipidiques anioniques non physiologiques. En condition physiologique, il est cependant clairement établi que la β_2 GPI possède une faible affinité pour les phospholipides anioniques comparée aux facteurs de la coagulation [237-240] (**Tableau IX**).

	Phospholipides anioniques	NaCl (mM)	Calcium (mM)	K_D (μM)
Harper <i>et al</i> [240]	5 à 20 mole%	150	-	5 à 0,5
	20 mole%	150	3	7
Willem <i>et al</i> [239]	10 à 20 mole%	120	3	14 à 4
Brighton <i>et al</i> Long <i>et al</i> [241, 242]	Plaquettes lavées	-	-	Absence de liaison
Nimpf <i>et al</i> Schouboe <i>et al</i> [222, 243]	Plaquettes lavées	-	-	1 à 0,5
Bevers <i>et al</i> [244]	Plaquettes	-	-	0,2
	lavées	120	3	80
Vallar <i>et al</i> [245]	MVP	150	3	0,17

Tableau IX : Avidité de la β_2 GPI pour les phospholipides.

Cette affinité est très fortement dépendante de la quantité en phospholipides anioniques, de la force ionique ainsi que de la concentration en calcium [239, 240]. Les valeurs de K_D sont inversement liées au contenu en phospholipides anioniques cependant cette relation est faible comparée aux facteurs de la coagulation se liant aux phospholipides anioniques. Harper *et al* [240] ont rapporté que l'augmentation de la concentration en phosphatidylsérine de 5 à 20 % était associée à une affinité doublée alors qu'elle est multipliée par 10 pour le FII et le FX [246].

Enfin, une diminution de la liaison de la β_2 GPI en présence de calcium a été largement rapportée [222, 234, 239, 240].

2.3.2.2 La prothrombine

□ Structure et fonction

Le FII est une glycoprotéine dont la concentration plasmatique est d'environ 1,5 μ M. De masse moléculaire 72000 Da, le FII est constitué d'une chaîne polypeptidique de 579 acides aminés. La partie N-terminale de la protéine comporte un domaine γ -carboxyglutamique par lequel il se lie aux phospholipides anioniques en présence de calcium. Le domaine sérine protéase est situé au niveau carboxy-terminal de la protéine. Le FII contient deux sites de clivage pour le FXa localisés en position 271 et 320 qui permettent la formation de l' α -thrombine et deux sites pour la thrombine localisés en position 155 et 284 produisant deux fragments F1 et F2 ainsi qu'un petit fragment N-terminal de la chaîne A (**Figure 32**) [247]. Le FII est activé par le FXa (complexe prothrombinase plus exactement) dans un premier temps puis par la thrombine lorsque cette dernière est synthétisée.

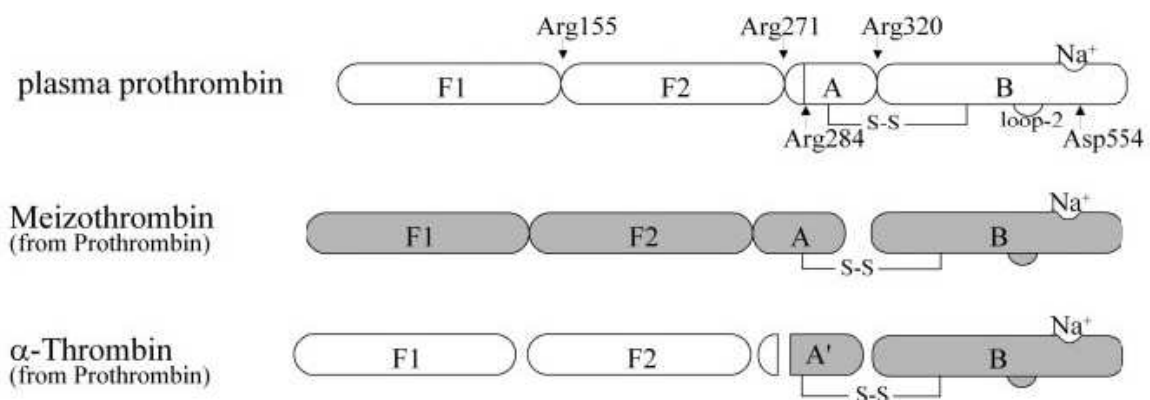


Figure 32 : Représentation schématique du FII et de ses produits d'activation [247].

□ Avidité de la protéine pour les phospholipides

Contrairement à la β_2 GPI, le FII nécessite la présence de calcium pour se lier aux phospholipides. De plus, l'affinité de la protéine dépend fortement de la quantité de surface phospholipidique anionique présente dans la membrane.

Plusieurs études ont été réalisées en présence de surfaces phospholipidiques non physiologiques. Des K_D variant de 0,1 à 10 μ M ont été rapportées pour des quantités de phospholipides anioniques variant de 8 à 65 mole% [246]. D'autres auteurs ont rapporté des valeurs de K_D comprises entre 0,08 et 0,5 μ M pour des surfaces composées de 20 à 25 mole% en phosphatidylsérine [248, 249]. La liaison du FII (K_D de l'ordre de 0,07 μ M) a également été déterminée en SPR sur des vésicules composées de 25% de phosphatidylsérine et 75% de phosphatidylcholine [250].

La liaison du FII sur des surfaces membranaires physiologiques a été moins bien caractérisée. Une étude réalisée par Scandura *et al* [251] a montré une fixation du FII sur des plaquettes activées avec un K_D de l'ordre de 0,5 μ M mais pas de fixation sur des plaquettes non activées.

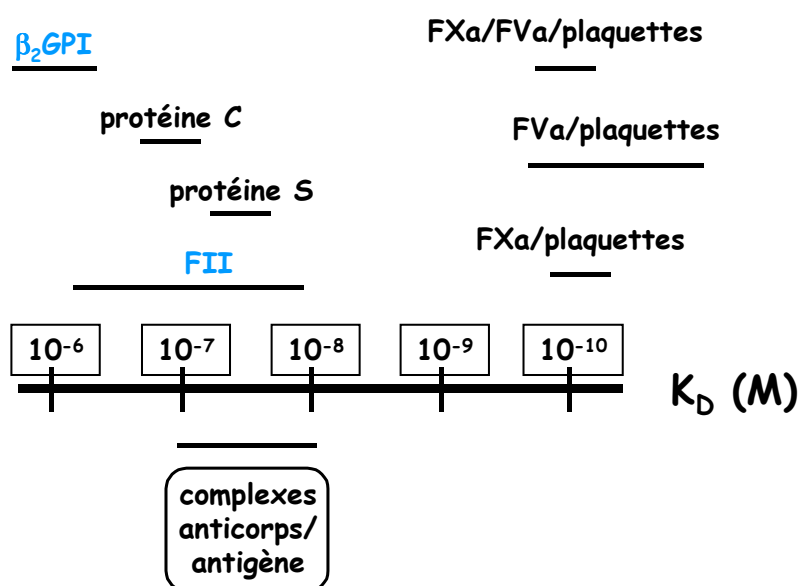


Figure 33 : Comparaison de l'affinité pour les membranes phospholipidiques de la β_2 GPI, du FII et de facteurs de la coagulation.

2.3.3 Les anticorps détectés par méthode ELISA : aCL

Le revêtement utilisé dans ces tests est du cardiolipide qui s'adsorbe au plastique d'une microplaque. Les anticorps qui sont détectés par cette méthode immunoenzymatique (ELISA) avec comme antigène du cardiolipide immobilisé sont principalement appelés aCL [3]. Les conditions expérimentales de ce test permettent d'apporter l'un des véritables antigènes des aCL, la β_2 GPI par différentes solutions utilisées tout au long de la réalisation du test (β_2 GPI

bovine contenue dans le tampon de saturation et le tampon de dilution) mais également par le sérum du patient (une dilution au 100^{ème} du sérum induit la présence de 2 µg/mL de β₂GPI dans le système). Dans ces conditions expérimentales, l'antigène se lie au cardiolipide. L'ELISA aCL ne détecte pas les anticorps dirigés contre le FII [189] ni contre les autres protéines associées au SAPL. L'absence de détection de ces anticorps peut s'expliquer par leur faible concentration dans le sérum du patient et dans le sérum bovin ainsi que par la faible concentration en calcium dans le système. La détection de ces anticorps peut être réalisée avec d'autres types d'ELISA où les différentes cibles protéiques sont immobilisées.

2.3.3.1 Les anticorps anti-cardiolipide

Les anticorps se liant directement au cardiolipide en absence de protéines sériques sont détectés par ce test, cependant leur liaison a été décrite comme inhibée par la présence de β₂GPI par compétition avec les phospholipides [252]. Cependant les aCL « vrais » n'apparaissent pas comme fortement associés aux manifestations thrombotiques du SAPL mais plutôt à la syphilis ou aux autres maladies infectieuses [253].

2.3.3.2 Les anticorps anti-β₂GPI

La plupart des études présentent la β₂GPI comme l'antigène majeur des aCL [206, 207, 254, 255]. Cependant, de nombreux désaccords concernant la liaison des anticorps anti-β₂GPI à la protéine persistent. La nature exacte des épitopes reconnus par les anticorps est sujette à controverse et plusieurs cibles antigéniques non mutuellement exclusives sont rapportées :

- (1) Les anticorps reconnaîtraient un épitope exprimé sur la **protéine native** [256-258].
- (2) Les anticorps reconnaîtraient un épitope cryptique qui serait accessible seulement lors d'un changement de conformation de la β₂GPI survenant au moment de la liaison de la protéine sur les phospholipides anioniques ou sur une surface polystyrène irradiée [207, 259-264].

Il a été décrit des anticorps anti-β₂GPI dirigés contre tous les domaines de la β₂GPI [214, 265-270]. Cependant, des études utilisant des anticorps anti-β₂GPI purifiés de patients ont montré que la majorité des anticorps anti-β₂GPI se lient préférentiellement au niveau du domaine I de la protéine [267-269, 271]. De plus, Iverson *et al* [267], ont rapporté une région épitopique spécifique pour les aPL située sur le domaine I de la protéine au niveau des résidus 40-43 [266]. Les anticorps dirigés contre cette région épitopique seraient impliqués dans les phénomènes de thrombose [272]. En plus de cette région 40-43, Ioannou *et al* [271] ont

montré que la liaison des anticorps incluait l'acide aminé en position 39. D'autres auteurs ont montré que le domaine IV pourrait avoir un rôle critique dans l'exposition de l'épitope cryptique [273, 274]. Une étude de Lin *et al* [275] a également montré que certains aCL reconnaîtraient un ou plusieurs épitopes conformationnels présents sur la β_2 GPI et dans les domaines catalytiques de plusieurs protéases à sérine.

Les anticorps anti- β_2 GPI sont considérés comme possédant une faible avidité pour les phospholipides anioniques [256-258, 276-278]. Il a été rapporté par Regnault *et al* [278] une liaison monovalente de faible avidité d'anticorps anti- β_2 GPI sur de la β_2 GPI immobilisée en condition de flux par SPR. Tincani *et al* [258] ont mesuré des valeurs de K_D comprises entre 3,4 et 7,2 μ M pour des anticorps polyclonaux humains anti- β_2 GPI. Ils ont également montré que cette avidité augmentait de façon significative lorsque la β_2 GPI était liée à un support solide [258]. Arvieux *et al* [276] eux, ont rapporté une liaison de forte avidité d'anticorps anti- β_2 GPI en phase fluide pour des patients atteints de lèpre mais pas pour ceux ayant un SAPL. Néanmoins, une avidité élevée des anticorps anti- β_2 GPI a été observée chez des patients ayant un SAPL [279, 280]. De plus, une hétérogénéité dans la reconnaissance de l'antigène, des anticorps anti- β_2 GPI chez des patients atteints de SAPL a été rapportée [281, 282].

La liaison d'anticorps anti- β_2 GPI augmente l'affinité de la protéine pour les phospholipides [244, 283]. Une augmentation d'un facteur 100 à 1000 a été décrite [239, 244, 284]. Pour que la liaison anticorps/antigène ait un retentissement sur la fonction de l'antigène, les anticorps anti- β_2 GPI formeraient avec la β_2 GPI des complexes bivalents ($(\beta_2\text{GPI})_2\text{-aPL}$) qui augmenteraient l'avidité pour les surfaces phospholipidiques [239, 256, 257, 283, 284]. De plus, il est communément admis que les complexes bivalents interfèrent au niveau des surfaces avec les facteurs de la coagulation plus que la protéine seule.

2.3.3.3 Les anticorps détectés par les tests de coagulation

Ces anticorps de type lupique (LA) ont été décrits en premier chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé. Ils prolongent les temps usuels de coagulation *in vitro* [51]. Cette activité anticoagulante est accentuée par de faibles concentrations en phospholipides et est abolie par l'addition d'un excès de phospholipides anioniques.

Certains LA de faible intensité ne sont détectés que par un seul test de coagulation et il n'existe pas actuellement de test capable de détecter la totalité des LA. Ainsi il est recommandé d'utiliser pour leur détection une combinaison de test de coagulation explorant

des étapes différentes de la coagulation. Le temps de céphaline avec activateur explorant la voie endogène et le test explorant la voie commune où la coagulation est déclenchée par le venin de vipère Russell (dRVVT) [189] est une combinaison possible.

D'autres tests de coagulation peuvent également être utilisés comme le temps de thromboplastine partiellement activé (APTT) ou bien le temps de coagulation avec kaolin (KCT). Le TQ est très peu sensible aux LA et ne sera allongé de façon significative qu'en présence de LA très puissants et s'il existe une hypoprothrombinémie associée. L'absence d'augmentation est due à la présence de phospholipides en excès dans le test qui neutralise l'effet LA. L'utilisation de tests comportant une faible quantité de phospholipides est donc cruciale pour la détection des LA [285].

L'effet LA peut être observé avec des anticorps dirigés contre le FII et la β_2 GPI [255, 286-288] et la plupart des patients avec des LA possèdent les deux types d'anticorps [289]. Néanmoins, tandis que plusieurs protéines ont été proposées comme cible de ces anticorps (**Tableau VII**), un intérêt majeur a été porté au FII comme antigène préférentiel avec un rôle similaire à la β_2 GPI pour les aCL [286].

De manière analogue aux anticorps anti- β_2 GPI, plusieurs cibles antigéniques non mutuellement exclusives sur le FII sont rapportées :

- (1) Les anticorps reconnaîtraient un épitope exprimé sur la **protéine native** [288, 290, 291]
- (2) Les anticorps reconnaîtraient un épitope cryptique sur le FII qui serait accessible seulement après un changement conformationnel de la protéine survenant à la suite de la fixation du FII sur les surfaces phospholipidiques anioniques [292]

La spécificité épitopique des anticorps anti-FII n'est pas encore clairement établie. Néanmoins, des liaisons au niveau de la pré-prothrombine 1, du fragment 1+2 et du fragment 1 ont été rapportées [293-295].

Le FII possède une affinité pour les phospholipides qui est fortement augmentée en présence d'anticorps anti-FII. Field *et al* [296] ont rapporté une augmentation de la liaison du FII sur des vésicules phospholipidiques et ce de façon concentration dépendante. De même, Rao *et al* [295] ont observé une augmentation de l'affinité du FII pour des phospholipides immobilisés

et des cellules HUVEC en présence d'IgG LA. De même que pour les anticorps anti- β_2 GPI, les anticorps anti-FII formeraient des complexes bivalents qui augmenteraient l'avidité de la protéine pour les surfaces phospholipidiques [297, 298].

2.3.4 Les mécanismes d'action des anticorps

Bien que l'association entre les aPL et les événements thromboemboliques soit établie [299], les mécanismes d'action des anticorps restent encore peu clairs. Du fait de l'hétérogénéité des cibles protéiques reconnues par les aPL ainsi que des rôles physiologiques variables des antigènes liés aux phospholipides, il est raisonnable de spéculer que les anticorps puissent avoir des modes d'action différents et de par-là même induire des conséquences pathologiques différentes. De plus, des anticorps dirigés contre des cibles protéiques différentes et/ou ayant des caractéristiques hétérogènes de liaison à l'antigène peuvent coexister chez les malades. Il est donc plausible que plusieurs mécanismes pathogéniques soient impliqués pour un malade donné. Cependant, Il semble néanmoins raisonnable de supposer que les mécanismes patho-physiologiques dominants impliquent les anticorps dirigés contre les deux cibles principales : β_2 GPI et FII.

Un grand nombre de mécanismes pathogéniques pouvant expliquer l'effet des aPL a été proposé [1-3]. Ces mécanismes sont résumés **Tableau X**.

Les anticorps inhiberaient directement la fonction cofacteur ou enzymatique de l'antigène (anticorps neutralisant).

Les anticorps se lieraient en phase fluide à l'antigène et diminueraient ainsi son taux plasmatique par clearance des complexes immuns formés.

Les anticorps et les antigènes formeraient des complexes qui se déposeraient sur la paroi des vaisseaux conduisant à une agression et/ou inflammation du vaisseau.

Les anticorps induiraient des modifications de la liaison de l'antigène à la surface cellulaire qui altèreraient les réactions dépendantes des phospholipides dans lesquelles l'antigène est impliqué.

Les anticorps déclencheraient des événements médiés par la cellule par modification de la liaison de l'antigène sur les surfaces cellulaires ou sur des récepteurs présents à la surface des cellules.

Tableau X : Mécanismes possibles pour expliquer l'hypercoagulabilité associée au syndrome des anti-phospholipides.
(en italique les peu probables) [1]

Cependant deux mécanismes principaux et non mutuellement exclusifs par lesquels les aPL favoriseraient la génération excessive de thrombine ont été particulièrement étudiés (**Tableau X**) [1] :

1 – Les complexes anticorps/antigène interfèreraient avec les réactions anticoagulantes dépendantes des phospholipides à la surface des plaquettes principalement celles impliquant le système de la PCa.

2 – La liaison des complexes immuns aux surfaces cellulaires en particulier au niveau des phospholipides plaquettaires entraînerait une dérégulation cellulaire, notamment plaquettaire, et favoriserait ainsi la thrombose.

Un troisième mécanisme a été étudié ces dernières années (**Tableau X**). Il impliquerait que les complexes anticorps/antigène se déposent sur les parois des vaisseaux conduisant à une agression et/ou une inflammation [300-303].

Concernant les mécanismes peu probables (en italique **Tableau X**), une inhibition directe de la fonction de l'antigène par des anticorps neutralisant et une diminution du taux d'antigène par clearance des complexes anticorps/antigène formés a lieu avec des anticorps ayant une forte affinité pour leurs antigènes. Ces phénomènes ne semblent pas associés aux aPL, qui sont rapportés pour avoir une faible affinité, excepté pour un petit sous ensemble de patients avec LA et hypoprothrombinémie [3].

Les mécanismes par lesquels les aPL prolongent les temps de coagulation ont été étudiés :

- Les anticorps anti-FII sont présents chez 50 à 90% des patients LA [304, 305]. En conditions statiques, les anticorps anti-FII inhibent la génération de thrombine. Ainsi lors de la formation de complexes anti-FII/FII, une inhibition de l'activation du complexe prothrombinase (activation du FII et du FX en thrombine et FXa respectivement) est observée [298]. Cependant, en conditions de flux Field *et al* [296] ont montré que les anticorps dirigés contre le FII permettent d'augmenter l'avidité de cette protéine pour les phospholipides anioniques par formation de liaison bivalente de forte avidité, et donc d'augmenter la concentration du FII à la surface des vésicules phospholipidiques. [297]. La conversion du FII en thrombine s'effectuant aux surfaces cellulaires après exposition des phospholipides

anioniques sur la face externe des membranes, cela expliquerait le lien entre ces anticorps et la thrombose.

- Les anticorps anti- β_2 GPI sont hétérogènes, ils peuvent accélérer ou inhiber la génération de thrombine. Si la plupart des anticorps anti- β_2 GPI ne possèdent pas d'activité LA, d'autres si [255, 287, 306]. La différence concernant l'activité LA n'est pas très claire. Les anticorps augmentent la liaison de la β_2 GPI aux vésicules phospholipidiques par formation de complexes bivalents [239, 283]. Cette augmentation de liaison induit une augmentation de l'effet inhibiteur de la β_2 GPI sur la génération de thrombine [223]. La différence peut également s'expliquer par la spécificité épitopique des anticorps. Ils existent des anticorps dirigés contre les cinq domaines de la β_2 GPI, cependant ce sont ceux qui sont dirigés contre le domaine I qui sont rapportés comme possédant une activité LA et qui sont associés avec des manifestations thrombotiques [272].

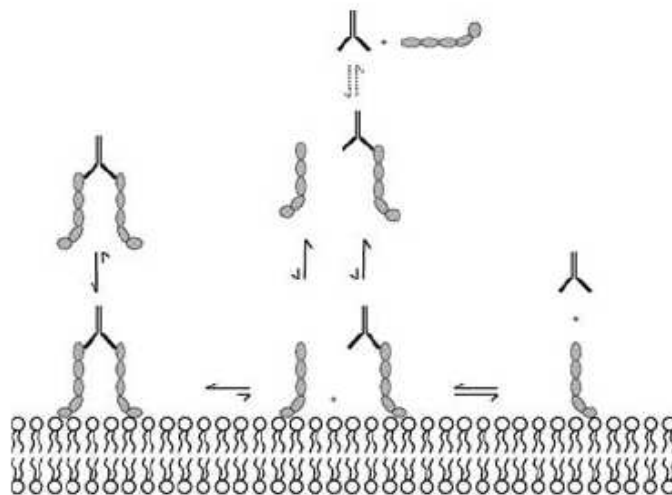


Figure 34 : Mécanisme proposé par lequel les aPL anti- β_2 GPI sont LA [1].

La **Figure 34** présente un mécanisme par lequel les aPL anti- β_2 GPI sont LA. Selon l'avidité de l'anticorps pour la β_2 GPI, des complexes monovalents anti- β_2 GPI/ β_2 GPI sont formés en solution. La β_2 GPI libre ainsi que les complexes monovalents se lient sur les surfaces phospholipidiques négativement chargées avec une faible avidité. Sur ces phospholipides, la mobilité de la β_2 GPI est forte puisque son interaction est basée sur les forces ioniques. De plus, les anticorps auto-immuns de faible avidité peuvent également former des complexes monovalents de faible avidité avec la β_2 GPI fixée aux surfaces. Selon l'épitope reconnu, la densité de β_2 GPI fixée ainsi que sa mobilité, des complexes bivalents anti- β_2 GPI/ β_2 GPI sont formés. Ces complexes ont une avidité beaucoup plus élevée pour les surfaces physiologiques phospholipidiques que la β_2 GPI seule. Par conséquent, les complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI

restent fixés à la surface phospholipidique, empêchant la liaison des facteurs de coagulation sur cette même surface et empêchant de ce fait la coagulation [1].

2.3.4.1 Interférence entre les aPL et les systèmes pro- et anticoagulants au niveau des surfaces phospholipidiques

L'interférence des complexes immuns avec les réactions anticoagulantes a été particulièrement étudiée principalement avec le système de la PCa. Les aPL peuvent également interagir avec le fonctionnement d'autres systèmes anticoagulants comme le TFPI ou l'annexine V. Les complexes anticorps/antigène pouvant également aller interférer par encombrement stérique avec les réactions procoagulantes, la résultante de ces deux interférences opposées, l'une avec les réactions procoagulantes, l'autre avec les réactions anticoagulantes reste à étudier.

□ Le système de la PC/PCa

Une résistance acquise à la PCa a été rapportée chez des patients ayant des aPL [8, 194, 307-313]. Cette résistance a pu être démontrée dans des systèmes reconstitués mais aussi par des tests plasmatiques : résistance à la PCa par test classique de Dahlbäck [309] ou résistance à la PCa de la génération de thrombine mise en évidence par thrombinographie [8]. Cependant le ou les mécanisme(s) de cette résistance ne sont pas clairement établis.

Safa *et al* [314] ont rapporté que l'oxydation de la phosphatidyléthanolamine contenue dans des liposomes potentialisait l'effet anticoagulant de la PCa sans affecter les réactions procoagulantes. De plus, ils ont également montré que des anticorps monoclonaux anti- β_2 GPI inhibaient spécifiquement la PCa, contribuant à un état hypercoagulable, en interférant avec les interactions protéine/protéine induites par l'oxydation des membranes contenant de la phosphatidyléthanolamine [315].

Le système de la PC/PCa qui permet de réguler la génération de thrombine est un système complexe. Les aPL peuvent interférer avec le système de la PC/PCa de plusieurs manières. Ils peuvent diminuer l'activation de la PC par le complexe thrombine/TM [316, 317]. Ils peuvent également inhiber l'activité de la PCa [318-321] directement ou via son cofacteur la PS [312, 322] ou bien encore se fixer aux FVa [194, 310-312, 320, 321, 323, 324] et FVIIIa [325] les protégeant ainsi de la protéolyse par la PCa. Cela aurait pour conséquence de favoriser la thrombose par absence de régulation de la génération de thrombine.

□ La voie FT/TFPI

Une influence des aPL sur la voie du FT/TFPI a été décrite. Un des mécanismes est une régulation positive de la voie du FT chez des patients atteints de SAPL par augmentation de la quantité de facteur tissulaire [326-329].

Il a également été démontré une association entre les aPL et une inhibition du TFPI [198, 329, 330]. La présence d'aPL sur les surfaces phospholipidiques gêneraient ou empêcheraient l'interaction entre le FT et le TFPI conduisant à prolonger la génération de thrombine [331, 332] et donc favoriser la thrombose. Salemink *et al* [331] ont rapporté une inhibition de l'effet du TFPI résultant en une augmentation de la génération de FXa par des anticorps anti- β_2 GPI présents chez des patients atteints de SAPL. Lean *et al* [332] ont démontré que des aPL dirigés contre la β_2 GPI mais pas contre le FII interféreraient également avec l'inhibition de la voie du FT par le TFPI. Ainsi, en présence de TFPI, une augmentation significative de la génération de thrombine contribuant à un état hypercoagulable est observée.

□ La génération de thrombine

Plusieurs études ont montré que les aPL peuvent inhiber la formation de la thrombine [321, 329, 333, 334]. Ieko *et al* [321] ont démontré que des anticorps monoclonaux anti- β_2 GPI induisaient un effet anticoagulant par inhibition de la génération de thrombine. De même, Goldsmith *et al* [329] ont rapporté une inhibition de l'activation du FII par les aPL. Sheng *et al* [333] ont montré en utilisant un test chromogénique de génération de thrombine une corrélation positive entre l'inhibition de la génération de thrombine et le taux d'anticorps anti- β_2 GPI. De même, Raghozar *et al* [334] ont montré que des anticorps monoclonaux murins anti- β_2 GPI en présence de β_2 GPI produisaient une inhibition supérieure à 70 % de la génération de thrombine. Les complexes anticorps/antigène interfèrent avec l'activation du FXI par la thrombine. Cette inhibition est inférieure à 50 % en présence de β_2 GPI seule [334].

□ L'annexine A5

L'annexine A5 qui lie les phospholipides anioniques avec une affinité élevée, pourrait former un bouclier anticoagulant protecteur sur les cellules vasculaires en déplaçant les facteurs de la coagulation des surfaces phospholipidiques. Il a été rapporté que des aPL se liant avec une forte affinité aux phospholipides anioniques pourraient interférer avec ce bouclier et par conséquent prédisposer à la thrombose placentaire ainsi qu'à des pertes fœtales [335, 336]. Cependant, des doutes existent en ce qui concerne cet effet bouclier de l'annexine A5 *in vivo*. Une étude de la capacité reproductrice de souris invalidées pour l'annexine A5 a démontré

qu'un déficit en annexine A5 n'entraînait pas d'impact sur la taille et la viabilité du fœtus [337].

2.3.4.2 Mécanisme d'activation cellulaire par les complexes anticorps/antigène

□ A la surface des plaquettes

La liaison de l'antigène puis de l'anticorps ou directement des complexes anticorps/antigène à la surface de plaquettes et de plaquettes activées par agression ou lésion vasculaire ou par des agonistes tels la thrombine ou le collagène, amplifierait l'activation plaquettaire permettant ainsi d'avoir une plus grande surface phospholipidique procoagulante résultant en une augmentation de la génération de thrombine.

De nombreux auteurs ont montré que des plaquettes activées étaient présentes chez des patients atteints de SAPL et que les aPL pouvaient stimuler l'agrégation et la sécrétion des plaquettes [338, 339] en présence de faibles concentrations en agonistes [338, 340-342]. De même, Arvieux *et al* [343] ont montré que des anticorps monoclonaux murins dirigés contre la β_2 GPI potentialisait l'agrégation plaquettaire en présence d'agoniste. Cependant des résultats opposés ont été rapportés concernant l'exposition des phospholipides anioniques à la surface cellulaire, nécessaire pour la mise en place du système de la coagulation [344, 345]. Ainsi, Ford *et al* [344] ont montré qu'une pré-activation des plaquettes avec de faibles concentrations en ADP ou en peptide activateur du récepteur de la thrombine en présence de sérum de patients SAPL résultait en une légère augmentation mais néanmoins significative de la formation des microvésicules plaquettaires comparé au contrôle sans sérum. Cependant cette augmentation de la formation de microvésicules induite par du sérum de patient n'est pas significative par rapport à un sérum témoin. Au contraire, Warner *et al* [345] ont montré une augmentation de l'activité procoagulante de plaquettes lavées en présence de sérum de patients contenant des aPL comparé à du sérum normal. Les résultats divergents entre ces deux études peuvent néanmoins s'expliquer par le fait que les sérums étudiés par Ford *et al* [344] n'ont pas été inactivés par chauffage et que les sérums contrôles induisent la formation de microvésicules plaquettaires alors qu'ils n'ont pas d'effets pour l'étude de Warner *et al* [345].

L'implication ou non de la partie Fc des anticorps dans le mécanisme par lequel les aPL induisent un effet activateur est encore en débat. En présence d'anticorps, les complexes bivalents anticorps/antigène se déposeraient au niveau des surfaces phospholipidiques [284],

puis de façon similaire à ce qui est observé dans les TIH, la portion Fc des IgG interagirait avec le récepteur Fc γ RIIa à la surface des plaquettes induisant une activation plaquettaire. Cependant des travaux en faveur d'un effet activateur plaquettaire Fc-indépendant ont été rapportés. Ainsi, des études *in vitro*, réalisées en présence de plaquettes [338, 342] ont suggéré une absence d'implication du récepteur Fc γ RIIa dans le mécanisme d'activation plaquettaire. Lutters *et al* [346] ont montré que des dimères de β_2 GPI (deux molécules de β_2 GPI liées ensemble au niveau de leurs domaines I par l'intermédiaire du domaine appelé IV du FXI), excluant une interférence avec le Fc γ RIIa, miment l'effet de complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI tant sur l'effet LA que sur la liaison aux plaquettes. Ce phénomène a été confirmé par une étude *in vivo* réalisée par Jankowski *et al* [347] qui ont montré que des fragments F(ab')₂ d'un anticorps monoclonal murin dirigé contre la β_2 GPI était capable d'induire *in vivo* des thrombus de même intensité que l'anticorps natif.

□ A la surface d'autres cellules

Une interaction des anticorps anti- β_2 GPI avec les cellules endothéliales et les monocytes et conduisant à un état procoagulant et proinflammatoire a été décrite [300, 301, 328, 348]. La β_2 GPI peut comme sur les plaquettes se lier au niveau des cellules endothéliales et des monocytes et ainsi permettre aux anticorps de se fixer et d'induire un phénotype prothrombotique. Del Papa *et al* [349] ont rapporté une liaison de la β_2 GPI aux phospholipides anioniques au niveau des cellules endothéliales par l'intermédiaire du site de liaison aux phospholipides situés sur le domaine V de la β_2 GPI.

□ Au niveau de récepteurs

Une implication de différents récepteurs présents sur les plaquettes mais également sur les cellules endothéliales a été mise en évidence.

Des données en faveur d'un rôle du récepteur ApoER2' plaquettaire dans l'activation des plaquettes a été rapporté. Ce récepteur est le seul récepteur de la famille des LDL (Low Density Lipoprotein) décrit sur les plaquettes [350]. Lutters *et al* [338] ont démontré une perte de l'augmentation de l'adhérence des plaquettes au collagène induite par les complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI par blocage du récepteur ApoER2' plaquettaire. Une interaction directe du récepteur ApoER2' avec la β_2 GPI a été mise en évidence [338] par une co-précipitation du récepteur avec de la β_2 GPI dimérisée mimant l'effet *in vitro* des complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI [346]. L'interaction de la β_2 GPI avec ApoER2' (**Figure 35**) résulterait en une phosphorylation

du récepteur suivi par la phosphorylation de la p38MAP kinase et la synthèse de TX A2 [351] conduisant à une activation des plaquettes. La liaison de la β_2 GPI au niveau de l'ApoER2' se fait par l'intermédiaire de son domaine V [352].

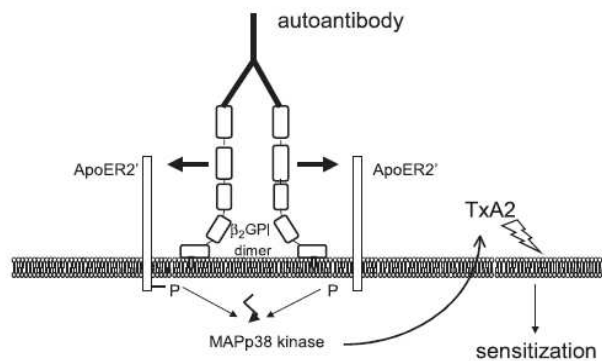


Figure 35 : Mécanisme d'action des complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI se liant au récepteur ApoER2'.

Les flèches indiquent le déplacement des complexes liés aux surfaces pour la liaison au niveau de récepteurs ApoER2' [351].

Un autre récepteur localisé sur les plaquettes a également été rapporté comme pouvant lier la β_2 GPI. Shi *et al* [339] ont montré une liaison *in vitro* de la β_2 GPI à la sous-unité GpIb α du récepteur GPIb/IX/V par l'intermédiaire des domaines II à V de la protéine. Cette liaison permet aux complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI dirigé contre le domaine I de la protéine d'activer les plaquettes conduisant à la génération de TX A2 ainsi qu'à l'activation de la voie phosphoinositide-3kinase/Akt (PI3K/Akt) qui contribue à l'activation des récepteurs GpIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) (**Figure 36**). Cette liaison de la β_2 GPI dimérisée à GpIb α a également été démontrée par Pennings *et al* [353] mais en utilisant un système en flux. Ils ont ainsi démontré que des dimères de β_2 GPI, immobilisés sur une plaque, peuvent stimuler l'adhérence de plaquettes par l'intermédiaire du récepteur GPIb α dans des conditions de flux (système de perfusion *in vitro* en faisant varier les forces de cisaillement) [353].

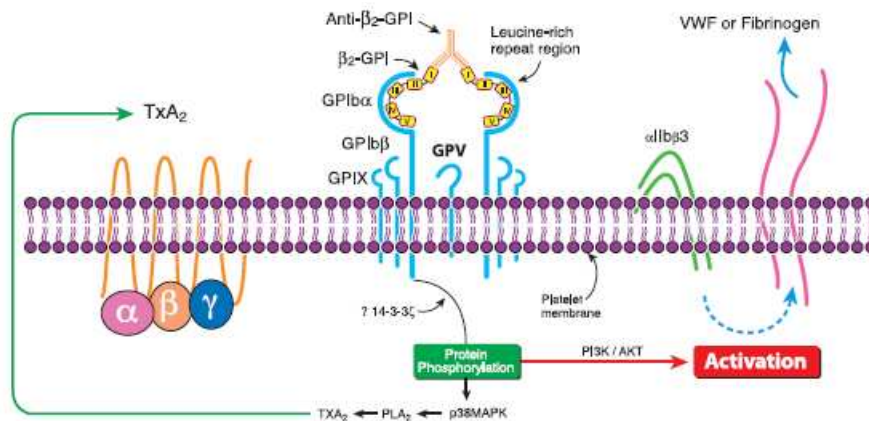


Figure 36 : Mécanisme d'action des complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI se liant à la sous-unité GPIb α du récepteur GPIb/IX/V plaquettaire [2].

Au niveau des cellules endothéliales, une implication des « toll like receptors » (TLR) dans l'activation de ces cellules a également été étudiée [354]. Des homologies moléculaires entre la β_2 GPI et les agents microbiens, ligands naturels des TLR permettraient à la β_2 GPI d'interagir avec les TLR et aux anticorps anti- β_2 GPI de déclencher une réponse inflammatoire et procoagulante [355]. Un rôle de TLR2 et TLR4 dans l'activation des cellules endothéliales par les aPL a été démontré respectivement par Sata *et al* [356] et Pierangeli *et al* [357]. Le mécanisme impliqué dans l'activation des cellules endothéliales n'est pas encore clairement défini. Il a été décrit que les aPL induisent une translocation nucléaire de NF- κ B [358] et l'activation de la p38MAP kinase [359, 360]. De plus, il a été rapporté que les protéines de signalisation intracellulaires MyD88 et TRAF6 sont impliquées [303].

Une interaction de la β_2 GPI avec différents membres des récepteurs LDL comme celui de la mégaline a été rapporté comme impliqué dans l'activation des cellules endothéliales [351, 361, 362]. L'ApoER2', récepteur appartenant à la famille des LDL, est également exprimé au niveau des cellules endothéliales. Il peut ainsi au niveau de ces cellules être la cible des complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI et induire une activation cellulaire comme décrit sur les plaquettes [351]. Enfin, une liaison de la β_2 GPI à trois autres récepteurs de la famille des LDL (LDL-R, VLDL-R et LRP) a également été décrite par Pennings *et al* [362].

Il est également rapporté une liaison de la β_2 GPI à l'annexine A2 [363, 364]. Cette liaison permet à des anticorps anti- β_2 GPI d'activer l'endothélium, induisant l'expression d'un phénotype procoagulant [363]. La cascade de signalisation déclenchée par ces complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI n'est pas claire car l'annexine A2 n'est pas une protéine transmembranaire [354].

3 OBJECTIF DE LA THESE

Les études sur l'effet activateur plaquettaire par les aPL se sont principalement intéressées à la sécrétion des granules plaquettaires et les données sont sujettes à controverse. L'étape ultime de l'activation plaquettaire est l'exposition des phospholipides anioniques. Si les aPL induisent cette exposition des phospholipides, cela est susceptible d'avoir un retentissement sur le système de la coagulation. Deux études sur l'exposition des phospholipides par les aPL ont été réalisées et les résultats sont discordants [344, 345]. De plus, la conséquence d'une telle exposition sur les réactions de coagulation reste à préciser.

Une résistance à la PCa induite par les aPL a été mise en évidence par les tests classiques de coagulation et se traduit par une diminution du rapport des temps de coagulation en présence et en absence de PCa. Néanmoins, l'effet LA qui induit un allongement du temps de coagulation peut représenter un artéfact sur l'interprétation des résultats. De plus, l'inhibition de la génération de thrombine par les systèmes physiologiques, et en particulier la PCa, est pour l'essentiel postérieure au temps mesuré par ces tests et donc mal prise en compte. Ces limites justifient l'étude de cette résistance à la PCa avec un système plus intégratif.

Nos recherches ont porté sur deux principales hypothèses de travail qui sont liées entre elles :

(1) La liaison des complexes anticorps/antigène à la surface membranaire induirait une activation des plaquettes pouvant aller jusqu'à l'exposition de surfaces procoagulantes.

Nous nous sommes intéressés à l'étude de deux étapes de l'activation plaquettaire qui ont un impact sur les réactions pro- et anticoagulantes. Une des étapes de l'activation plaquettaire est la sécrétion du contenu des granules. Les molécules intra-plaquettaires ainsi libérées peuvent avoir des propriétés pro- et anticoagulantes. L'activation plaquettaire se traduit par une disponibilité plus rapide de surfaces phospholipidiques anioniques nécessaires aux réactions de coagulation. Cela est en faveur d'une cinétique plus rapide des réactions procoagulantes. Il a ainsi été décrit que la génération de thrombine peut être si rapide qu'elle est terminée avant que le système inhibiteur de la PCa puisse être formé et fonctionnel [157].

(2) La liaison des complexes anticorps/antigène interférerait avec les réactions de la coagulation survenant au niveau des surfaces membranaires.

Les surfaces cellulaires sont indispensables aux réactions de coagulation. La présence de complexes anticorps/antigène sur ces surfaces cellulaires peut donc affecter ce système de la coagulation par différentes voies non exclusives :

- la liaison de l'anticorps au FII peut masquer les sites conversion du FII en thrombine. Cela réduit la quantité d'antigène disponible pour les réactions de coagulation. Ainsi, la diminution de FII se traduit par une diminution de la génération de thrombine qui pourrait expliquer l'effet anticoagulant observé chez les aPL.
- la liaison de l'anticorps renforce l'avidité de l'antigène pour les membranes en diminuant sa dissociation. Cela peut concentrer le FII au niveau des surfaces entraînant une augmentation de la transformation de FII en thrombine contribuant au phénotype hypercoagulable.
- la présence des complexes anticorps/antigène réduit les surfaces disponibles pour les réactions pro- et anticoagulantes. Cela induit une diminution des réactions de coagulation par encombrement stérique au niveau des surfaces phospholipidiques.

Divers paramètres pouvant être propres à chaque patient devraient moduler le phénotype *in vitro*. Les phospholipides nécessaires aux réactions pro- et anticoagulantes ne sont pas les mêmes. La PCa agit en inhibant le FVa et le FVIIIa. Une inhibition de l'inactivation du FVa par la PCa en présence des aPL a été rapportée [323]. En faisant varier le rapport en phospholipides, nous souhaitons démontrer que les aPL inhibent l'inactivation du FVa par la PCa en se liant au niveau de surfaces phospholipidiques de même composition que celle nécessaire au système de la PCa. Il a été décrit que les complexes anticorps/antigène ont une spécificité phospholipidique identique au système de la PCa [315]. Cela expliquerait la diminution de sensibilité à la PCa observée en présence des aPL.

Les caractéristiques cinétiques de l'interaction; le ou les épitope(s) reconnu(s) ou bien la concentration en anticorps pourraient induire des variations du phénotype observé. Notre objectif final est de déterminer les contributions relatives de la cible, de l'épitope reconnu et des constantes cinétiques sur le phénotype hypercoagulable.

Les complexes procoagulants ont une avidité élevée pour les surfaces phospholipidiques alors que le système de la PC a une avidité relativement faible. Les complexes anticorps/antigène ont une avidité intermédiaire qui leur confère la propriété d'entrer en compétition partielle avec les complexes procoagulants et quasi totale avec le système de la PCa. Cela conduirait à une inhibition sélective du système anticoagulant de la PCa sur la base des cinétiques des réactions mises en jeu. La capacité de liaison ainsi que les caractéristiques cinétiques de facteurs de la coagulation en fonction des surfaces phospholipidiques a été déterminée.

La capacité de liaison ainsi que les caractéristiques cinétiques des facteurs de la coagulation et des complexes anticorps/antigène ont été déterminées par SPR.

L'objectif principal de cette thèse a été d'identifier des mécanismes contribuant à l'hypercoagulabilité détectée par thrombinographie dans le cadre des aPL.

Notre objectif était donc de déterminer si les aPL sont capables d'induire l'étape ultime de l'activation plaquettaire à savoir l'exposition des phospholipides anioniques ; de montrer qu'ils interfèrent avec les réactions pro- et anticoagulantes ; et enfin de mettre en évidence une éventuelle interaction entre ces deux mécanismes. A chaque étape de nos recherches, nous avons vérifié la pertinence biologique et/ou clinique des résultats obtenus avec les AcMm.

La capacité des complexes anticorps/antigène à induire la sécrétion du contenu des granules a été déterminée par méthode immunoenzymatique (ELISA) par les dosages de la synthèse du TX et la libération du PF4. La capacité des complexes anticorps/antigène à induire une exposition plus rapide de phospholipides anioniques a été déterminée par la mesure des phospholipides procoagulants à la surface plaquettaire [365]. Nous avons travaillé avec un système simple : plaquettes lavées et conversion de FII en thrombine par le complexe final de la cascade de la coagulation celui de la prothrombinase. De manière à vérifier la pertinence clinique des résultats obtenus avec les AcMm, le niveau d'activation plaquettaire induit par ces AcMm a été comparé à celui obtenu avec des auto-anticorps humains présents dans une pathologie autre que le SAPL (thrombopénie induite par l'héparine) et connus pour être activateurs plaquettaires.

Le suivi de la génération et de l'inhibition de la thrombine a été déterminé par thrombinographie. Les expériences ont été réalisées avec deux spécimens plasmatiques, l'un prenant en compte une éventuelle activation plaquettaire (plasma riche en plaquettes) ; l'autre s'en affranchissant totalement (plasma pauvre en plaquettes) auquel ont été ajoutées comme surface cellulaire des microvésicules plaquettaires. Ces surfaces cellulaires sont formées lors de l'étape ultime de l'activation plaquettaire.

Dans le but de montrer une interférence des complexes anticorps/antigène avec les assemblages anticoagulants plutôt que procoagulants, nous avons évalué l'influence de la composition en phospholipides :

- sur la conversion de FII en thrombine, en déterminant l'activité du complexe prothrombinase en système purifié.

- sur l'inactivation du FVa par la PCa, en système purifié.

Les résultats obtenus et présentés dans cette thèse sont divisés en quatre parties :

- La première partie présente une étude méthodologique. Nous avons déterminé pour une étude en thrombinographie les conditions expérimentales adéquates et appropriées pour étudier les mécanismes contribuant à l'hypercoagulabilité associée aux aPL en présence d'AcMm.
- La deuxième partie consiste en l'étude des différentes hypothèses mécanistiques de l'hypercoagulabilité associée aux aPL. Nous avons décrit que la liaison des complexes anticorps/antigène à la surface membranaire plaquettaire induit une activation des plaquettes et réduit les surfaces disponibles pour les réactions pro- et anticoagulantes.
- La troisième partie étudie l'influence de la composition en phospholipides membranaires sur les réactions pro- et anticoagulantes au niveau des surfaces. Nous avons étudié, l'action du complexe prothrombinase et l'inactivation du FVa par la PCa ainsi que la capacité de liaison de facteurs procoagulant (FII) et anticoagulant (PCa) de manière à déterminer une l'influence de la composition en phospholipides.
- Enfin, la quatrième partie présente une caractérisation moléculaire des interactions entre les différents acteurs. Nous avons caractérisé les AcMm par leur cible protéique, la région épitopique reconnue ainsi que par les constantes cinétiques de manière à mettre en évidence si un de ces paramètres avait un rôle prépondérant.

4 MATERIELS ET METHODES

4.1 Les anticorps

4.1.1 Les anticorps monoclonaux murins

4.1.1.1 Caractéristiques des AcMm

Anticorps	Sous-classe	Cible antigénique	provenance
JO1-1 [366]	IgG ₁	FII	ATCC HB 8637
RL1-3 [367]	IgG _{2a}		ATCC HB 8638
12H8	IgG ₁	PC/PCa	Inserm U734
9E2	IgG ₁	PC	
B1-3	IgG ₁	PCa	
8C3	IgG ₁	β_2 GPI	J. Arvieux [343, 368]
6A4	IgG ₁		
6F3	IgG ₁		
2B8G	IgG ₁	β_2 GPI	S. Krilis [333, 339]
2C7G	IgG ₁		
3G11C	IgG ₁		
3G11F	IgG ₁		
4B2C	IgG ₁		
4B2E	IgG ₁		
7F6G	IgG ₁		
8G4E	IgG ₁		
9G1	IgG ₁		
27G7	IgG _{2a}	β_2 GPI	J. Arnout [369]
28F4	IgG ₁	FII	J. Arnout [369]

Tableau XI : Caractéristiques des AcMm.

Les AcMm reconnaissent le FII, la β_2 GPI, la PC et PCa humaine.

4.1.1.2 Production en ascites

Les AcMm, JO1-1, RL1-3, 9E2, 12H8, B1-3, 8C3, 6A4, 6F3 ont été produits en ascites. Cinq cents microlitres d'adjuvant incomplet de Freund (Sigma) sont injectés dans la cavité péritonéale de souris Balb/c. Dans les 14 jours qui suivent, 5×10^5 hybridomes en phase exponentielle de croissance [cellules centrifugées et lavées dans du PBS-A (NaCl 131 mM, Na₂HPO₄ 5,1 mM, KH₂PO₄ 1,56 mM ; pH 7,4)] sont injectés aux souris pour la formation d'ascite. L'ascite est récupérée après 1 à 2 semaines, placée 1 h à 37°C puis 1 nuit à 4°C et enfin centrifugée à 3000 g pendant 10 min.

Avant purification des AcMm, l'ascite est dessalée par passage à un débit de 0,5 mL/min au travers d'une colonne de Sephadex G-25 (Sephadex G-25 Medium, Pharmacia Biotech) équilibrée avec de l'eau distillée. La colonne est ensuite lavée avec de l'eau distillée et les protéines sont récupérées en mesurant l'absorbance à 280 nm.

4.1.2 **Obtention des AcMm et auto-anticorps humains**

4.1.2.1 Purification des anticorps

Les AcMm, ainsi que les auto-anticorps humains (sérums de patients aPL et de patients TIH) sont purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine G Sepharose (Pharmacia Biotech). Les AcMm ainsi que les sérums sont passés à un débit de 0,5 mL/min à travers la colonne de protéine G-Sepharose 4 Fast flow équilibrée avec un tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 7. Après lavage avec le tampon phosphate, les anticorps sont désorbés par variation du pH (glycine 0,1 M, pH 2,7). Le pH est neutralisé par ajout de Tris 1 M (0,1 v/v). Le désorbat est dialysé une nuit à 4°C contre du HBS-A [Hépès (acide sulfonique 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethane) 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,35]. La colonne est régénérée avec le tampon phosphate.

4.1.2.2 Dosage des anticorps

Les anticorps sont concentrés par centrifugations du dialysat 30 min à 1500 g dans des cellules de concentration (Amicon Ultra, Millipore, Molsheim) jusqu'à obtention du volume désiré puis dosés par la technique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) décrite ci dessous :

(1) Revêtement : des plaques 96 puits Costar « high binding » (réf. 3590) sont revêtues une nuit à 4°C avec 100 µL d'anticorps dilués dans du tampon carbonate-bicarbonate 50 mM, pH 9,6. Des anticorps de chèvre anti-Ig (G+L) de souris (Biosource Argene) à 2,5 µg/mL ont

été utilisés pour les AcMm et un d'anticorps monoclonal anti-IgG humaine (GG-7, Sigma I6260) au 1/10000 pour les auto-anticorps.

(2) Lavage et saturation : les plaques sont lavées trois fois avec du PBS-A contenant du Tween 20 à 0,5 % (PBS-A/Tween) puis saturées avec 125 µL de gélatine de poisson à 0,5 % dans du PBS-A contenant du NaN₃ à 0,5 %. Elles sont conservées à 4°C au moins une nuit.

(3) Dépôt des échantillons : la gamme étalon, 9E2 (AcMm purifié) ou IgG humaines purifiées (Sigma réf. I2511) ainsi que les anticorps à différentes dilutions sont déposés (100 µL/puits) et incubés 2 h à 37°C.

(4) Détection : les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS-A/Tween pour éliminer les anticorps non fixés. Cent microlitres d'anticorps de chèvre anti-Ig(G+L) de souris (Biosource Argene), marqués à la peroxydase (Sigma) et dilués au 1/1000 en PBS-A/Tween, sont déposés pour les AcMm. Cent microlitres d'anticorps anti-IgG humaine marqués à la peroxydase (Sigma réf. A0170) et dilués au 1/10000 en PBS-A/Tween, sont déposés pour les auto-anticorps. Les plaques sont incubées 1 h à 37°C.

(5) Révélation : les plaques sont lavées 5 fois avec du PBS-A/Tween puis 1 fois avec du tampon acétate-citrate (CH₃COONa 3H₂O 140 mM, pH 6 avec de l'acide citrique 0,1 M). Cent microlitres d'une solution de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (Fluka) 1 mg/mL, H₂O₂ 0,015 % en acétate-citrate sont déposés. La réaction est arrêtée par ajout de 25 µL d'H₂SO₄ 2M et l'absorbance est mesurée à 450 nm. Les concentrations dans les échantillons sont déterminées à partir de la gamme étalon.

4.1.2.3 Pureté

La pureté des anticorps est évaluée par électrophorèse en gel de polyacrylamide et la coloration est effectuée au nitrate d'argent. Une bande aux alentours de 150 000 Da a été observée pour les différents anticorps.

4.2 Obtention de la β_2 -glycoprotéine I

4.2.1 Purification de la β_2 -glycoprotéine I

La β_2 GPI humaine est purifiée à partir du plasma de 6 donneurs volontaires sains obtenu par prélèvement de sang dans des tubes contenant un mélange de citrate et dextrose (ACD, citrate de sodium 85 mM, acide citrique 66,6 mM, D-glucose 111 mM) à raison d'1 volume d'ACD pour 6 volumes de sang. Le sang est centrifugé à 170 g, 20 min à 22°C, le plasma riche en plaquettes (PRP) récupéré est centrifugé à 1800 g, 10 min à 22°C et enfin le plasma est congelé à - 20°C jusqu'à utilisation.

La β_2 GPI est purifiée selon la méthode d'Arvieux *et al* [370] avec quelques modifications. Le plasma des donneurs est d'abord décongelé 15 min à 37°C (\approx 500 mL) avant la première étape de purification qui consiste en une précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (saturation 40 %) 1 h à 4°C sous agitation douce. Le mélange obtenu est ensuite centrifugé à 18900 g, 20 min à température ambiante et le surnageant récupéré (\approx 500 mL) est dialysé 4 fois 2 h à température ambiante contre 2 L de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8. La conductivité est mesurée entre chaque dialyse de manière à suivre la diminution de la force ionique. Le dialysat récupéré (\approx 600 mL) est chargé à un débit de 40 mL/h sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE Sephacel™, Amersham Biosciences) préalablement équilibrée avec du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8. La colonne est ensuite lavée avec le tampon Tris-HCl et le perfusat récupéré (\approx 800 ml) est ajusté à une conductivité de 12 mmho avec du NaCl puis est déposé sur une colonne Héparine-Sepharose CL6B équilibrée avec du PBS-A à un débit de 40 mL/h. Après lavage de la colonne avec du PBS-A jusqu'à une valeur d'absorbance $<$ à 0,01, le désorbat est élué par passage de NaCl 0,3 M en tampon Tris-HCl ajusté à pH 7,5. La fraction contenant la β_2 GPI (\approx 85 mL) est récupérée et concentrée à 7 mL environ dans une cellule à concentration à une pression de 5 bars. La colonne est régénérée par passage de NaCl 1 M puis de PBS-A. Le concentré est enfin passé sur une colonne de gel de filtration Sephadex G200 perfusée avec le PBS-A à un débit de 6 mL/h. La fraction contenant la β_2 GPI est récupérée et concentrée par centrifugation pendant 30 min à 1500 g et à 4°C. La pureté de la β_2 GPI est évaluée par électrophorèse en gel de polyacrylamide suivie d'une coloration au nitrate d'argent. Une bande a été observée aux alentours de 50000 Da.

Son activité cofacteur est étudiée par ELISA par détermination de sa capacité de liaison à du cardiolipide. Enfin, elle est dosée (kit ELISA affinity biologicals) puis repartie en fractions de 200 μ L et congelée jusqu'à utilisation.

4.2.2 Mesure de l'activité cofacteur de la β_2 -glycoprotéine I

L'activité cofacteur de la β_2 GPI est déterminée par la technique ELISA décrite paragraphe 4.1.2.2 avec quelques modifications :

- Revêtement : cardiolipide (Sigma) à 30 μ g/mL (50 μ L) dans de l'éthanol absolu laissé évaporer une nuit à 4°C.
- Saturation : albumine bovine (BSA ; Sigma) à 1 % dans du tampon PBS-A pendant 4 h.
- Les étapes d'incubation sont réalisées à température ambiante.

La gamme étalon utilisée est de la β_2 GPI purifiée (Diagnostica Stago). La gamme et les échantillons sont dilués dans du tampon PBS-A contenant un anticorps polyclonal anti- β_2 GPI de lapin (antiserum Stago) dilué au 1/1000. Un anticorps de chèvre anti-lapin biotinylé est ajouté avant le dépôt du conjugué (peroxydase-streptavidine).

4.2.3 Dosage de la β_2 -glycoprotéine I

La β_2 GPI est également dosée par la technique ELISA décrite paragraphe 4.1.2.2 avec quelques modifications :

- Revêtement : anticorps polyclonal anti- β_2 GPI (APOH-EIA-C, Affinity Biologicals).
- Saturation : la saturation de la plaque n'est pas nécessaire, le tampon de lavage utilisé est suffisant pour bloquer les interactions non spécifiques : PBS-B (NaCl 136 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, KCl 2,7 mM pH 7,4) contenant du Tween 20 à 0,1 %.
- Dépôt des échantillons : Les dilutions des échantillons sont réalisées en HBS-B (Hépès 100 mM, NaCl 100 mM, pH 7,2 avec NaOH) contenant de la BSA 0,5 % et du Tween 20 0,1 %.
- Les étapes d'incubation sont réalisées à température ambiante.

La gamme étalon est de la β_2 GPI purifiée (Diagnostica Stago). L'anticorps conjugué est un anticorps polyclonal anti- β_2 GPI conjugué à la peroxydase.

4.3 Préparation de plaquettes lavées humaines

4.3.1 Plaquettes lavées humaines pour l'étude d'une activation plaquettaire

Les plaquettes humaines lavées sont préparées selon la méthode de Warner *et al.* [345]. Le sang est prélevé dans des tubes contenant comme anticoagulant de l'ACD à raison d'1 volume

d'ACD pour 6 volumes de sang. Le sang est centrifugé à 170 g, 20 min à 22°C. Le PRP récupéré est centrifugé à 1800 g, 10 min à 22°C. Le plasma pauvre en plaquettes (PPP) et le culot plaquettaire est remis en suspension dans du tampon Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaH₂PO₄ 0,4 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hépès 5 mM, D-glucose 5,5 mM) ajusté à un pH 6,2 contenant de l'apyrase grade I (Sigma) à 50 µg/mL puis centrifugé à 1800 g, 10 min à 22°C. Le surnageant est éliminé et les plaquettes sont remises en suspension dans la solution Tyrode ajustée à un pH de 7,4.

4.3.2 Plaquettes lavées humaines pour la préparation de microvésicules plaquettaires

Les plaquettes humaines lavées sont préparées selon la méthode de Mustard *et al.* [371]. Le sang est prélevé dans des tubes contenant comme anticoagulant de l'ACD et de l'héparine non fractionnée (Choay, 20 UI/mL) à raison d'1 volume d'ACD / héparine pour 6 volumes de sang. Le sang est centrifugé à 170 g, 20 min à 37°C. Le PRP récupéré est centrifugé à 1400 g, 15 min à 37°C. Le PPP est éliminé et le culot plaquettaire est remis en suspension dans du tampon Tyrode ajusté à un pH de 7,3, contenant de la BSA à 0,35 %, de l'apyrase grade I (Sigma) à 0,3 U/mL et de la prostanglandine E₁ (Sigma) 0,5 µM, et centrifugé à 900 g, 15 min à 37°C. Le surnageant est éliminé et les plaquettes sont remises en suspension dans la solution Tyrode-BSA-apyrase-PGE₁. Une nouvelle centrifugation à 900 g, 15 min à 37°C est réalisée et le surnageant est éliminé. Les plaquettes sont remises en suspension dans une solution Tyrode-BSA contenant de l'apyrase à 0,03 U/mL et conservées à 37°C jusqu'à utilisation.

4.4 Préparation de surfaces phospholipidiques

4.4.1 Préparation de vésicules phospholipidiques moléculairement définies (VP)

Un mélange de 940 µL de phosphatidylcholine (PhtdChol) à 25 mg/mL, 750 µL de phosphatidylsérine (PhtdSer) à 10 mg/mL et de 750 µL de phosphatidyléthanolamine (PhtdEth) à 10 mg/mL (diolelylglycérophospholipides ; Avanti Polar lipids) dans du chloroforme est soumis à une évaporation sous azote. Les phospholipides récupérés sont redissous dans 10 mL d'HBS-A et subissent une sonification dans un bain de glace (5 × 5 min avec une pause de 5 min entre chaque sonification). Le rapport final est 60/20/20 mole% PhtdChol/PhtdSer/PhdtEth.

De manière à étudier l'influence de la composition en phospholipides sur les réactions pro- et anticoagulantes, des VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhdtEth dans des rapports 60/10/30, 60/30/10 et 80/10/10 mole% ont également été préparées selon le protocole ci dessus. Des VP composées de PhtdChol/PhdtEth ou PhtdChol/PhtdSer dans un rapport 80/20 mole% ou de PhtdChol 100 mole% ont été préparées comme contrôle.

4.4.2 Préparation de microvésicules plaquettaires

Les microvésicules plaquettaires (MVP) sont préparées selon la méthode de Barry *et al.* [372] avec quelques modifications. Les plaquettes lavées selon la méthode de Mustard *et al.* [371] sont ajustées à 600 G/L et incubées avec de la ionomycine (Sigma, Saint Louis, USA) 10 μ M final, 10 min à 37°C puis centrifugées à 1500 g, 15 min à 22°C. Le surnageant récupéré est centrifugé à 13000 g, 45 min à 4°C. Après élimination du surnageant, les MVP sont remises en suspension dans le tampon Tyrode ajusté à un pH de 7,4. Les MVP sont lavées cinq fois dans du tampon HBS-A par centrifugation à 13000 g, 45 min à 4°C puis remises en suspension dans du HBS-A contenant de la BSA à 5 g/L et conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

4.5 Agrégation plaquettaire

Des mesures d'agrégation plaquettaire ont été réalisées avec un thromboagrégamètre photométrique (Soderel médical, adapté de Cazenave *et al* [373]) en utilisant du PRP citraté (citrate à 106 mM) ajusté à 150 G/L. L'échelle de transmission lumineuse a été réglée avec le PRP (0 %) et le PPP (100 %) étudiés.

Des agonistes plaquettaires dont les concentrations finales sont de 10 μ M pour l'ADP (Biodata corporation, Horsham, PA, U.S.A.) et de 1,875 μ g/mL pour ALB6 ont été étudiés. L'effet de différents inhibiteurs plaquettaires (Abciximab à 20 μ g/mL, IV-3 à 2 μ g/mL, dipyridamole à 40 μ M et acide acétylsalicylique (Aspégic®) à 100 μ M – concentrations finales) a été étudié, par incubation des inhibiteurs avec le PRP, 10 min à 37°C avant l'ajout des agonistes. L'agrégation maximale a été retenue pour l'interprétation des résultats.

4.6 Mesure de la sécrétion des granules alpha plaquettaires et de la synthèse du thromboxane B₂

Une molécule contenue dans les granules α plaquettaires a été mesurée : le PF4. En parallèle nous avons également mesuré le TX B₂ comme marqueur d'une molécule néoformée le TX

A₂. La détermination d'une sécrétion des granules α plaquettaires est effectuée dans le cadre des études d'activation plaquettaire par les AcMm anti- β_2 GPI et anti-FII. Les plaquettes lavées sont incubées 1 h en présence d'AcMm \pm antigène puis le mélange est centrifugé à 1750 g, 10 min à 4°C. Les surnageants récupérés sont ensuite centrifugés à 13000 g, 45 min et à 4°C pour éliminer les MVP circulantes et enfin conservées à - 80°C jusqu'au dosage.

4.6.1 Dosage du facteur plaquettaire 4

La concentration en PF4 des suspensions plaquettaires a été déterminée en utilisant une trousse de dosage ELISA du commerce (Asserachrom® PF4 – Diagnostica Stago ref. 00258) selon les indications du fabricant. Sur une plaque revêtue de fragments F(ab')₂ d'anticorps de lapin anti-PF4 plaquettaire humain, 200 μ L de la gamme étalon (calibrant PF4) et des spécimens à doser aux dilutions voulues dans du tampon de dilution (tampon phosphate) sont déposés en double. Deux puits contenant du tampon phosphate (blancs de la réaction) ainsi qu'un contrôle (PF4 à une concentration connue) sont également inclus sur la plaque. Après 1 h d'incubation sous agitation douce et à température ambiante, la plaque est lavée 5 fois avec une solution de lavage puis 200 μ L d'anticorps anti-PF4 marqué à la peroxydase sont déposés. Après 1 h d'incubation, la plaque est de nouveau lavée 5 fois et 200 μ L de substrat (ortho-phénylènediamine – peroxyde d'urée) sont déposés dans les puits. La réaction est stoppée par ajout de 50 μ L de H₂SO₄ 3 M. La lecture de l'absorbance se fait à 490 nm, 30 min à 2 h après et les concentrations en PF4 des suspensions plaquettaires sont déterminées à partir de la courbe étalon.

4.6.2 Dosage du thromboxane B₂

La concentration en TX B₂ des suspensions plaquettaires a été déterminée en utilisant une trousse de dosage ELISA du commerce (Cayman® ref. 10004023) selon les indications du fabricant. Sur une plaque revêtue d'un anticorps monoclonal de souris anti-IgG de lapin, 100 μ L de la gamme étalon (standard TX B₂) et des spécimens à doser aux dilutions voulues dans du tampon de dilution (tampon EIA) sont déposés. Un traceur constitué d'acétylcholinestérase conjuguée au TX B₂ ainsi qu'un anticorps monoclonal de lapin anti-TX B₂ sont ensuite déposés dans les puits à raison de 50 μ L/puits. Après 2 h d'incubation sous agitation douce et à température ambiante, la plaque est lavée 5 fois avec du tampon de rinçage puis 200 μ L de réactif d'Ellman sont déposés dans les puits. Le temps de développement est d'environ 1 h sous agitation douce dans le noir. La lecture de l'absorbance

se fait à 405 nm. Les concentrations en TX B₂ des suspensions plaquettaires sont déterminées à partir de la courbe étalon et exprimées en ng/mL.

4.7 Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides

4.7.1 Principe du test

Une gamme étalon avec des VP constituées d'un mélange PhtdChol/PhtdSer/PhdtEth 60/20/20 mole% est réalisée dans du TBS (Tris 50 mM, NaCl 175 mM, NaN₃ 0,02 %, pH 7,9) contenant de la BSA à 2 mg/mL. Les dépôts s'effectuent en triple dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb » à raison de 50 µL de spécimen (VP, MVP, plaquettes lavées ou plasma), 50 µL d'un mélange de CaCl₂ 5 mM, FXa (1,2 nM) et FVa (2,4 nM) et 50 µL d'un mélange de FII (6 µM) et de S2238 (0,6 mM) ; (FII, FXa et FVa bovins ; Synapse B.V., Maastricht, Pays-Bas).

Dans ces conditions, l'activité de la prothrombinase est linéaire et dépendante de la quantité de PhtdSer sur une gamme de 2 à 20 %. Après une incubation de 5 min dans le noir et à température ambiante, l'absorbance est lue à 405 nm (lecture cinétique pendant 10 min avec un intervalle de mesure de 30 s). Pour mesurer l'activité phospholipidique au niveau des plaquettes, nous avons extrapolé au temps 0 pour estimer l'activation plaquettaire durant le test. Le taux initial de formation de thrombine a été déterminé par « fitting » des courbes d'absorbance en fonction du temps selon l'équation $y_0 + ax + bx^2$ en prenant la valeur de a comme la valeur initiale. La concentration en phospholipides procoagulants dans les suspensions plaquettaires a été estimée à partir du taux initial de formation de thrombine par référence à la gamme étalon (VP PhtdChol/PhtdSer/PhdtEth 60/20/20 mole%).

Les résultats sont exprimés en nanomolaire équivalents de PhtdSer pour 150 G/L en plaquettes. Le protocole est résumé **Figure 37**.

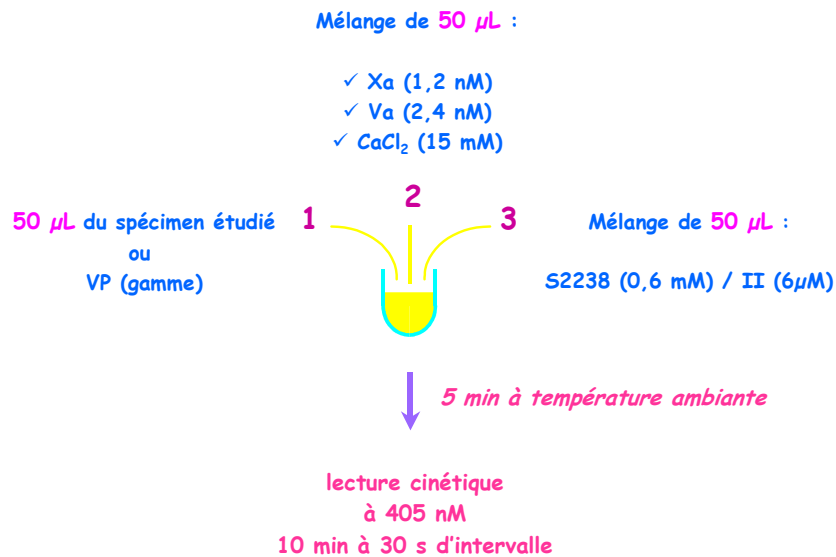


Figure 37 : Protocole pour la mesure de l'activité procoagulante des phospholipides.

4.7.2 Détection d'une activation plaquettaire induite par les AcMm ou des auto-anticorps humains

4.7.2.1 Patients

Du sérum de 4 patients (patients 1 à 4) ainsi que le plasma d'une patiente (patiente 5) diagnostiqués pour une TIH ont été étudiés. Tous les patients ont donné leur consentement informé. Les anticorps anti-PF4 ont été détectés par le test ELISA Asserachrom HPIA (Diagnostica Stago, Asnières, France). Les anticorps anti-IL8 ont été détectés par spectroscopie de résonance plasmonique de surface (SPR) comme décrit par Regnault *et al* [70]. Les auto-anticorps humains sauf pour la patiente 5 ont été purifiés par chromatographie d'affinité (protocole paragraphe 4.1.2.1). Dans le cas de la patiente 5, les tests ont été réalisés avec du plasma préalablement inactivé pendant 30 min à 56°C puis centrifugé à 13000 g pendant 45 min.

4.7.2.2 Détection d'une activation plaquettaire anticorps-dépendante

Un mélange constitué d'anticorps (5 μL d'AcMm à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou 13 μL d'auto-anticorps de patients TIH à 1 mg/mL), d'antigènes (10 μL de FII à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou de $\beta_2\text{GPI}$ à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les AcMm ; 2 μL d'IL8 à 0,001 ng/mL ou héparine à 0,1 U/ mL ou d'un mélange IL8/héparine pour les auto-anticorps) et de 35 μL de plaquettes lavées selon la méthode de Warner *et al* [345] ajustées à 1080 G/L est incubé 1 h à température ambiante sous agitation douce dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb ». Pour le FII, une quantité équimolaire d'hirudine est ajoutée pour neutraliser les traces de thrombine présente dans la solution. Dans

le cas de la patiente 5, le plasma a été incubé 1 h en présence d'une gamme de concentration en IL8 (0 ; 0,00001 ; 0,001, 0,01 et 10 ng/mL) et héparine (0, 0,1 et 0,5 U/mL).

Un blanc composé de 15 µL de HBS-A contenant de la BSA à 5 g/L est également ajouté sur la plaque. L'anticorps activateur plaquettaire ALB6 (10 µg/mL) est utilisé comme contrôle positif. La réaction est très fortement ralentie par ajout de 200 µL de TBS contenant 2 mg/mL de BSA amenant la concentration en plaquettes à 150 G/L préalablement à la quantification de l'activité procoagulante. Pour la détection de la thrombine générée, 50 µL des suspensions plaquettaires sont transférés dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb » pour le dosage de l'activité procoagulante des phospholipides.

4.8 La thrombinographie

4.8.1 Donneurs et patients

Les donneurs, volontaires sains, ont été sélectionnés pour leur génotype préalablement connu, déterminant l'acide aminé en position 131 du récepteur pour le Fc des IgG (FcγRIIIa ou CD32) présent à la surface des plaquettes. Cet acide aminé est soit une arginine (Arg) soit une histidine (His).

Des patients d'une série de 40 patients ayant des aPL, non traités par anticoagulants et étudiés au laboratoire ont été choisis : 2 patients ayant un LA mais pas d'anticorps anti-β₂GPI (LA+/anti-β₂GPI-), 2 patients ayant un LA et des anticorps anti-β₂GPI (LA+/anti-β₂GPI+) et 2 patients ayant des anticorps anti-β₂GPI mais pas de LA (LA-/anti-β₂GPI+). Les patients ont présenté des événements thrombotiques ou d'autres manifestations de SAPL ou bien sont asymptomatiques. Tous les patients ont donné leur consentement informé et le protocole d'étude publié entièrement [9] a été approuvé par le conseil d'éthique régional.

La détermination de la présence de LA est en accord avec les recommandations de la « Société internationale sur la Thrombose et l'Hémostase », en tenant compte des améliorations apportés à Sydney [188]. Une combinaison de tests de coagulation explorant des étapes différentes de la coagulation a été utilisée : le PTT-LA® (Diagnostica Stago, Asnières, France) et le dRVVT (Dade Behring, Marburg, Allemagne).

Les aCL [374] et les anti-β₂GPI [375] sont détectés par des ELISA mis au point au laboratoire à partir de protocoles développés à Genève par G. Reber. La valeur seuil de positivité des aCL été définie au laboratoire par la méthode des percentiles (99^{ème}) à partir de 178 volontaires sains. La valeur seuil de positivité des anti-β₂GPI a également été définie au laboratoire par la méthode des percentiles (99^{ème}) à partir d'au moins 50 volontaires sains.

4.8.2 Préparation des spécimens plasmatiques

Le sang des donneurs est recueilli dans des tubes monovette® (Sarstedt) contenant une solution de citrate 106 mM à raison d'1 volume de citrate pour 9 volumes de sang. La préparation des différents spécimens plasmatiques est réalisée selon les protocoles suivants et résumés sur les **Figures 38 et 39** :

4.8.2.1 Plasma riche en plaquettes = PRP

Le PRP est préparé par centrifugation du sang à 190 g pendant 10 min à 20°C. Le PRP est récupéré et ajusté à 150 G/L par addition de PPP autologue obtenu par centrifugation du sang restant à 1750 g pendant 10 min à 20°C. Il est ensuite étudié dans les 30 min qui suivent la fin de sa préparation.

4.8.2.2 Plasma riche en plaquettes congelé/décongelé = PRPcd

Du PRP à 150 G/L est congelé à -80°C au moins une nuit puis décongelé 15 min à 37°C. Il est ensuite étudié par thrombinographie dans les 30 min qui suivent la décongélation.

Prélèvement du sang des donneurs dans des tubes Sarstedt contenant du citrate 106 mM (1v/9v)

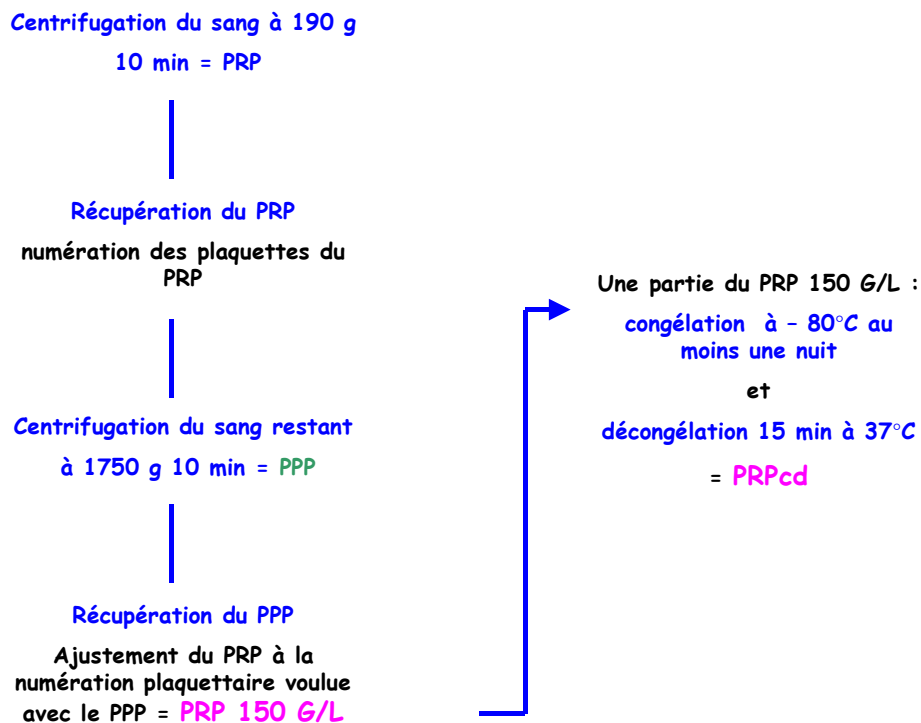


Figure 38 : Méthodes de préparation de spécimens plasmatiques : PRP et PRPcd.

4.8.2.3 Plasma pauvre en plaquettes en présence de microvésicules plaquettaires = PPP/MVP collagène

Le PPP/MVP collagène est obtenu à partir de PRP ajusté à 150 G/L comme décrit plus haut. Les plaquettes du PRP sont incubées 15 min à 37°C avec du collagène de type I (Horm) à 20 µg/mL final puis éliminées par une centrifugation à 1500 g pendant 15 min. Le collagène induit une déstabilisation locale de la membrane après stimulation du récepteur de la thrombine. Il y a inhibition transitoire de l'aminophospholipide translocase qui permet l'exposition des phospholipides anioniques à la surface des plaquettes. Cela aboutit à une émission de microvésicules procoagulantes porteuses de phospholipides anioniques et de complexes glycoprotéiques fonctionnels. Cette méthode de préparation de PPP permet d'obtenir un plasma enrichi en microvésicules plaquettaires formées par un activateur physiologique, le collagène.

4.8.2.4 Plasma pauvre en plaquettes centrifugé à 13000 g = PPP 13000 g

Plusieurs méthodes de préparation du PPP 13000 g ont été étudiées (**Figure 39**).

□ Méthode 1

Le PPP est préparé par centrifugation du sang à 2500 g pendant 10 min à 20°C. Le surnageant est récupéré puis centrifugé à 2500 g pendant 10 min. Le PPP récupéré est centrifugé à 13000 g pendant 30 min à 4°C pour éliminer les microvésicules circulantes et les fragments de surfaces cellulaires. Cette méthode de préparation permet d'obtenir du PPP directement et donc d'éliminer les plaquettes dès la première centrifugation.

□ Méthode 2

Le PRP est préparé par centrifugation du sang à 190 g pendant 10 min à 20°C puis à 1750 g pendant 10 min sans récupération du PRP entre les deux centrifugations. Le PPP est ensuite centrifugé à 13000 g pendant 30 min à 4°C. Dans cette méthode, les plaquettes ne sont pas éliminées à la première centrifugation mais à la deuxième. Cependant la première centrifugation est réalisée à une vitesse plus faible (190 g vs 2500 g pour la méthode 1), ce qui pourrait induire une moindre altération des plaquettes conduisant à une exposition des phospholipides anioniques à leur surface.

□ Méthode 3

Du PRP est préparé par centrifugation du sang à 190 g pendant 10 min à 20°C. Le PRP est récupéré et ajusté à 150 G/L par addition de PPP autologue obtenu par centrifugation du sang restant à 1750 g pendant 10 min à 20°C. Les plaquettes sont incubées 15 min à 37°C avec du A23187 à 10 µM final puis éliminées par une centrifugation à 1500 g pendant 15 min. Le PPP récupéré est centrifugé à 13000 g pendant 30 min à 4°C. La méthode 3 contient une étape d'activation par un agoniste non physiologique A23187 qui permet une activation maximale des plaquettes. Au contraire des deux autres préparations, cette méthode permet de conserver le contenu des granules plaquettaires qui va influencer sur les réactions de coagulation.

Prélèvement du sang des donneurs dans des tubes Sarstedt contenant du citrate 106 mM (1v/9v)

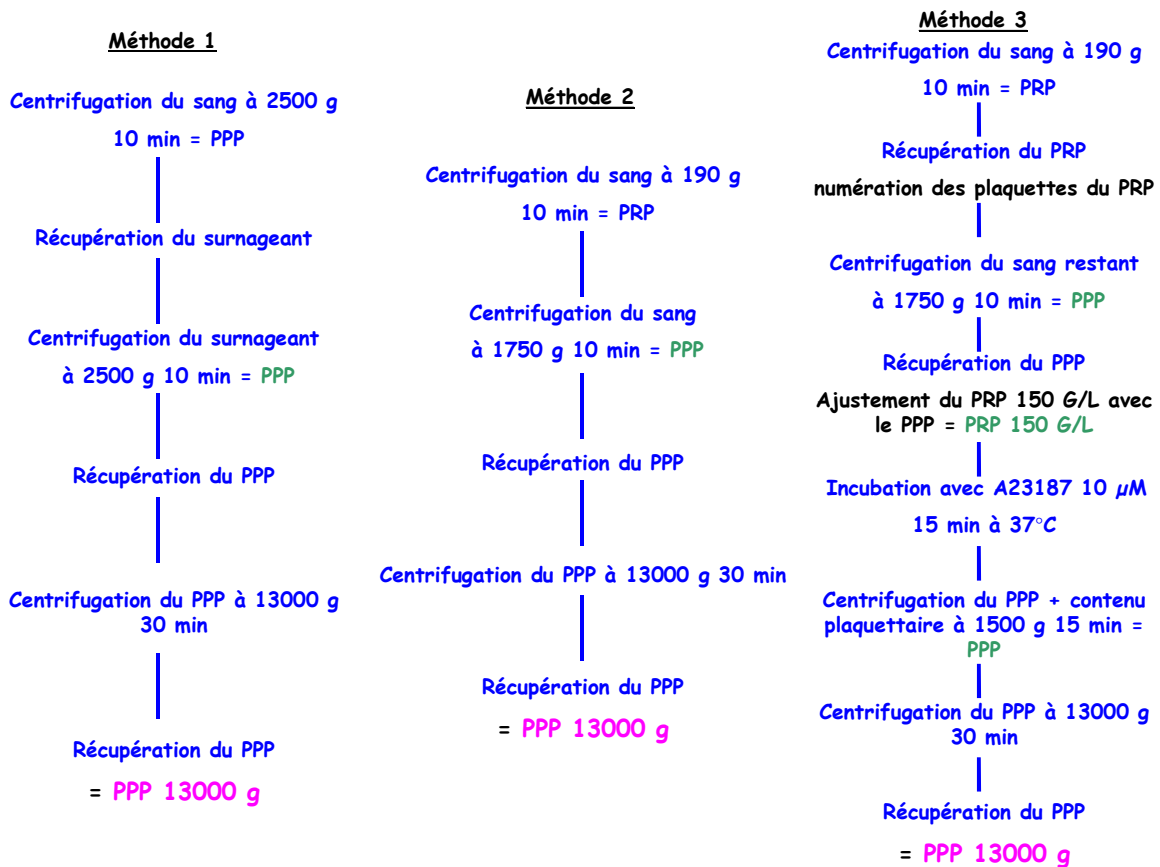


Figure 39 : Méthodes de préparation de PPP 13000 g.

Des mesures d'activité procoagulante des phospholipides ont été réalisées de manière à définir la quantité de phospholipides anioniques présents dans les différentes méthodes de préparations.

4.8.2.5 Dosage du facteur tissulaire utilisé en thrombinographie

La source de FT utilisée en thrombinographie est de l'Innovin[®] de chez Dade Behring (Marburg, Allemagne) dilué au 1/30000. C'est une protéine recombinante relipidée dont la concentration n'est pas donnée par le fournisseur. De manière à avoir une approximation de la concentration en FT utilisée en thrombinographie, nous avons mesuré sa concentration en utilisant un kit ELISA du commerce (Actichrome TF, American Diagnostica, Stamford). Cependant, ce test n'est pas totalement approprié car il a été développé pour quantifier le FT humain circulant. Le dosage a été réalisé selon les indications du fabricant. Les dépôts s'effectuent en double dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb » à raison de 50 μ L de tampon pH 7,4 dans chaque puits, puis de 25 μ L de la gamme étalon constituée de FT lipidé (gamme de 0 à 30 pM) ou de spécimens à doser. Dans chaque puits sont ensuite déposés 25 μ L de FVIIa humain puis 25 μ L de FX humain. Après 15 min d'incubation à 37°C, 25 μ L de substrat sont ajoutés (spectrozyme FXa). La plaque est incubée 20 min à 37°C puis la réaction est stoppée par ajout de 50 μ L d'acide acétique placé préalablement dans de la glace. La lecture de l'absorbance se fait à 405 nm. Les concentrations en FT des spécimens sont déterminées à partir de la courbe étalon et exprimées en pM.

4.8.3 **Conditions de réalisation du test**

Les mesures thrombinographiques sont réalisées dans le fluorimètre Fluoroskan Ascent (Labsystems) avec le logiciel dédié Thrombinoscope[®] version 2.106 (Synapse, Maastricht, Pays-Bas). Un substrat fluorogène de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) ayant des caractéristiques favorables en terme de K_m et de k_{cat} est utilisé. La fluorescence est enregistrée avec une longueur d'onde d'excitation à 390 nm, une longueur d'onde d'émission à 460 nm et un intervalle de mesure de 15 s. La conversion de la fluorescence en concentration molaire de thrombine est effectuée par le logiciel Thrombinoscope[®].

Un calibrant (mélange d'un complexe α_2 -macroglobuline/thrombine humaine ajustée à une activité d'environ 600 nM, avec de l'antithrombine bovine 100 nM et de l'héparine à 2 U/mL) est ajouté sur la plaque. Il sert à corriger les effets de consommation du substrat et de filtre interne ainsi que l'influence de facteurs optiques intrinsèques au plasma, de l'appareillage et des consommables. Il permet également le calcul de la quantité de thrombine générée par conversion des unités de fluorescence obtenues en molarité de thrombine active [6].

Les mesures sont réalisées en triple dans des microplaques 96 puits en polypropylène, fond rond (Greiner). La coagulation est déclenchée par recalcification en présence de FT recombinant humain. Dans chaque puits, aux 80 μ L de plasma, sont ajoutés 5 μ L de HBS-A

contenant de la BSA à 5 g/L, de PCa (préparation locale, [156]) ou de TM (American Diagnostica, Stamford) ; 10 μ L de HBS-A/BSA ou d'AcMm et 5 μ L de FT dans du HBS-A/BSA. Dans le cas de PPP 13000 g comme spécimen plasmatique, 5 μ L de surfaces phospholipidiques à 4 μ M final (MVP ou VP à différentes compositions en PhtdChol/PhtdSer/PhdtEth) et 5 μ L de HBS-A ou d'AcMm sont déposés à la place des 10 μ L de HBS-A/BSA ou d'AcMm. Un puits contenant 20 μ L de calibrant (Synapse B.V., Maastricht, Pays-Bas) et 80 μ L de spécimen plasmatique est inclus dans la plaque pour chaque plasma étudié.

La plaque est placée dans le fluorimètre 5 min avant l'addition par cet appareil de 20 μ L d'un mélange de substrat fluorigène (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem) à 2,5 mM en Hépès 20 mM, pH 7,35 contenant de la BSA à 60 g/L et de CaCl₂ 100 mM. Le protocole pour une étude en thrombinographie est résumé **Figure 40**.

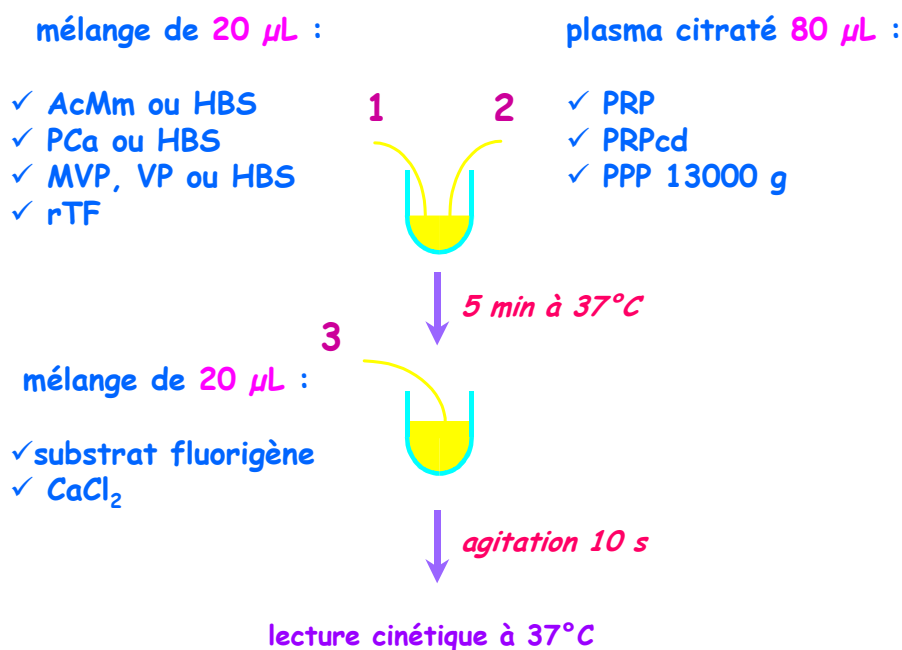


Figure 40 : Protocole pour une étude en thrombinographie.

Les paramètres thrombinographiques, **ETP** et **IC₅₀-PCa** (**Figure 41**), sont calculés comme rapporté paragraphe 2.2.3.1 page 41 et 42.

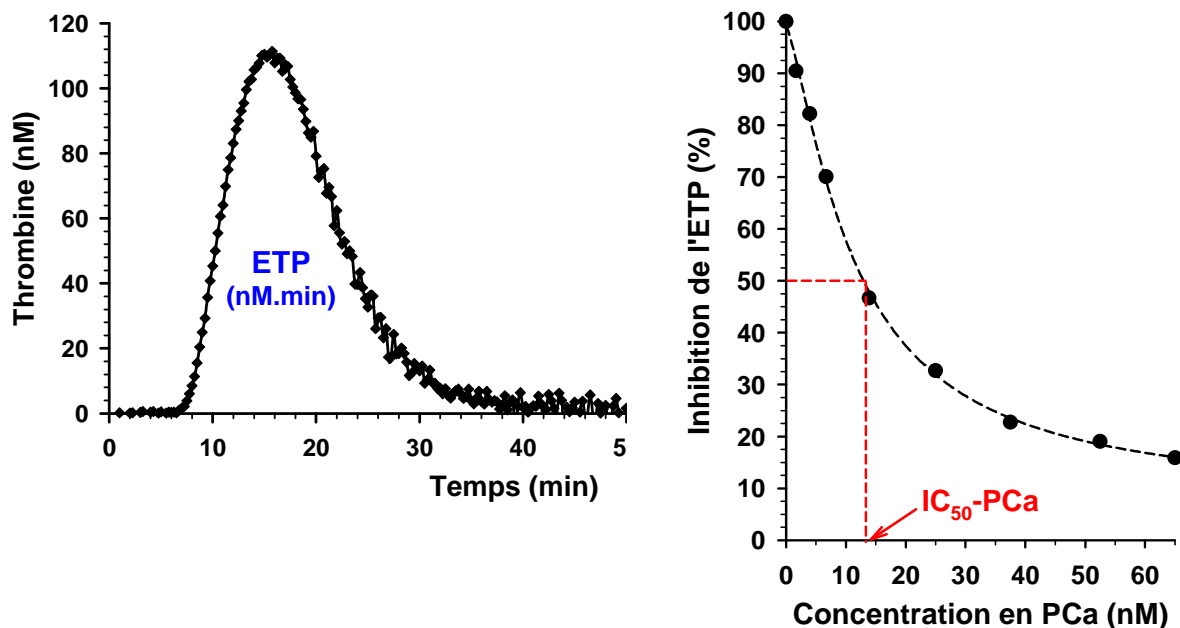


Figure 41 : Paramètres thrombinographiques : ETP et IC_{50} -PCa.

La sensibilité à la PCa dépend du spécimen plasmatique étudié. Elle est plus importante en PPP 13000 g et en PRPcd qu'en PRP. Pour cette raison, les concentrations en PCa étudiées en thrombinographie sont adaptées en fonction du spécimen plasmatique étudié. Les différentes concentrations en PCa ont été choisies de la façon suivante :

- 0,85 nM

Concentration en PCa utilisée uniquement en présence de PPP 13000 g. Des valeurs très faibles de PCa induisent une forte diminution de l'ETP en présence de PPP 13000 g auquel sont ajoutées des VP comme surfaces phospholipidiques. Ainsi, dès les plus faibles concentrations en PCa, l'ETP est quasi nul. De manière à pouvoir néanmoins évaluer la sensibilité à la PCa, une gamme de concentration spécifique à ce spécimen est utilisée (0,85 à 13,9 nM).

- 1,7 nM et 6,7 nM

Ces deux concentrations permettent d'obtenir environ 70 % d'inhibition de l'ETP chez les donneurs sains en PPP 13000 g et PRPcd respectivement (la quantité de PCa conduisant à une inhibition de 70 % est variable selon le spécimen plasmatique [376]).

- 13,9 nM

C'est la concentration utilisée dans le test de coagulation de sensibilité à la PCa décrit par Dahlbäck et al [377].

- 25 nM

Elle correspond à dix fois la concentration maximale en PCa circulante atteinte chez le babouin auquel de la thrombine a été injectée [378].

- 65 nM

C'est la concentration qui correspondrait à l'activation de toute la protéine C plasmatique.

De même, l' IC_{50} -TM qui rend compte de la concentration en TM induisant une réduction de 50 % de l'ETP peut être calculée à partir d'une gamme de concentration en TM allant de 3 à 20 nM quel que soit le spécimen plasmatique.

4.9 Microscopie électronique à balayage

4.9.1 Préparation des échantillons

4.9.1.1 Spécimens plasmatiques

La préparation des spécimens plasmatiques (PRP et PRPcd) est similaire à celle réalisée pour les expériences de thrombinographie (paragraphe 4.8.2). Cependant lors de l'étape de récupération du PRP, de la prostanglandine E_1 (Sigma) à 0,5 μ M final est ajoutée de manière à activer le moins possible les plaquettes.

4.9.1.2 Plaquettes lavées et microvésicules plaquettaires

Les plaquettes humaines lavées sont préparées selon la méthode de Mustard *et al* [371] comme décrit paragraphe 4.3.1. Cependant, les plaquettes ajustées à 600 G/L sont remises en suspension dans une solution Tyrode-BSA contenant de l'apyrase à 0,03 U/mL ainsi que de la prostanglandine E_1 (0,5 μ M). Les MVP sont préparées selon la méthode de Barry *et al* [372] comme décrit paragraphe 4.4.2. Les MVP sont ajustées à 4 μ M final avec du HBS-A contenant de la BSA à 5 g/L.

4.9.2 Fixation des échantillons

Les échantillons sont fixés pendant 1 h à température ambiante dans du glutaraldéhyde (2,5 % v/v, Sigma) dilué dans du tampon Tyrode ajusté à un pH de 7,4 contenant de la BSA à 0,35 % et filtré sur 0,22 μ M. Les échantillons sont ensuite placés au moins une nuit à 4°C.

4.9.3 Microscopie électronique à balayage

Les plaquettes sont déposées sur un filtre monté sur une pompe à air aspirante. Après rinçage dans le tampon Tyrode ajusté à un pH de 7,4, les filtres contenant les plaquettes sont déshydratés par des bains successifs de 5 min dans une série de concentrations croissantes d'alcool (30°,50°,70°,80°,90°,100°) puis traités avec un bain de 10 min d'hexaméthylsilazane et séchés sous hotte aspirante. Les plaquettes sont ensuite fixées sur

un support aluminium avec une colle au carbone et métallisées à l'or-palladium (Spotter Coater SC7640). Les échantillons sont observés avec un microscope électronique à balayage (Cambridge Instruments Stereoscan S240).

4.10 Impact de la composition en surfaces phospholipidiques sur les réactions pro- et anticoagulantes

4.10.1 Mesure de la génération de thrombine

La mesure de génération de thrombine en fonction de la composition en surface phospholipidique est réalisée par mesure de l'activité procoagulante des phospholipides détaillée paragraphe 4.7.1 avec quelques modifications. Les surfaces phospholipidiques (VP ou MVP) déposées dans les puits sont ajustées à une concentration de 4 nM. Les résultats sont exprimés en variation d'absorbance en fonction du temps (Δ absorbance/s).

4.10.2 Mesure d'inactivation du FVa par la PCa

La mesure de l'inactivation du FVa par la PCa est réalisée à partir de facteurs purifiés humains et s'effectue en plusieurs étapes :

- (1) Un mélange de 350 μ L de tampon Hépès 25 mM, NaCl 175 mM, CaCl₂ 3 mM, pH 7,35 contenant de la BSA à 5 mg/mL, du FVa en quantité limitée (1 nM ; Synapse BV, Maastricht) et 50 μ M de VP dont la composition varie en PhtdChol/PhtdSer/PhdtEth (60/20/20, 60/30/10, 60/10/30, 80/10/10, 80/20/0 ou 80/0/20 mole%) est incubé à 37°C pendant 10 min en présence ou non de PS (490 nM). L'inactivation du FVa débute lors de l'ajout de la PCa (0,2 nM) au mélange.

- (2) En parallèle, des mélanges de 230 μ L de tampon Tris 50 mM, NaCl 175 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7,9 contenant de la BSA à 0,5 mg/mL, des VP à 100 μ M (PhtdChol/PhtdSer/PhdtEth 60/20/20, 60/30/10, 60/10/30, 80/10/10, 80/20/0 ou 80/0/20 mole%) et du FII (0,5 μ M ; Synapse BV, Maastricht) sont préchauffés à 37°C. Du FXa (Synapse BV, Maastricht) à 5 nM (10 μ L) est ajouté 15 s avant l'ajout des 10 μ L de FVa du mélange précédent déclenchant ainsi l'activation du FII.

La diminution de l'activation du FVa est déterminée sur des fractions de 10 μ L prélevées à des temps différents (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 7 ; 10 ; 15 ; 20 et 25 min) sur une période de 25 min. La quantité de FVa présente est déterminée via son activité cofacteur dans l'activation du FII par le FXa (complexe prothrombinase).

- (3) Après 1 min d'incubation, 5 μ L sont prélevés et ajoutés dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb » à 105 μ L de tampon Tris 50 mM, NaCl 175 mM, EDTA 20 mM, pH 7,9 contenant de la BSA à 0,5 mg/mL de manière à stopper la réaction. Les dépôts sont effectués en double.
- (4) L'inactivation du FVa est déterminée par mesure de la quantité de thrombine formée 1 min après l'ajout de 40 μ L de substrat S2238 à 0,235 nM dans chaque puits.

L'absorbance est lue à 405 nm (lecture cinétique pendant 10 min avec un intervalle de mesure de 30 s). L'inactivation du FVa est déterminée par détermination de l'activité de la prothrombinase. Pour cela la variation d'absorbance initiale en fonction du temps a été calculée en déterminant le taux initial de formation de thrombine par « fitting » des courbes d'absorbance en fonction du temps selon l'équation $y_0 + ax + bx^2$ en prenant la valeur de a comme la valeur initiale. Les résultats sont exprimés en % d'inactivation du FVa en fonction du temps de manière à s'affranchir des variabilités de valeurs d'absorbance inter-expériences.

4.11 La résonance plasmonique de surface

4.11.1 Instrumentation

Les mesures de SPR sont réalisées avec un appareil Biacore X (Biacore, Uppsala, Sweden) à une température de 25°C. Le tampon de course utilisé dans toutes les expériences est du HBS-C (Hépès 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) en présence ou non de calcium à 2 mM. Les AcMm injectés sont dilués dans du HBS-C en présence de carboxymethyl-dextran (1 mg/mL) pour diminuer les liaisons non spécifiques. Les expériences sont réalisées en double. Les résultats sont exprimés en unité de résonance (RU). Une RU correspond à un changement de masse à la surface de 1 pg de protéine/mm². Ils sont analysés avec le logiciel biaevalue 3.2 RC1 (Biacore, Uppsala, Sweden). Les constantes d'association et de dissociation sont calculées selon Karlsson *et al* [379].

4.11.2 Détermination de constantes cinétiques

Pour déterminer les constantes d'association et de dissociation des AcMm, les protéines ; (FII, PCa et β_2 GPI) sont couplées de façon covalente par leurs fonctions amines à la surface d'un biocapteur CM5 (Biacore, Uppsala, Sweden). Les fonctions carboxyles du dextran du

biocapteur sont activées par un mélange de 35 μL de N-hydroxysuccimide (NHS) 0,05 M et 35 μL de N-ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) 0,2 M à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les protéines (50 μL à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluées en tampon acétate de sodium 0,01 mM pH 5 (pH inférieur au pI des protéines) sont ensuite injectées à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les groupements réactifs NHS-ester restant libres sont bloqués par injection de 30 μL d'éthanolamine 1 M pH 8,5 à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Les AcMm sont injectés (40 μL à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$) à différentes concentrations (31,5 à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) à la surface du biocapteur avec régénération entre les différentes injections ou bien sans régénération mais avec un délai de 120 s entre les deux injections. Le biocapteur est régénéré par injection de 5 μL de NaCl 1 M – NaOH 10 mM. Les liaisons non spécifiques des AcMm sont éliminées par soustraction du signal obtenu sur le canal de référence où les fonctions carboxyles du dextran, activées par le mélange NHS-EDC sont saturées par l'éthanolamine.

4.11.3 Interaction des AcMm, de leur antigène et des complexes

AcMm/Antigène avec des surfaces physiologiques

La capacité de fixation de la $\beta_2\text{GPI}$, du FII, des AcMm anti- $\beta_2\text{GPI}$ et anti-FII ainsi que des complexes anti- $\beta_2\text{GPI}/\beta_2\text{GPI}$ et anti-FII/FII sur des plaquettes lavées humaines et des MVP a été déterminée par immobilisation de ces surfaces phospholipidiques sur un biocapteur L1.

Le biocapteur L1 fournit une matrice de dextran sur laquelle des résidus hydrophobes sont liés de façon covalente rendant la surface appropriée pour la liaison de membranes lipidiques. Les phospholipides sont capturés par insertion des résidus hydrophobes dans la membrane phospholipidique résultant en une surface lipidique stable. Après un lavage du biocapteur avec 100 μL de n-octyl- β -D-glucopyranoside (40 mM) à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ suivi d'un rinçage avec du HBS-C contenant 2 mM de calcium, 20 μL de plaquettes lavées (ajustées à 300 G/L) ou de MVP (810 μM équivalent PhtdSer) sont injectées à un débit de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ de manière à obtenir une liaison des phospholipides d'environ 4500 RU. En parallèle, un canal contrôle est réalisé avec des VP composées seulement de PhtdChol de manière à évaluer les liaisons non spécifiques. L'excès de phospholipides injectés est éliminé par injection à un débit de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ de 20 μL de NaOH 25 mM. Pour vérifier l'absence d'activation des plaquettes lavées lors de leur immobilisation, une mesure de la liaison d'annexine V (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) est réalisée. L'AcMm à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (anti- $\beta_2\text{GPI}$ ou anti-FII), l'antigène à sa concentration plasmatique (200 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour la $\beta_2\text{GPI}$ et le FII respectivement) et les

complexes (anti- β_2 GPI/ β_2 GPI ou anti-FII/FII ; 200 μ g/mL pour les AcMm ; 200 et 100 μ g/mL pour la β_2 GPI et le FII respectivement) sont ensuite injectés à un débit de 10 μ L/min (20 μ L). Pour les expériences réalisées avec les plaquettes lavées, une nouvelle immobilisation de plaquettes entre chaque cycle est effectuée. La régénération du biocapteur est obtenue par injection de 20 μ L de NaOH 25 mM à un débit de 100 μ L/min, puis de 100 μ L de n-octyl- β -D-glucopyranoside (40 mM) à 10 μ L/min suivis d'un rinçage en HBS-C. Concernant les MVP, une seule immobilisation est réalisée et le biocapteur est régénéré entre chaque cycle par injection de 5 μ L de NaOH 25 mM.

4.11.4 Interaction de facteurs de la coagulation avec des surfaces phospholipidiques

Pour déterminer la fixation du FII et de la PCa sur différentes surfaces phospholipidiques, des préparations de VP à des compositions différentes en PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth et des MVP sont immobilisées sur un biocapteur L1 comme décrit précédemment mais avec quelques modifications. Les VP sont injectées à 2,5 mM et les MVP à 810 μ M équivalents PhtdSer à un débit de 2 μ L/min. La PCa et le FII (20 μ L) sont injectées à un débit de 10 μ L/min, à 5 concentrations différentes (27,5 ; 56 ; 111 ; 223 et 446 nM pour la PCa et 31 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 nM pour le FII) sans régénération entre les différentes injections et avec un délai de 120 s pour le retour à la ligne de base. La surface phospholipidique est régénérée par injection de 20 μ L de NaCl 1 M – NaOH 10 mM entre deux cycles.

4.11.5 Réalisation d'une carte épitopique

Dans le but d'affiner la spécificité épitopique des AcMm anti- β_2 GPI dirigés contre le domaine I de la protéine, deux méthodes ont été utilisées pour déterminer la capacité de paires d'AcMm à se lier simultanément à la β_2 GPI.

4.11.5.1 1^{ère} méthode

Des anticorps de lapin anti-Fc de souris (RAMFc) sont couplés de façon covalente par leurs fonctions amines à la surface d'un biocapteur CM5 (Biacore, Uppsala, Sweden) préalablement activé comme décrit paragraphe 4.11.2. Trente cinq microlitres de RAMFc à 30 μ g/mL dilués dans du tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 5 sont injectés à un débit de 5 μ L/min. Les groupements NHS-ester restants sont ensuite bloqués puis 3 injections de 10 μ L d'acide formique 1 M à 5 μ L/min sont réalisées. (Procédure d'immobilisation recommandée par Biacore).

La carte épitopique est déterminée par la capacité de paires d'anticorps à se lier simultanément à la β_2 GPI : le premier AcMm (15 μ L) est injecté à la concentration de 50 μ g/mL sur le RAMFc suivi par l'injection de 25 μ L d'AcMm non spécifique (IgG murine, Calbiochem) à 50 μ g/mL pour bloquer les sites restés libres sur le RAMFc. De la β_2 GPI purifiée (15 μ L, Diagnostica Stago) est ensuite injectée à 10 μ g/mL. Au final, 15 μ L du second AcMm à 50 μ g/mL sont injectés. Les expériences sont réalisées à un débit de 5 μ L/min. Le biocapteur est régénéré avec 5 μ L de HCl 100 mM entre les combinaisons étudiées.

Le ratio molaire de liaison de la β_2 GPI au premier AcMm à la surface de la RAMFc est calculé par :

$$[\text{RU } \beta_2\text{GPI} / \text{RU } 1^{\text{er}} \text{ AcMm}] \times [\text{masse moléculaire } 1^{\text{er}} \text{ AcMm} / \text{masse moléculaire } \beta_2\text{GPI}]$$

Le ratio molaire de liaison du second AcMm à la β_2 GPI est calculé par :

$$[\text{RU } 2^{\text{ème}} \text{ AcMm} / \text{RU } \beta_2\text{GPI}] \times [\text{masse moléculaire } \beta_2\text{GPI} / \text{masse moléculaire } 2^{\text{ème}} \text{ AcMm}]$$

4.11.5.2 2^{ème} méthode

La β_2 GPI est couplée de façon covalente par ses fonctions amines à la surface d'un biocapteur CM5 (Biacore, Uppsala, Sweden) préalablement activé comme décrit paragraphe 4.11.2. La carte épitopique est déterminée par la capacité de paires d'anticorps à se lier simultanément à la β_2 GPI : le premier AcMm (15 μ L) est injecté à la concentration de 50 μ g/mL suivi de l'injection de 15 μ L du second AcMm à 50 μ g/mL. Les expériences sont réalisées à 5 μ L/min et le biocapteur est régénéré entre chaque cycle par injection de 5 μ L de NaCl 1 M – NaOH 10 mM.

4.12 Analyse en cytométrie en flux

Toutes les expériences sont réalisées à température ambiante. Dix microlitres de plaquettes lavées selon la méthode de Warner *et al* [345] (protocole paragraphe 4.3.1) sont ajoutées à 40 μ L de TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 contenant 1% de BSA).

Les expériences sont réalisées dans le but de vérifier une absence d'activation des plaquettes. L'exposition de PhtdSer à la surface des plaquettes est déterminée à partir de la mesure du pourcentage de cellules positives à l'annexine V marquée avec du FITC (^{FITC}annexine V). Pour cela, les plaquettes sont incubées 10 min, en présence de calcium 2 mM, avec 50 μ L ^{FITC}annexine V. Les plaquettes positives pour l'annexine V sont considérées comme activées. D'autre part un double marquage CD63 et CD62P a été réalisé comme autre marqueur

d'activation plaquettaire. CD63 est exprimé à la surface des granules δ et CD62P à la surface des granules α .

Les suspensions de plaquettes sont lavées à l'aide de TBS-BSA et analysées avec un cytomètre en flux FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) en utilisant le logiciel Cell Quest.

5 RESULTATS

5.1 Méthodologie de l'étude

5.1.1 Quantification du facteur tissulaire utilisé en thrombinographie

FT				
Dilutions	1 ^{ère} fraction	2 ^{ème} fraction	3 ^{ème} fraction	4 ^{ème} fraction
1/750	7031	6944	6944	6767
1/1500	6855	7470	7383	6153
1/3000	8262	7734	7734	7734
1/6000	7734	7734	8436	8784
Moyenne	7471	7470	7624	7360

Moyenne ± écart type : 7481 ± 109

Tableau XII : Dosage du FT.

Les résultats sont exprimés en pM

Le FT est utilisé en thrombinographie à la dilution 1/30000. De manière à avoir une approximation de sa concentration, nous l'avons mesuré en utilisant un kit ELISA du commerce. A partir de 4 fractions différentes de FT (lot n° 526961) et de 4 dilutions différentes par fractions, nous avons trouvé que la dilution du FT au 1/30000 correspondait à une concentration de 0,25 pM.

5.1.2 Les spécimens plasmatiques étudiés en thrombinographie

Plusieurs spécimens plasmatiques peuvent être étudiés en thrombinographie (**Figure 50**). Selon le spécimen plasmatique étudié, des variations des paramètres du thrombinogramme sont observées. Ces variations de génération de thrombine sont dépendantes de la nature des phospholipides apportés dans le système par les différents spécimens plasmatiques.

Les résultats présentés **Figure 42** ont été obtenus à partir d'un donneur volontaire sain. L'utilisation de PRP et de PRPcd en thrombinographie permet d'avoir une surface cellulaire d'origine plaquettaire. Comparé au PRP, en PRPcd les phospholipides procoagulants sont disponibles dès le début de la réaction ce qui induit un raccourcissement de la phase d'initiation de génération de thrombine (4,2 min vs 8,2 min en PRP) ainsi qu'une augmentation de l'ETP (1888 vs 1734 nM.min) et du pic de thrombine (254 nM vs 119 nM en

PRP). L'étude de PPP 13000 g nécessite l'addition de surfaces phospholipidiques. Comparé au MVP, l'ajout de VP se traduit par un allongement de la phase d'initiation de génération de thrombine (8,1 min vs 5,2 min en présence de MVP) ainsi qu'une réduction de l'ETP (1134 vs 1881 nM.min) et du pic de thrombine (123 nM vs 182 nM). Les variations des paramètres thrombinographiques entre les différents spécimens plasmatiques montre que l'apport de surface cellulaire est un facteur déterminant pour l'étude de l'activité de la thrombine.

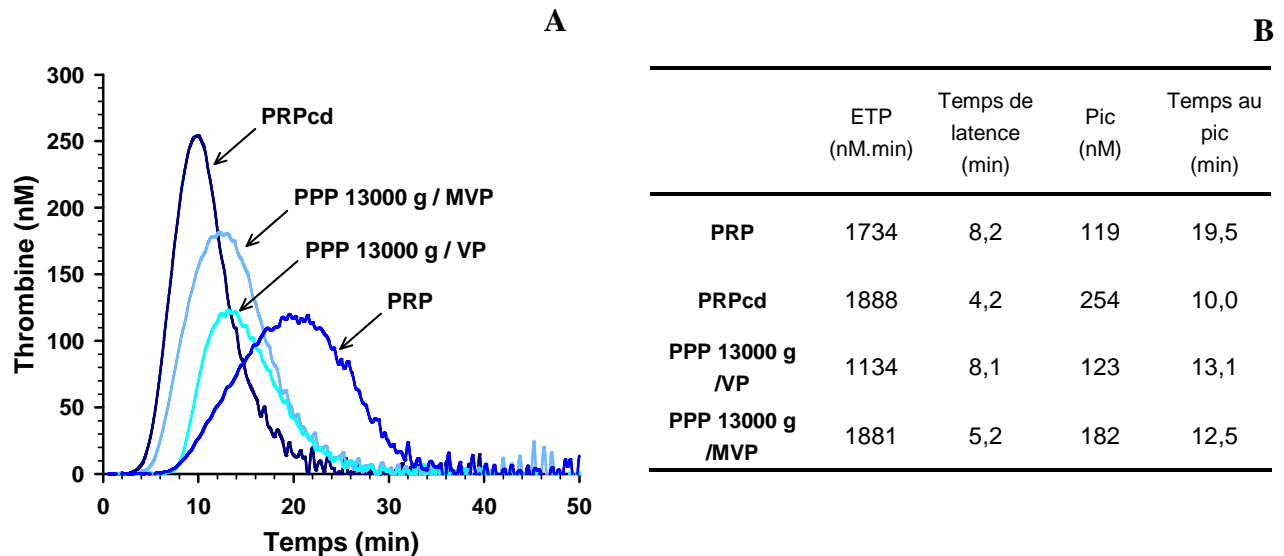


Figure 42 : Spécimens plasmatiques étudiés en thrombinographie.
(A) thrombinogrammes (B) paramètres thrombinographiques.

5.1.3 Etude du système de la protéine C en thrombinographie

Les conditions expérimentales de la thrombinographie ne prennent pas en compte la participation endothéliale dans l'inhibition de la thrombine. De manière à pouvoir étudier la sensibilité du système de la PC en thrombinographie, de la PCa exogène ou de la TM peuvent être ajoutées dans le système.

5.1.3.1 Protéine C activée

La **Figure 43** représente des thrombinogrammes typiques de volontaires sains obtenus avec du PRP (A), du PRP cd (B) et du PPP 13000 g avec des MVP comme surface phospholipidique (C) en présence d'une gamme de concentration en PCa variant de 0 à 25 ou 65 nM en fonction des spécimens plasmatiques.

L'addition de PCa en thrombinographie se traduit par un allongement de la phase d'initiation de génération de thrombine. Cela s'explique par le fait que la PCa présente dès le début de la

réaction agit directement en inhibant la génération de thrombine. Physiologiquement, la PCa a besoin d'être activée par la thrombine avant de pouvoir induire son effet anticoagulant.

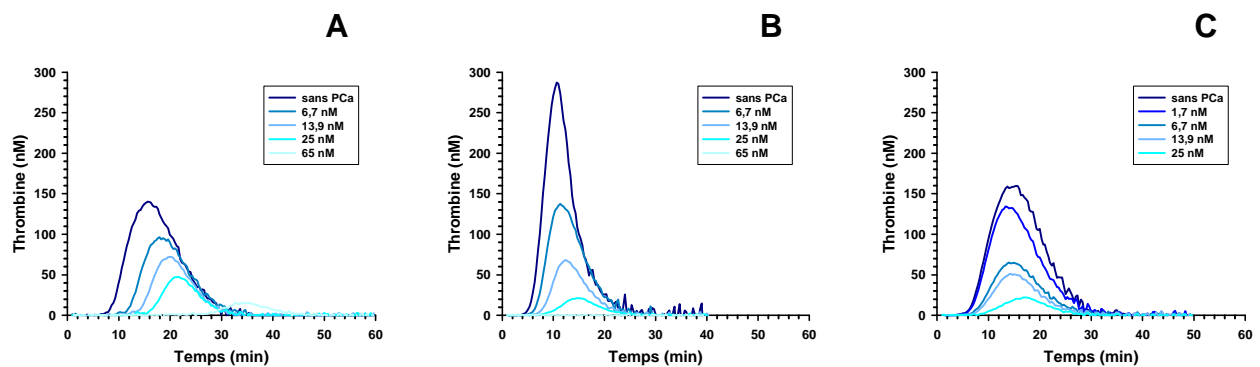


Figure 43 : Influence de l'addition de PCa en thrombinographie.
(A) PRP, (B) PRPcd et (C) PPP 13000 g en présence de MVP de sujet sain.

Quel que soit le spécimen plasmatique étudié, une diminution de la génération de thrombine est observée lors de l'addition de PCa et ce de manière concentration dépendante. Cependant l'effet anticoagulant de la PCa est variable selon les spécimens plasmatiques.

Le PRP et le PRPcd sont moins sensible à l'addition de PCa dans le système que le PPP 13000 g ($IC_{50-PCa} = 13,9$ et $7,7$ nM pour le PRP et le PRPcd respectivement et $4,7$ nM pour le PPP 13000 g). La présence de plaquettes semble jouer un rôle important en diminuant l'efficacité de la PCa. De plus, une inhibition de l'ETP d'environ 70 % est observée pour des concentrations en PCa aux alentours de 25 nM pour le PRP, de 13,4 nM pour le PRPcd et de 6,7 nM pour le PPP 13000 g.

Ainsi, lors d'une étude en thrombinographie des gammes de concentration en PCa adaptées aux surfaces étudiées sont utilisées : de 0 à 65 nM en PRP et PRPcd et de 0 à 25 nM en PPP 13000 g.

5.1.3.2 Thrombomoduline

L'ajout de TM en thrombinographie permet d'étudier l'activation de la PC endogène et de mettre ainsi en évidence une altération de l'activation du système. En cas d'altération de la conversion de PC, l'addition de TM dans le système n'aura pas d'effet sur le thrombinogramme alors que l'addition de PCa induira une réduction de l'ETP.

Des thrombinogrammes typiques de ceux obtenus avec du PRP (A) et du PPP 13000 g avec des MVP comme surface phospholipidique chez un sujet sain en présence d'une gamme de concentration en TM allant de 0 à 20 nM sont présentés **Figure 44**.

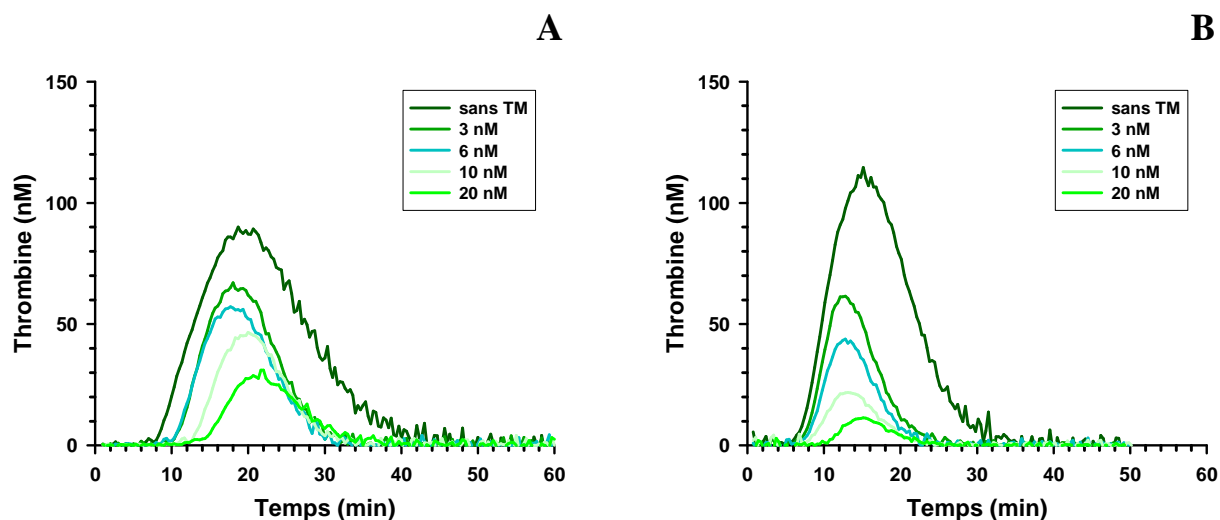


Figure 44 : Influence de l'addition de TM en thrombinographie.
 (A) PRP et (B) PPP 13000 g de sujet sain.

Comme observé avec l'ajout de PCa, une diminution de la génération de thrombine est également observée lors de l'addition de TM dans le système et ce de manière concentration dépendante (**Figure 44**). Le PRP est moins sensible à l'addition de TM dans le système que le PPP 13000 g ($IC_{50-PCa} = 7,1$ et $3,8$ nM pour le PRP et le PPP 13000 g respectivement).

5.1.4 Microscopie électronique

Les réactions de coagulation ont lieu au niveau de surfaces phospholipidiques anioniques. La qualité, quantité ainsi que la composition en phospholipides sont donc déterminantes. Dans le but de mieux caractériser les surfaces phospholipidiques apportées par les différents spécimens plasmatiques étudiés en thrombinographie, une analyse de la morphologie des plaquettes a donc été réalisée en microscopie électronique à partir de PRP avant et après un cycle de congélation à -80 °C décongélation à 37 °C. Les images sont présentées **Figure 45**.

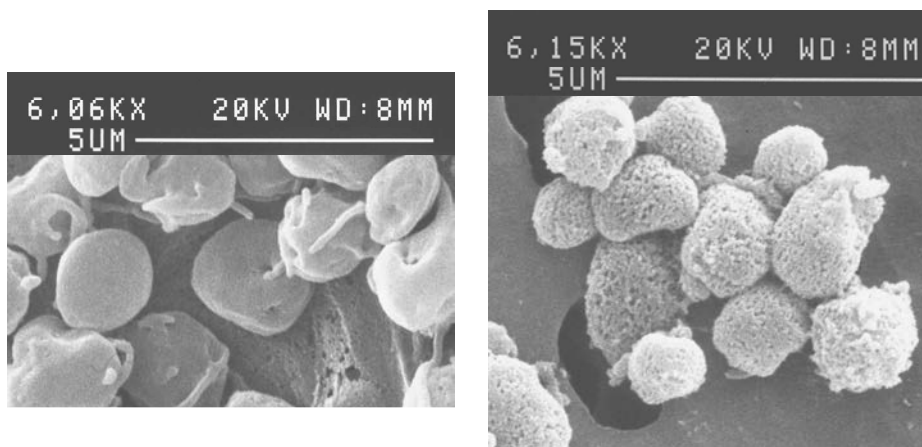


Figure 45 : Plaquettes en PRP observées en microscopie électronique à balayage.
 PRP avant (gauche) et après (droite) un cycle de congélation à -80 °C décongélation à 37 °C.

Les images de microscopie permettent d'observer qu'en PRP (image de gauche), les plaquettes sont non activées sous forme discoïde. Quelques plaquettes commencent à présenter des pseudopodes. En PRPcd, les plaquettes sont encore en forme de cellules et non de débris cellulaires comme cela pourrait être envisagé suite à un cycle de congélation à – 80 °C. Néanmoins, leur aspect en forme d'éponge montre que le cycle de congélation/décongélation a induit des changements morphologiques irréversibles.

L'étude de PPP 13000 g en thrombinographie nécessite l'apport de surfaces phospholipidiques pour la coagulation. L'étape ultime de l'activation plaquettaire consiste en la génération de MVP. Ces MVP pouvant être apportées comme surface au PPP 13000 g, leur morphologie a également été observée en microscopie électronique comme le montre la **Figure 46**. Les MVP ont une taille environ 10 à 100 fois plus petite que les plaquettes.

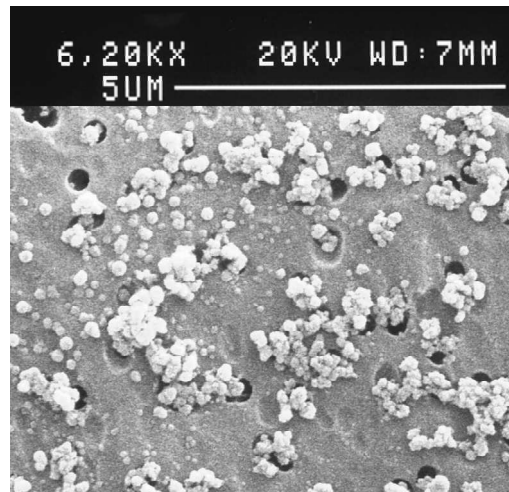


Figure 46 : Microvésicules plaquettaires observées en microscopie électronique à balayage.

5.1.5 Quantification de la quantité de phospholipides procoagulants présents dans différents spécimens plasmatiques

La génération de thrombine est dépendante de la quantité des phospholipides anioniques apportés dans le système. Une quantification des phospholipides procoagulants apportés par les différents spécimens plasmatiques étudiés en thrombinographie a donc été réalisée.

5.1.5.1 Influence de la préparation du PPP 13000 g sur la quantité de phospholipides procoagulants apportés

Plusieurs méthodes de préparations du PPP 13000 g ont été envisagées (voir paragraphe 4.8.2.4).

La quantité de phospholipides procoagulants présents dans ces différentes préparations de PPP 13000 g a été mesurée. Cette quantification a été réalisée avec au moins deux donneurs de façon à tenir compte d'une variabilité inter-donneur. Une synthèse des résultats (moyenne \pm SEM) est présentée dans le **Tableau XIII**. Les résultats sont exprimés en μ M d'équivalents PhtdSer.

Méthode d'obtention du PPP 13000 g	Donneur 1	Donneur 2	Donneur 3	Donneur 4
double centrifugation à 2500 g puis centrifugation à 13000 g	0,067 \pm 0,007	0,068 \pm 0,008	-	-
centrifugation à 190 g suivi d'une centrifugation à 1750 g puis centrifugation à 13000 g	0,051 \pm 0,004	0,046 \pm 0,011	0,068 \pm 0,003	0,070 \pm 0,005
centrifugation à 190 g suivi d'une centrifugation à 1750 g incubation avec A23187 et centrifugation à 1500 g puis centrifugation à 13000 g	0,131 \pm 0,015	0,161 \pm 0,006	-	-

Tableau XIII : Mesure de la quantité de phospholipides procoagulants présents dans le PPP 13000 g en fonction du protocole de préparation.

Les résultats (moyenne \pm SEM ; n = 2 ou 3) sont exprimés en μ M d'équivalents PhtdSer par comparaison avec une gamme de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 mole%.

L'utilisation de centrifugations à 190 g puis à 1750 g avant la centrifugation à 13000 g tend à générer moins de résidus cellulaires procoagulants dans le PPP que les 2 centrifugations à 2500 g bien que la différence entre les deux préparations ne soit pas significativement différente pour les deux donneurs.

La méthode de préparation du PPP 13000 g comportant une étape d'incubation du plasma (PRP ajusté à 150 G/L avec le PPP autologue) en présence d'un ionophore calcique génère des surfaces procoagulantes plus importantes que les deux autres préparations (0,131 \pm 0,015 vs 0,067 \pm 0,007 ; p = 0,0007 pour le donneur 1 et 0,161 \pm 0,006 vs 0,068 \pm 0,008 pour le donneur 2 ; p = 0,0004).

Le protocole de préparation (centrifugation à 190 g puis une centrifugation à 1750 g avant la centrifugation à 13000 g) tendant à apporter le moins de phospholipides procoagulants susceptibles de modifier la cinétique de génération de thrombine a été retenu comme mode de préparation du PPP 13000 g pour toutes les expériences suivantes nécessitant l'utilisation de ce spécimen.

5.1.5.2 Comparaison de la quantité de phospholipides procoagulants apportés par les différents spécimens plasmatiques

La quantité de phospholipides procoagulants présents dans les différents spécimens plasmatiques a été déterminée. Cette quantification a été réalisée en PRP et PRPcd sur un peu plus d'une vingtaine de plasmas de donneurs volontaires sains de façon à tenir compte d'une variabilité inter-donneurs. En PPP et PPP 13000 g seuls 4 donneurs ont été étudiés. Les résultats (valeurs extrêmes) sont présentés **Tableau XIV** et exprimés en μM d'équivalents PhtdSer.

Spécimens plasmatiques	PRP	PRPcd	PPP	PPP 13000 g
Phospholipides procoagulants (μM d'équivalents PhtdSer)	0,11 à 0,23	4 à 30	0,29 à 0,65	0,05 à 0,07

Tableau XIV : Mesure de la quantité de phospholipides procoagulants apportés par les différents spécimens plasmatiques.

Les résultats (valeurs extrêmes) sont exprimés en μM d'équivalents PhtdSer par comparaison avec une gamme de VP composées de 60/20/20 mole% PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth.

Les différents spécimens plasmatiques apportent des quantités différentes de surfaces phospholipidiques anioniques et variables selon les donneurs. Le PRPcd apporte plus de phospholipides procoagulants que le PRP, du fait du cycle de congélation à -80°C décongélation à 37°C qui expose les phospholipides anioniques à la surface. L'absence de centrifugation du PPP à 13000 g apporte une quantité importante de phospholipides qui peut varier du simple au double selon le donneur (0,29 à 0,65 μM). Pour cette raison une centrifugation à 13000 g est réalisée dans toutes les expériences avec le PPP.

5.1.5.3 Comparaison de l'effet et de la concentration de différentes surfaces phospholipidiques sur l'activité de la thrombine

Nous avons comparé en thrombinographie, la capacité des VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 mole% ou de MVP à servir de surface phospholipidique pour la coagulation avec du PPP 13000 g. Classiquement il est utilisé en thrombinographie une concentration en VP de 4 μM lors de l'étude de PPP 13000 g. De manière à étudier un effet concentration dépendant de l'addition de VP, nous avons étudié 4 concentrations, 1, 4, 8 et 12 μM . Nous avons également étudié en parallèle 5 concentrations en MVP, 4, 8, 12, 24 et 36 μM d'équivalents PhtdSer final. Les concentrations en MVP ont

été choisies de manière à se situer dans la fourchette des valeurs observées en PRPcd (des valeurs de l'ordre de 4 à 30 μM en phospholipides procoagulants ont été quantifiées ; voir plus haut).

La **Figure 47** montrent l'effet de l'ajout de VP comme surfaces phospholipidiques sur la génération de thrombine en absence de PCa chez un sujet sain.

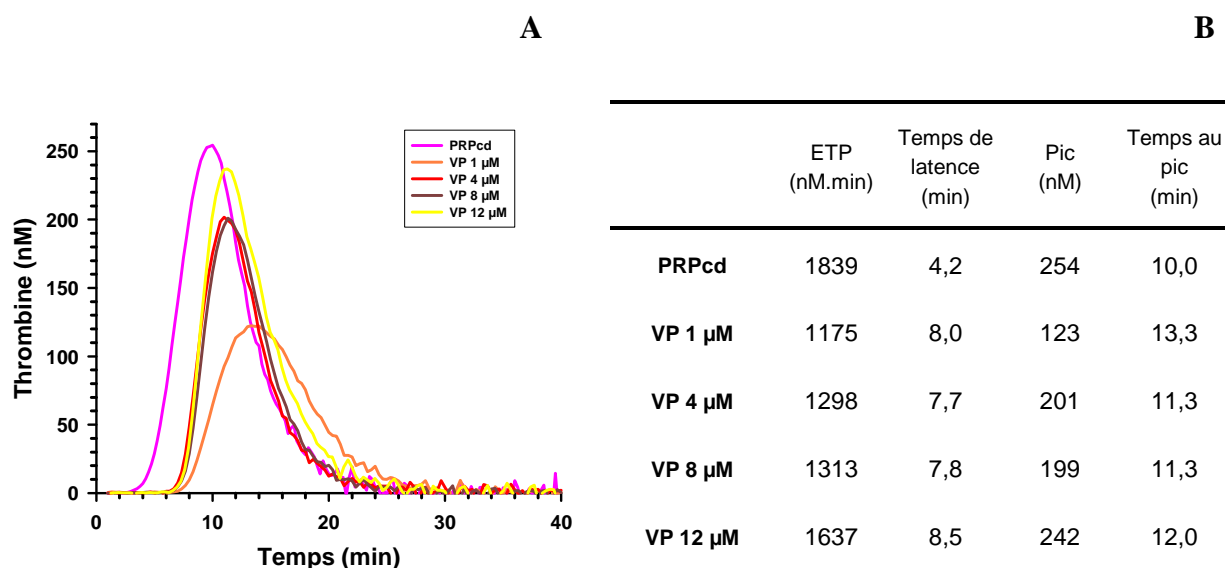


Figure 47 : Influence de la présence de VP à différentes concentrations ajoutées à du PPP 13000 g en thrombinographie.

(A) thrombinogrammes (B) paramètres thrombinographiques.

Comparée au PRPcd, un allongement d'un facteur 2 de la phase d'initiation est observé quelle que soit la concentration en VP utilisée. La comparaison entre les différentes concentrations utilisées montre un effet concentration dépendant sur l'activité de la thrombine générée. A la concentration de 1 μM , un allongement de la phase d'initiation, une concentration maximale en thrombine moins importante, ainsi qu'une augmentation du temps de travail total de la thrombine sont observés. A 12 μM , une augmentation de la concentration maximale en thrombine est observée par comparaison aux concentrations de 4 et 8 μM (242 nM vs 201 et 199 nM). En comparaison avec le PRPcd, les valeurs d'ETP₀ sont plus faibles quelle que soit la concentration en VP (1839 nM vs 1637 nM.min pour le PRPcd et le PPP 13000 g en présence de VP 12 μM). Néanmoins, la concentration en VP interfère sur les valeurs d'ETP₀. Ainsi des valeurs d'ETP₀ de 1175, 1298, 1313 et 1637 nM.min ont été observées pour des concentrations en VP de 1, 4, 8 et 12 μM .

L'effet de l'ajout de VP comme surface phospholipidique sur la coagulation a également été étudié en présence de PCa. Les résultats obtenus **Figure 48** sont la moyenne de 3 à 5 expériences réalisées en présence de PPP 13000 g de sujet sain.

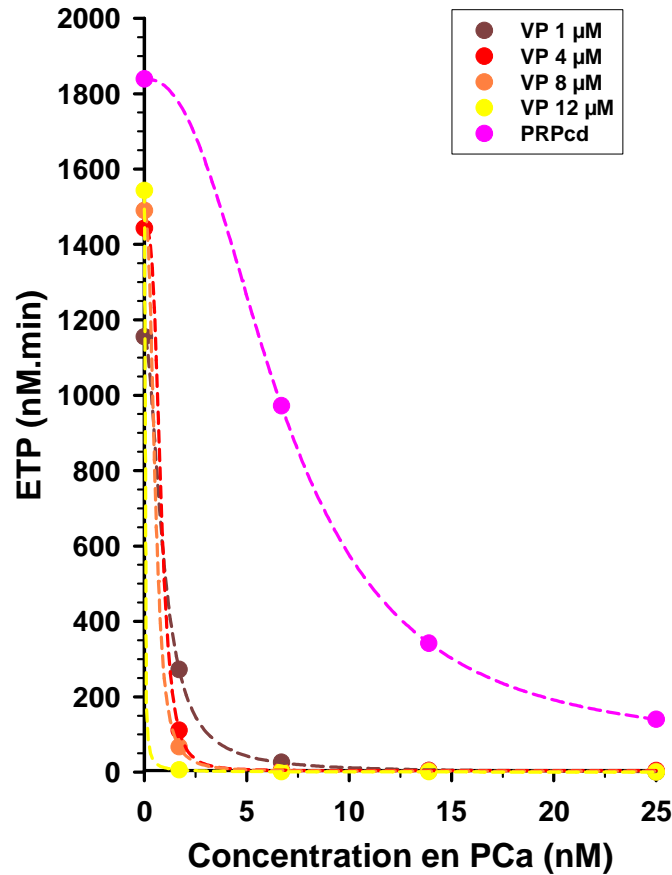


Figure 48 : Capacité des VP à servir de surface phospholipidique pour la coagulation du PPP 13000 g en absence et présence de PCa par comparaison au PRPcd.

Les résultats sont les valeurs moyennes d'ETP pour n = 3 à 5.

L'addition de PCa à une gamme de concentration de 0 à 25 nM se traduit par une réduction de plus de 90 % de l'ETP dès la plus faible concentration en PCa (1,7 nM) pour toutes les concentrations en VP étudiées (**Figure 48**).

Dans le cadre des expériences de thrombinographie nécessitant l'utilisation de VP, elles seront ajoutées à la concentration de 4 µM final au PPP 13000 g.

Des MVP peuvent être également apportées comme surface phospholipidique au PPP 13000 g. La **Figure 49** montrent l'effet de l'ajout de MVP comme surfaces phospholipidiques sur la génération de thrombine en absence de PCa chez un sujet sain.

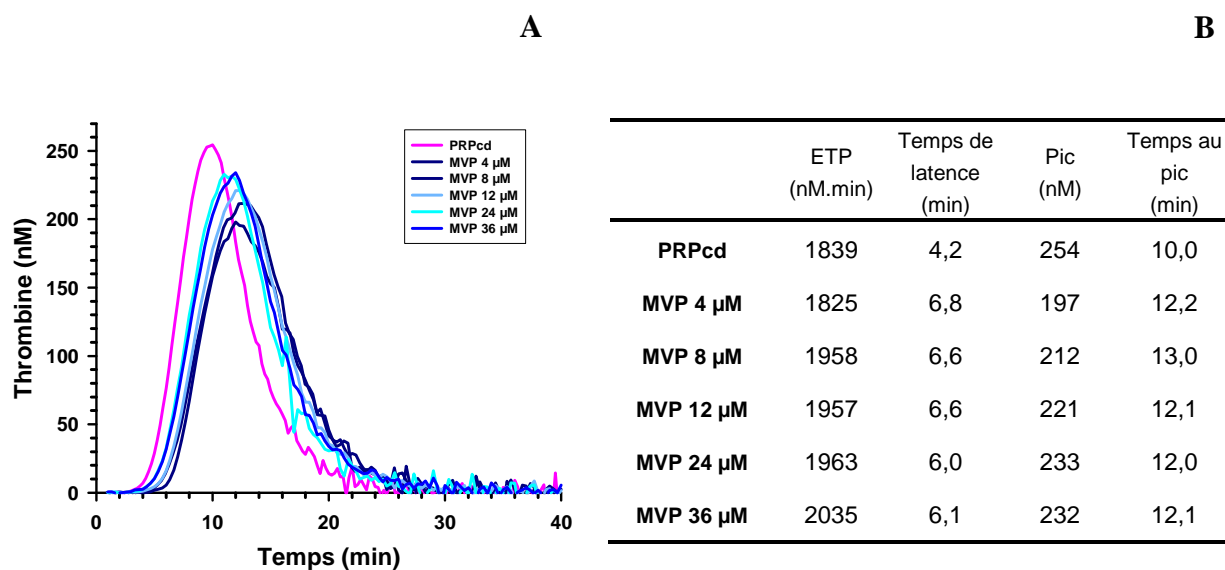


Figure 49 : Influence de la présence de MVP à différentes concentrations ajoutées à du PPP 13000 g en thrombinographie.

(A) thrombinogrammes (B) paramètres thrombinographiques.

Comparé au PRPcd, des valeurs d'ETP₀ et de pic de thrombine identiques sont observées en présence de PPP 13000 g dans lequel des MVP ont été ajoutées à une concentration de 4 μM. Une augmentation de la phase d'initiation et du temps pour atteindre le pic est observée. De plus, les valeurs d'ETP₀ ne varient pas avec la concentration en MVP (de 1825 à 2035 nM.min pour des concentrations de 4 à 36 μM final).

Les résultats présentés **Figure 50** montrent l'influence de la concentration en MVP sur l'activité de la thrombine générée en présence de PCa (gamme de 0 à 25 nM).

L'utilisation de MVP comme surface phospholipidique permet d'obtenir un profil proche de celui observé avec du PRPcd (**Figure 50**). Un effet concentration dépendant en MVP est observé concernant la sensibilité à la PCa. Plus la concentration en MVP augmente plus la sensibilité à la PCa augmente (IC₅₀-PCa de 5,5 à 1,8 nM pour les concentrations de 4 à 12 μM respectivement). Les résultats obtenus avec une concentration en MVP de 4 μM sont ceux qui se rapprochent le plus des valeurs observées en PRPcd (IC₅₀-PCa de 7 nM pour le PRPcd).

Ainsi, dans le cadre des études de thrombinographie ne nécessitant pas l'étude de l'effet de la composition en phospholipides, des MVP ont été ajoutées à 4 μM au PPP 13000 g pour toutes les expériences suivantes. De plus, les MVP présentent l'avantage d'être des surfaces phospholipidiques cellulaires même si les MVP ajoutées ne sont pas propres à chaque individu.

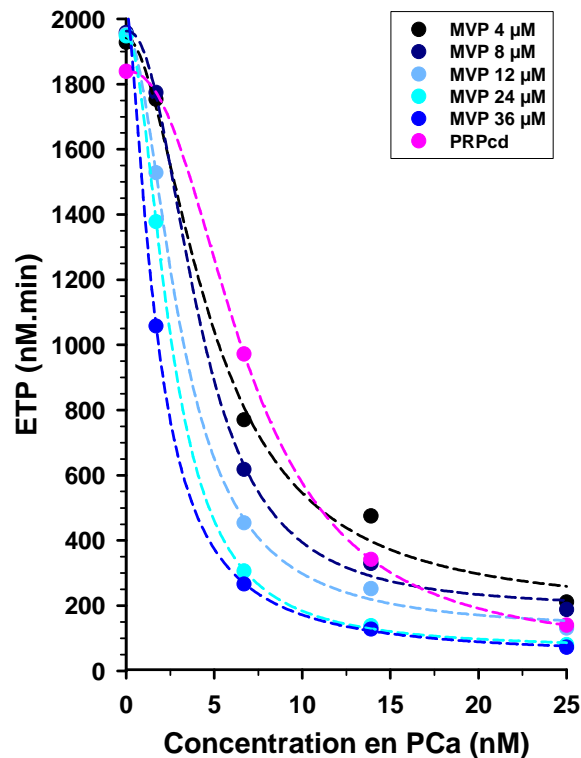


Figure 50 : Capacité des MVP à servir de surface phospholipidique pour la coagulation du PPP 13000 g en absence et présence de PCa par comparaison au PRPcd.
Les résultats sont les valeurs moyennes d'ETP₀ pour n = 2 à 5.

5.1.6 Détermination en thrombinographie d'une activation plaquettaire immunologique

5.1.6.1 Effet d'un anticorps activateur plaquettaire sur différents spécimens plasmatiques

L'anticorps activateur plaquettaire ALB6 a été étudié en présence de 3 spécimens plasmatiques qui varient par leur d'état d'activation des plaquettes.

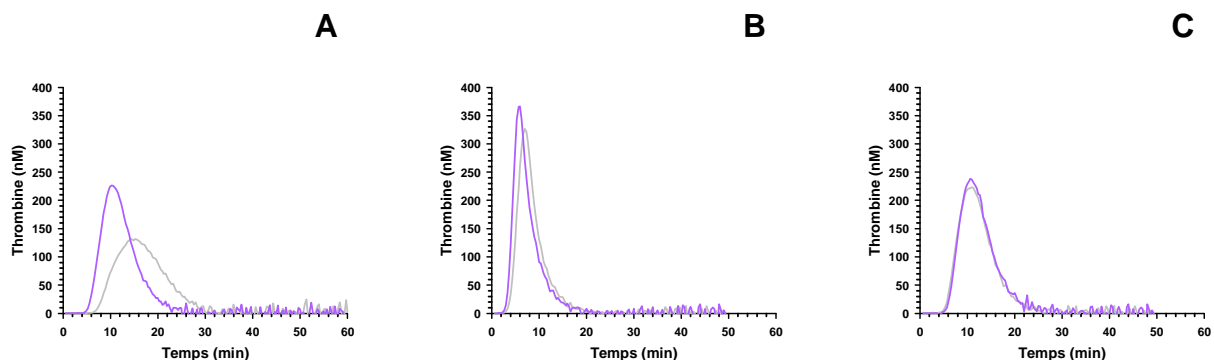


Figure 51 : Influence du spécimen plasmatique sur l'effet activateur plaquettaire d'ALB6.

Thrombinogrammes obtenus à partir de PRP (A) PRPcd (B) et PPP 13000 g avec des MVP (C) d'un sujet sain Arg131His en présence d'ALB6 à 10 μg/mL final (violet) ou d'IgGm à 200 μg/mL (gris) comme contrôle négatif.

Le PRP (**Figure 51 A**), soigneusement préparé de manière à éviter une activation des plaquettes, permet de déterminer l'influence de l'activation plaquettaire sur l'activité de la thrombine. Ainsi, en présence d'ALB6 et comparé à l'addition d'IgGm contrôles (IgG polyclonales murines), un raccourcissement de la phase d'initiation de génération de thrombine (5,9 vs 9,3 min), une génération explosive plus rapide de thrombine ainsi qu'une augmentation du pic de génération de thrombine (226 vs 104 nM) et de l'ETP₀ (1830 vs 1437 nM.min) sont observées. Au contraire, le PPP 13000 g dans lequel sont ajoutées des MVP, obtenu lors de l'étape ultime de l'activation plaquettaire, permet de travailler avec un système s'affranchissant totalement de l'influence de l'activation des plaquettes. Comme attendu et observé **Figure 51 C**, ALB6 n'induit pas d'effet sur le thrombinogramme.

L'ajout d'ALB6 à du PRPcd (**Figure 58 B**) induit un léger raccourcissement de la phase d'initiation de génération de thrombine, ainsi qu'une faible augmentation de la génération explosive de thrombine. Le cycle de congélation à - 80°C puis décongélation à 37°C induit des modifications plaquettaires irréversibles (voir images de microscopie électronique **Figure 53**) dont l'apparition d'activités procoagulantes.

5.1.6.2 Activation plaquettaire et polymorphisme FcγRIIa

La capacité de l'anticorps activateur plaquettaire ALB6 à induire une activation plaquettaire est dépendante du polymorphisme en position 131 du FcγRIIa. L'effet de cet anticorps a été déterminé en thrombinographie en présence de PRP préparé de manière à éviter autant que possible l'activation des plaquettes. La **Figure 52** présente les résultats obtenus en PRP avec un donneur His131His (**A**), un donneur Arg131His (**B**) et un donneur Arg131Arg (**C**).

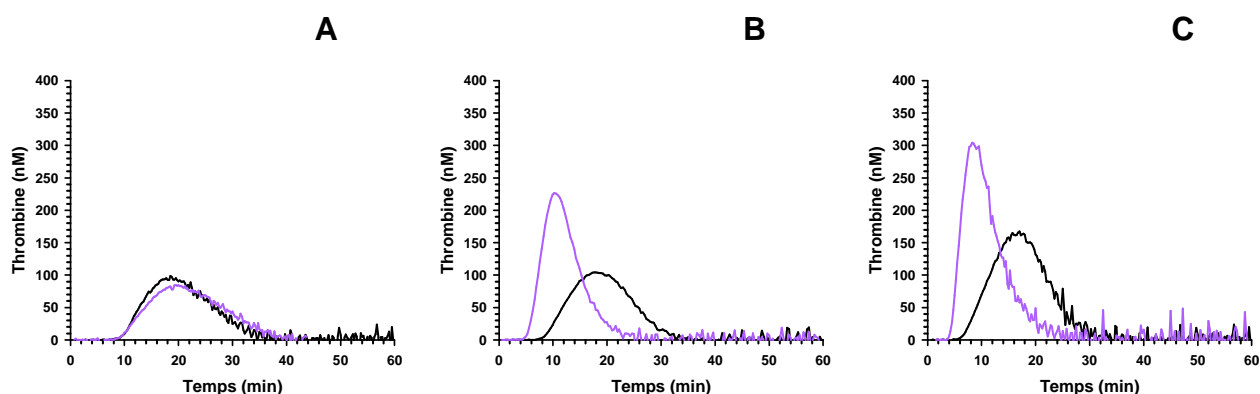


Figure 52 : Influence du polymorphisme du FcγRIIa sur l'effet activateur plaquettaire d'ALB6.

Thrombinogrammes obtenus à partir de PRP de sujets sains (**A**) His131His, (**B**) Arg 131His et (**C**) Arg131Arg en absence (noir) ou présence (violet) d'ALB6 à 10 µg/mL final.

En présence d'ALB6 et en absence de PCa, le thrombinogramme du donneur His131His (**Figure 52 A**) est superposable au thrombinogramme obtenu avec du PRP seul. Pour le donneur Arg131Arg (**Figure 52 C**), une diminution de la phase d'initiation de génération de thrombine, une génération explosive plus rapide de thrombine ainsi qu'une augmentation de l'ETP₀ sont observées. Le donneur Arg131His (**Figure 52 B**) présente une réponse intermédiaire. De manière à tenir compte de la variabilité d'effet sur l'activation plaquettaire observée en fonction du phénotype FcγRIIa, les expériences ont été réalisées avec du plasma de donneur Arg131His.

5.1.6.3 Effet d'une activation plaquettaire sur la sensibilité à la PCa

Dans le but de déterminer si une activation plaquettaire peut interférer avec le système anticoagulant de la PCa, une étude de l'effet d'ALB6 en présence de PCa a été réalisée sur du PRP. En parallèle, l'étude a également été réalisée sur du PRPcd et du PPP 13000 g en présence de MVP comme contrôles négatifs (**Figure 53**).

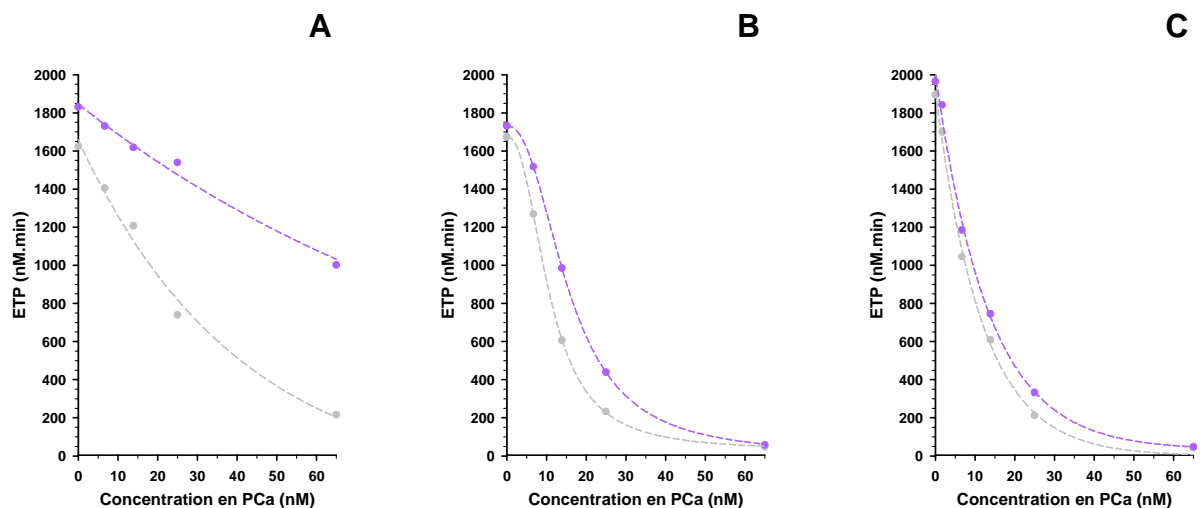


Figure 53 : Influence d'une activation plaquettaire sur la sensibilité à la PCa.
ETP en fonction d'une gamme de concentration en PCa obtenus à partir de PRP (A) PRPcd (B) et PPP 13000g avec des MVP (C) d'un sujet sain Arg131His en présence d'ALB6 à 10 µg/mL final (violet) ou d'IgGm à 200 µg/mL (gris).

L'analyse des valeurs d'IC₅₀-PCa montre une résistance à la PCa en présence d'ALB6 pour le PRP (> 65 vs 24,6 nM pour ALB6 et IgGm respectivement).

L'addition d'ALB6 à du PRPcd a un léger effet sur le système de la PCa (IC₅₀-PCa = 15,7 vs 10,9 nM). Cette augmentation de l'IC₅₀-PCa peut s'expliquer par la liaison d'ALB6 au niveau de son récepteur (CD9) à la surface des plaquettes présentes dans le PRPcd. Cette liaison pourrait diminuer les surfaces phospholipidiques disponibles pour le système de la PCa par un

mécanisme d'encombrement stérique au niveau des surfaces. Comme attendu une absence de variation significative de l'IC₅₀-PCa est observée lors de l'addition d'ALB6 à du PPP 13000 g en présence de MVP (9,3 vs 8,3 nM pour ALB6 et IgGm respectivement).

5.2 Etude de l'hypercoagulabilité associée aux aPL

5.2.1 Comparaison de l'effet d'auto-anticorps humains et d'anticorps monoclonaux murins sur la génération et l'inhibition de la thrombine

5.2.1.1 Effet des auto-anticorps humains en thrombinographie

Il est clairement admis dans la littérature que la présence chez les patients aPL d'anticorps anti-phospholipides est associée à un phénotype thrombotique. Cependant, nous avons démontré dans un premier temps que ce sont bien les auto-anticorps humains qui sont responsables du phénotype observé chez les patients aPL.

Des expériences de thrombinographie ont été réalisées avec du PRP normal, du PRP de patient aPL et du PRP normal supplémenté avec des IgG purifiées de patients aPL en présence ou non du système inhibiteur de la PCa. Les résultats présentés **Figure 54** montrent un exemple de l'effet observé pour un patient ayant un LA mais pas d'aCL en absence et en présence de PCa à une concentration choisie de 13,9 nM.

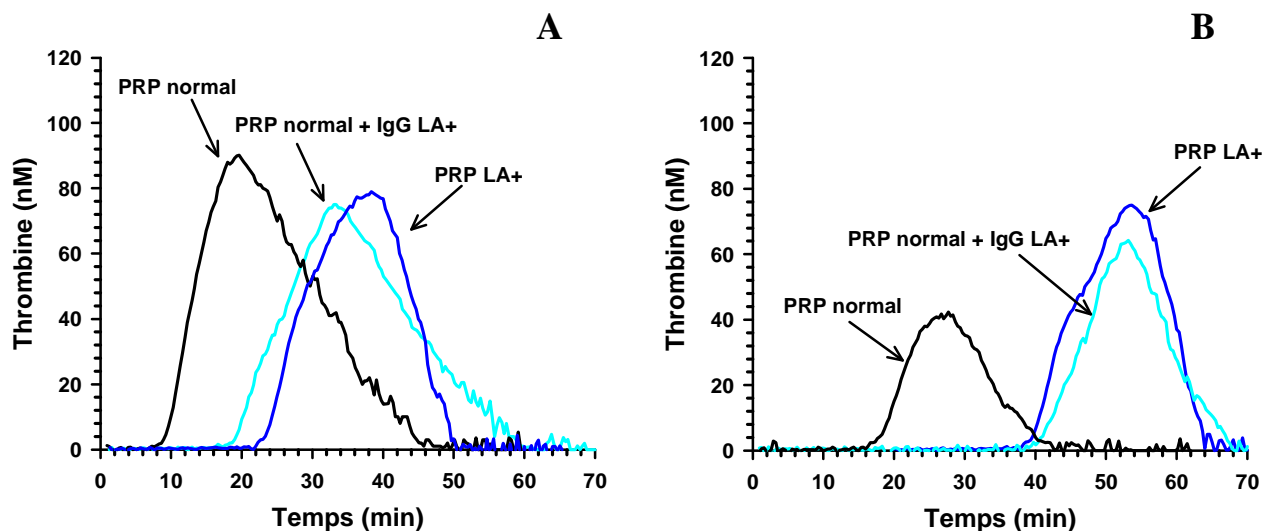


Figure 54 : Effet d'auto-anticorps aPL sur l'activité de la thrombine générée en absence (A) et en présence de PCa à 13,9 nM (B).

PRP normal (noir), PRP de patient LA+ (bleu) et PRP normal supplémenté avec les IgG purifiées de ce patient (bleu clair).

En comparaison avec le PRP normal et en absence de PCa (**Figure 54 A**), nous avons observé chez le patient LA-positif aCL-négatif, une augmentation de la phase d'initiation (24,4 min vs 10,3 min) ainsi qu'un ETP₀ plus faible (1264 nM.min vs 1721 nM.min). De plus, en présence de PCa (**Figure 54 B**), une moindre diminution de l'ETP est observée comparé au PRP normal (1128 nM.min vs 581 nM.min). L'ajout des IgG purifiées (2 mg/mL) de ce même patient au PRP normal induit les deux même effets opposés que ceux observés avec le PRP du patient, à savoir un effet anticoagulant (allongement de la phase d'initiation de génération de thrombine ainsi qu'un ETP₀ plus faible ; 1524 nM.min vs 1721 nM.min) et un moindre effet du système anticoagulant de la PCa (896 nM.min vs 581 nM.min). Il est à noter que l'addition des IgG purifiées du patient aPL au plasma normal n'induit pas des valeurs d'ETP similaires à celles observées pour le plasma aPL. Cela pourrait s'expliquer par la variabilité d'activité thrombinique inter-individuelle qui s'ajoute à l'effet des IgG.

Deux profils différents obtenus avec du PRP de 6 patients aPL (2 patients LA-/anti-β₂GPI+, 2 patients LA+/anti-β₂GPI- et 2 patients LA+/anti-β₂GPI+), en présence d'une gamme de concentration en PCa, sont présentés **Figure 55**.

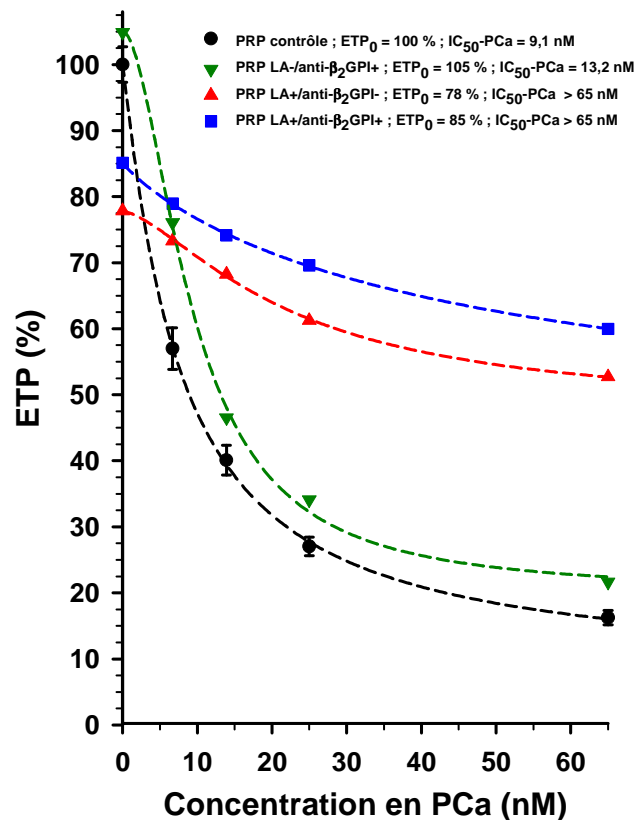


Figure 55 : Sensibilité à la PCa en présence d'auto-anticorps humains.

Les valeurs moyennes ± SEM obtenues à partir de PRP de 19 volontaires sains sont utilisées comme contrôle. Pour les patients, chaque courbe est la moyenne obtenue à partir de PRP de 2 patients.

Comparé à la valeur d'ETP₀ moyenne calculée à partir des valeurs d'ETP₀ de 19 sujets normaux (contrôle), les 2 patients ayant un LA et des anticorps anti-β₂GPI montrent une diminution de l'ETP₀ (diminution de 15%) ainsi qu'une forte résistance à la PCa. Au contraire, les 2 patients n'ayant que des anticorps anti-β₂GPI présentent seulement une réduction de la sensibilité à la PCa. Les 2 patients ayant seulement un LA présentent une diminution de l'ETP₀ (diminution de 22%) plus importante que les 2 patients ayant un LA et des anticorps anti-β₂GPI.

5.2.1.2 Effet des AcMm en thrombinographie

De manière à déterminer si des AcMm dirigés contre les cibles principales du SAPL peuvent être de bons modèles d'étude de l'influence des auto-anticorps humains sur l'activité de la thrombine générée, des expériences de thrombinographie ont été réalisées avec du PRP normal supplémenté avec des AcMm à une concentration de 200 µg/mL. Cette concentration a été choisie en fonction des valeurs rapportées dans la littérature mais surtout après étude en thrombinographie de plusieurs concentrations en AcMm. Nous nous sommes placés à une concentration induisant un effet similaire aux aPL en thrombinographie. Nous avons tout d'abord vérifié que les IgGm n'avaient pas d'effet dans le système utilisé en absence et en présence de PCa (**Figure 56**).

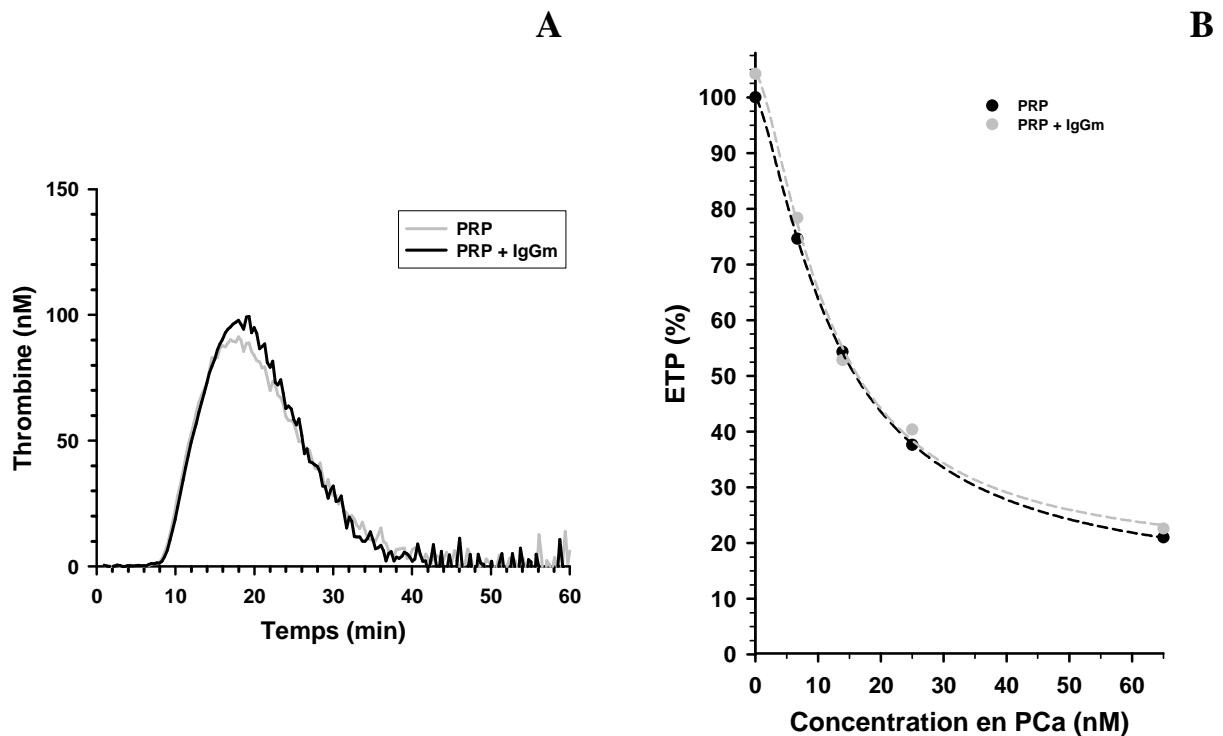


Figure 56 : Effet d'IgGm en thrombinographie.

(A) Thrombinogrammes et (B) Sensibilité à la PCa obtenus avec du PRP en absence et présence d'IgGm à 200 µg/mL.

Le thrombinogramme obtenu en PRP dans lequel des IgGm ont été ajoutées à une concentration de 200 µg/mL est superposable au thrombinogramme obtenu en leur absence (**Figure 56 A**).

De manière à vérifier une absence d'effet de ces IgGm lors de l'addition de PCa, nous avons réalisé des expériences en PRP en présence d'une gamme de concentration en PCa. Les résultats sont présentés **Figure 56 B**. Comme attendu, l'ajout d'IgGm à 200 µg/mL n'induit pas de variation significative sur les valeurs d'IC₅₀-PCa (16 et 16,2 nM pour les IgGm et le PRP respectivement). Pour la suite de l'étude, l'effet des AcMm sera comparé aux IgGm (contrôle).

Des profils similaires à ceux observés avec les patients aPL (**Figure 55**), tant pour l'ETP₀ que pour l'IC₅₀-PCa, ont été obtenus lors de l'addition d'AcMm dirigés contre le FII et la β₂GPI, à une concentration finale de 200 µg/mL (**Figure 57**).

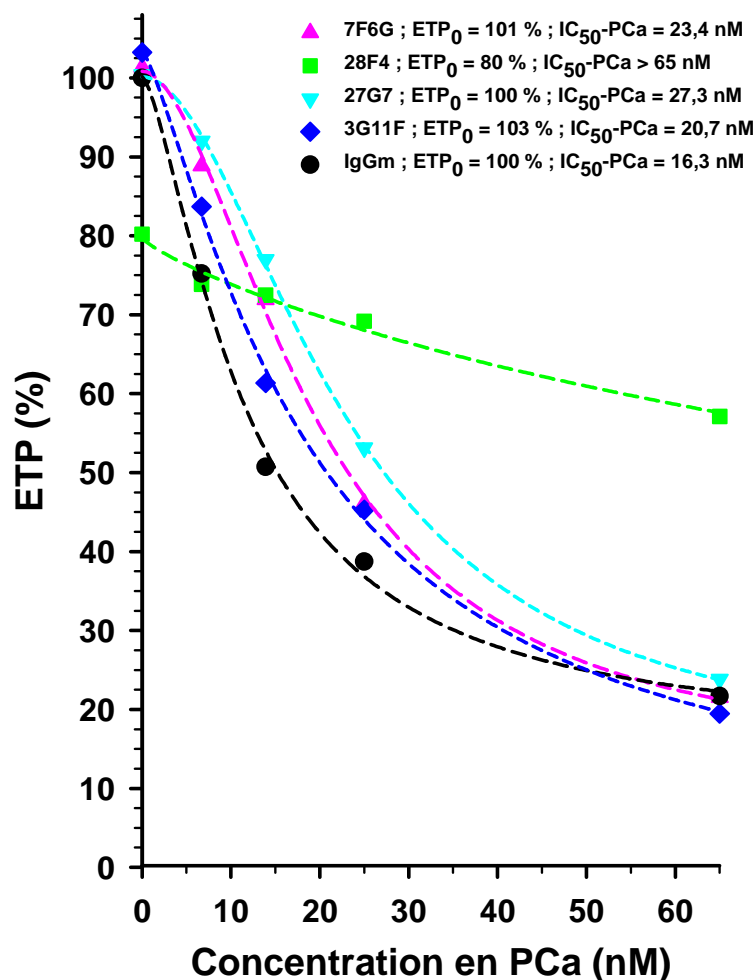


Figure 57 : Sensibilité à la PCa en présence d'AcMm dirigés contre le FII et la β₂GPI. PRP normal supplémenté avec des AcMm à 200 µg/mL final. Les résultats sont exprimés en % par rapport à la valeur contrôle (ETP₀ en présence d'IgGm) pour n = 3 à 5.

L'ajout de l'AcMm 28F4, comme pour les deux catégories de patients LA+/anti- β_2 GPI+ et -, induit une diminution de l'ETP₀ (diminution de 23%) ainsi qu'une forte augmentation de l'IC₅₀-PCa (> 65 nM) par rapport à l'addition d'IgGm.

L'ajout des AcMm 27G7, 7F6G et 3G11F induit seulement une augmentation modérée de l'IC₅₀-PCa (27,3, 23,4 et 20,7 nM pour 27G7, 7F6G et 3G11F respectivement par comparaison avec 16,3 nM pour les IgGm) sans effet sur l'ETP₀ comme pour les patients LA-/anti- β_2 GPI+. Cet effet similaire de ces 3 AcMm sur la sensibilité à la PCa est en faveur d'un mécanisme d'action commun de ces AcMm. Quelle que soit la concentration en PCa, l'ETP en présence de PCa est plus élevé en présence des AcMm qu'en présence des IgGm ce qui révèle une hypercoagulabilité.

Dans le but de déterminer différents mécanismes d'action responsables du phénotype hypercoagulable, nous nous sommes centrés sur l'étude d'AcMm induisant des effets différents. Les AcMm 7F6G (rose), 27G7 (bleu clair) et 3G11F (bleu) induisent des effets similaires. En plus de l'AcMm 28F4, nous avons conservé pour la suite de l'étude l'AcMm 7F6G, qui présentent des valeurs intermédiaires d'ETP et d'IC₅₀-PCa par rapport à 27G7 et 3G11F (**Figure 57**). L'effet, en thrombinographie, des AcMm 28F4 et 7F6G a été confirmé avec le PRP d'un autre donneur volontaire sain (**Tableau XV**).

AcMm	ETP ₀ (%)	IC ₅₀ -PCa (nM)
IgGm	100	20,5
7F6G	104	28
28F4	74	> 65

Tableau XV : Influence des AcMm en thrombinographie sur un autre volontaire sain.

5.2.2 Les AcMm peuvent-ils induire une activation plaquettaire ?

5.2.2.1 Caractérisation des plaquettes lavées

L'effet des AcMm sur l'activation des plaquettes a été évalué en utilisant des plaquettes lavées humaines préparées selon la méthode décrite par Warner *et al* [345]. Des études de cytométrie en flux ont été réalisées de manière à caractériser l'état d'activation des plaquettes lavées. Les résultats ont montré qu'à l'état de repos, moins de 5 % de la population de plaquettes lavées isolées exprime la P-sélectine ou CD63. De plus, le pourcentage de plaquettes annexine V marquée est seulement de 2 à 3 %.

5.2.2.2 Capacité des AcMm, des antigènes et des complexes

AcMm/antigène à se lier sur des plaquettes lavées humaines

De manière à étudier la cinétique de liaison des anticorps, antigènes seuls et des complexes AcMm/antigène sur les plaquettes ainsi qu'à éliminer une liaison non spécifique des complexes AcMm sur les plaquettes, nous avons réalisé des expériences en SPR. Nous avons déterminé la capacité des AcMm seuls ou en présence de leur antigène à se lier à des plaquettes lavées immobilisées sur un biocapteur L1 (**Figure 58**).

Dans le but de vérifier une absence d'exposition des phospholipides anioniques à la surface des plaquettes due à l'immobilisation, une injection d'annexine V a été réalisée en début et en fin d'expérience. Suite à l'immobilisation des plaquettes sur le biocapteur, aucune liaison d'annexine V injectée à 100 $\mu\text{g/mL}$ n'a été mesurée, assurant ainsi l'absence d'exposition de phospholipides anioniques à la surface des plaquettes.

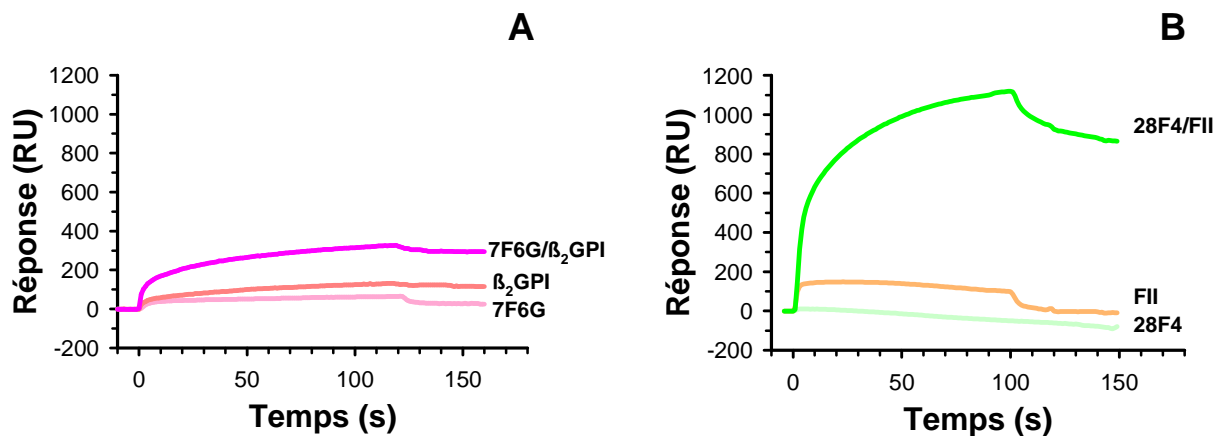


Figure 58 : Liaison des AcMm et de leur antigène sur des plaquettes lavées humaines immobilisées sur un biocapteur L1.

Les résultats présentés **Figure 58 A** et **B** montrent que quel que soit l'AcMm (28F4 ou 7F6G injectés à 200 $\mu\text{g/mL}$) aucune liaison significative n'est observable (- 60 et 28 RU pour 28F4 et 7F6G respectivement). L'injection de l'antigène β₂GPI à sa concentration plasmatique (200 $\mu\text{g/mL}$) induit un faible signal (123 RU). Une absence de liaison (- 2 RU) est observée lors de l'injection de FII à sa concentration plasmatique (100 $\mu\text{g/mL}$).

Des réponses significatives sont observées lors de l'injection des complexes AcMm/antigène et ce de façon hétérogène. La SPR quantifie les changements de masse induits par l'association ou la dissociation des complexes au niveau du biocapteur. Alors que nous pouvions nous attendre à une liaison similaire du fait d'une masse moléculaire quasi identique pour les 2 complexes (de l'ordre de 200000 Da), une liaison trois fois plus importante a été

observée pour les complexes 28F4/FII (925 RU) par rapport aux complexes 7F6G/ β_2 GPI (297 RU).

5.2.2.3 Effet des AcMm sur l'activité procoagulante des phospholipides

Dans le but de déterminer la capacité des AcMm à induire une activation plaquettaire maximale (exposition des phospholipides anioniques à la surface des plaquettes), des mesures d'activité procoagulante des phospholipides (PPA) ont été réalisées. Nous avons mesuré la capacité des plaquettes lavées humaines incubées, 1 h à température ambiante, avec les AcMm seul (200 μ g/mL) ou en présence de leur antigène (concentration plasmatique) d'induire une génération de thrombine dans un système reconstitué (protéines purifiées).

Les résultats présentés **Figure 59** ont été obtenus avec des plaquettes lavées provenant d'un donneur volontaire sain Arg131His pour le récepteur Fc γ RIIa. Les résultats (moyenne \pm SEM, n = 6) sont exprimés en valeurs de PPA (μ M d'équivalents PhtdSer pour une suspension contenant 150 G/L en plaquettes) et comparés à la valeur PPA obtenue pour les plaquettes non stimulées ($0,24 \pm 0,07 \mu$ M pour 17 préparations de plaquettes lavées).

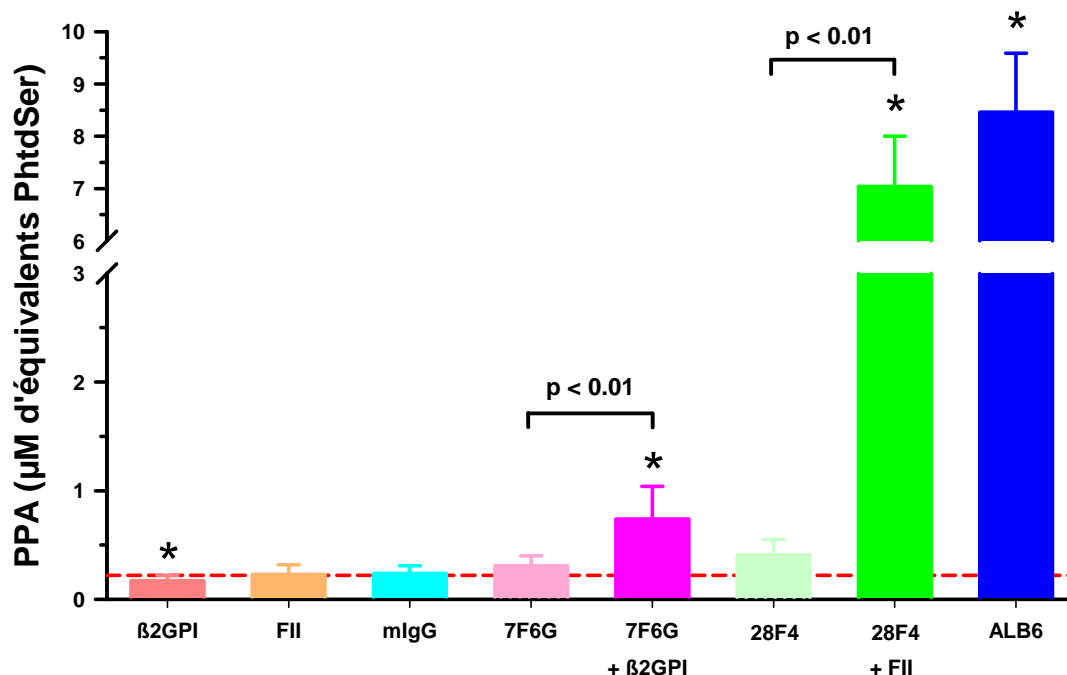


Figure 59 : Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) induite par les antigènes seuls et les AcMm, seuls ou en présence de leur antigène.

Les résultats sont exprimés en valeurs de PPA \pm SEM (μ M d'équivalents PhtdSer). La ligne en pointillé rouge (valeurs des plaquettes non stimulées) représente l'absence d'activation plaquettaire. * $p < 0,05$ mélange plaquettaire vs plaquettes non stimulées.

L'ajout de FII à sa concentration plasmatique (100 μ g/mL) n'induit pas d'effet sur la valeur de PPA tandis que l'addition de β_2 GPI (200 μ g/mL) se traduit par une diminution

significative de l'activation plaquettaire ($p = 0,01$). Cela est en accord avec un effet anticoagulant de la β_2 GPI rapporté dans la littérature [380]. L'ajout des IgGm ainsi que des AcMm (28F4 et 7F6G) en absence de leur cible n'induit pas d'effet puisque la quantité de phospholipides anioniques mesurée n'est pas statistiquement différente de celle obtenue avec les plaquettes non stimulées. Au contraire, en présence de leur antigène, les AcMm induisent une augmentation significative de PPA comparée à l'AcMm seul. Cette augmentation est faible pour l'AcMm 7F6G ($0,74 \pm 0,30 \mu\text{M}$ d'équivalents PhtdSer en présence de β_2 GPI vs $0,31 \pm 0,09 \mu\text{M}$ d'équivalents PhtdSer sans β_2 GPI ; $p = 0,006$) et forte pour l'AcMm 28F4 ($7,04 \pm 0,96 \mu\text{M}$ d'équivalents PhtdSer en présence de FII vs $0,41 \pm 0,14 \mu\text{M}$ d'équivalents PhtdSer en absence de FII ; $p = 0,002$). De plus, il est à noter que les valeurs obtenues avec les complexes 28F4/FII sont significativement plus fortement élevées que celles observées pour les complexes 7F6G/ β_2 GPI ($p = 0,002$). La valeur PPA observée pour les complexes 28F4/FII est du même ordre de grandeur que celle obtenue par incubation des plaquettes lavées avec l'anticorps activateur plaquettaire, contrôle positif, ALB6 ($8,46 \pm 1,13 \mu\text{M}$ d'équivalents PhtdSer).

De manière à également tenir compte d'un effet du phénotype $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$, des expériences ont également été réalisées avec deux autres donneurs His131His (**Figure 60**).

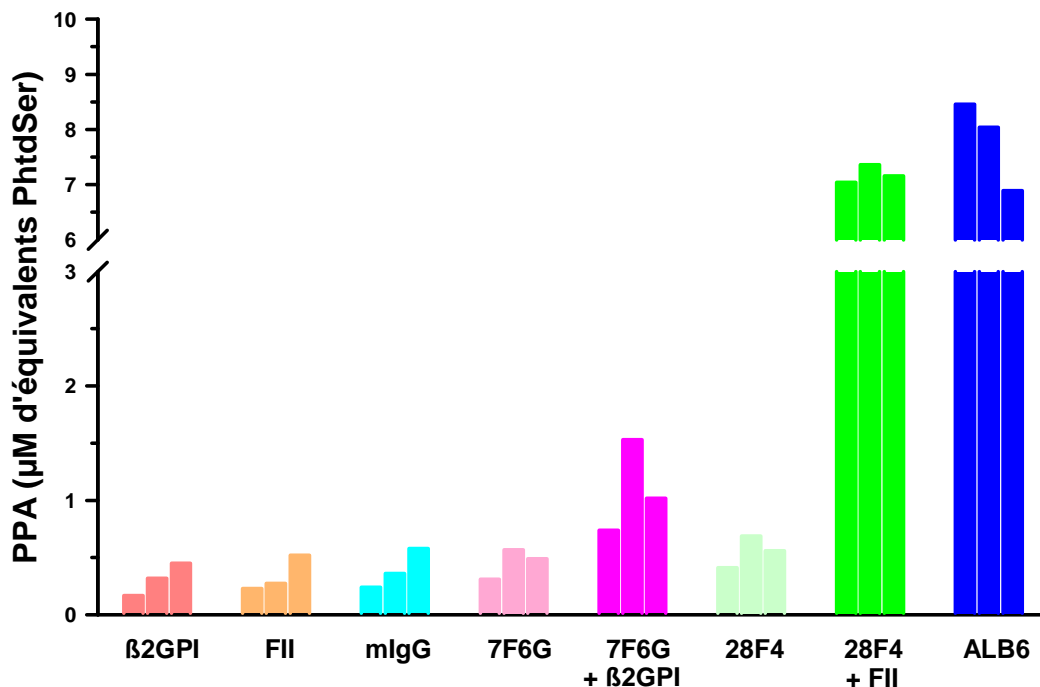


Figure 60 : Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) en fonction des donneurs.

L'activité PPA est induite par les antigènes seuls et les AcMm seuls ou en présence de leur antigène pour trois donneurs (de gauche à droite : donneur Arg131His, His131His et His131His). Les résultats sont exprimés en valeurs de PPA (μM d'équivalents PhtdSer) dans les différents mélanges plaquettaires.

Des résultats similaires ont été obtenus pour les 3 donneurs tant en réponse qu'en amplitude. Une activation plaquettaire du même ordre de grandeur que pour le donneur Arg131His a été observée lors de l'addition des complexes AcMm/antigène à des plaquettes de donneurs His131His. Ainsi, comparée à 0,74 μM d'équivalents PhtdSer obtenu lors de l'addition des complexes 7F6G/ β_2 GPI pour le donneur Arg131His, des valeurs de PPA de l'ordre de 1,53 et 1,02 ont été obtenues pour les donneurs His131His. De même, des valeurs comparables entre les donneurs ont été obtenues pour les complexes 28F4/FII et pour ALB6 (7,04 ; 7,36 et 7,16 μM d'équivalents PhtdSer pour 28F4/FII et 8,46 ; 8,04 et 6,89 μM d'équivalents PhtdSer pour ALB6).

Ces données ont été obtenues à partir de la méthode décrite par Warner *et al* [345]. Il est cependant à noter que la concentration en plaquettes lavées utilisée dans ce test est élevée (750 G/L au moment de l'incubation avec les plaquettes lavées) et donc non physiologique. Nous avons donc vérifié qu'avec une concentration plaquettaire physiologique, à savoir 210 G/L, les résultats observés étaient similaires (**Tableau XVI**).

	Concentration en plaquettes lavées (G/L)	
	750	210
Contrôle	0,22 \pm 0,03	0,28 \pm 0,05
IgGm	0,24 \pm 0,07	0,31 \pm 0,09
β_2GPI	0,17 \pm 0,01 *	0,14 \pm 0,01
FII	0,23 \pm 0,09	0,27 \pm 0,06
7F6G	0,31 \pm 0,09	0,29 \pm 0,15
28F4	0,41 \pm 0,14	0,40 \pm 0,18
7F6G + β_2GPI	0,74 \pm 0,3 *	0,39 \pm 0,15
28F4 + FII	7,04 \pm 0,96 *	6,93 \pm 1,15 *
ALB6	8,46 \pm 1,13 *	7,80 \pm 0,29 *

Tableau XVI : Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) en fonction de la concentration en plaquettes.

Les résultats sont exprimés en valeurs de PPA \pm SEM (μM d'équivalents PhtdSer) dans les différents mélanges plaquettaires et comparés à la valeur PPA des plaquettes non stimulées (contrôle) pour n = 6 à 750 G/L et n = 4 pour 210 G/L. * p < 0,05 mélange plaquettaire vs plaquettes non stimulées.

A une concentration en plaquettes de 210 G/L, des valeurs similaires ont été observées pour les anticorps et les antigènes seuls ainsi que pour la valeur contrôle (plaquettes seules). Les complexes anti-FII/FII et ALB6 induisent des valeurs de PPA du même ordre de grandeur qu'à 750 G/L ($6,93 \pm 1,15$ vs $7,04 \pm 0,96$ μ M pour anti-FII/FII et $7,80 \pm 0,29$ vs $8,46 \pm 1,13$ μ M pour ALB6 ; $p = 0,9$). Pour les complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI, des valeurs plus faibles mais non significativement différentes ont été obtenues ($0,39 \pm 0,15$ vs $0,74 \pm 0,30$ μ M ; $p = 0,2$).

Nous avons également vérifié que les AcMm pouvaient induire une activation plaquettaire dans du PRP. Les résultats présentés dans le **Tableau XVII** montrent que l'addition d'AcMm à du PRP, où la cible est apportée par le plasma, induit une activation plaquettaire plus faible que celle observée avec des plaquettes lavées sauf pour l'AcMm 7F6G (valeur du même ordre de grandeur). Cette observation est en accord avec la littérature qui rapporte que les plaquettes lavées sont plus sensibles à l'activation plaquettaire qu'elles ne le sont dans le plasma [381].

	Concentration en plaquettes (G/L)	Contrôle	7F6G	28F4	ALB6
PRP	300	$0,22 \pm 0,04$	$0,82 \pm 0,24$	$1,95 \pm 0,48$	$2,28 \pm 0,60$
Plaquettes lavées	210	$0,28 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,15$	$6,93 \pm 1,15$	$7,80 \pm 0,29$

Tableau XVII : Comparaison de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) induite par les AcMm en présence de PRP.

Les résultats sont exprimés en valeurs de PPA \pm SEM (μ M d'équivalents PhtdSer) dans les différents mélanges plaquettaires et comparés à la valeur PPA mesurée dans le PRP non stimulé (contrôle) pour $n = 5$. Les antigènes sont apportés par le plasma.

5.2.2.4 Effet des AcMm sur la sécrétion plaquettaire

De manière à mieux évaluer le type de réponse plaquettaire induite par les complexes AcMm/antigène, une étape de l'activation plaquettaire antérieure à l'exposition des phospholipides anioniques a été étudiée : la sécrétion. Comme rapporté dans la littérature [338, 339, 382], la capacité des AcMm à induire la sécrétion des plaquettes a été déterminée par quantification de la synthèse de TX (évaluée par dosage du TX B₂) par ELISA. La quantité de TX B₂ a été dosée dans les surnageants de plaquettes lavées incubés avec les complexes AcMm/antigène.

Les résultats obtenus (moyenne \pm SEM ; n = 3) sont comparées à la valeur contrôle mesurée dans les surnageants plaquettaires non stimulés ($0,93 \pm 0,19$ ng/mL). Les résultats obtenus pour PPA et pour la sécrétion évoluent dans le même sens. La valeur observée pour les complexes 28F4/FII est du même ordre de grandeur que celle obtenue avec l'anticorps activateur plaquettaire, ALB6 ($169,65 \pm 4,88$ vs $154,62 \pm 7,35$ ng/mL pour 28F4/FII et ALB6 respectivement ; p = 0,003 et 0,01). Quant aux complexes 7F6G/ β_2 GPI, une légère augmentation de la quantité de TX B₂ est observée par rapport à la valeur contrôle ($22,02 \pm 0,31$ vs $0,93 \pm 0,19$ ng/mL ; p = 0,02). Des résultats similaires ont été obtenus par dosage du PF4, protéine impliquée dans la coagulation. Des valeurs du même ordre de grandeur ont été obtenues entre les surnageants de plaquettes incubés en présence de 28F4/FII et d'ALB6 ($1,7$ et $1,9$ μ g/mL respectivement) et des quantités plus faibles ont été dosées pour les complexes 7F6G/ β_2 GPI ($0,3$ μ g/mL) comparé à la valeur mesurée dans les surnageants non stimulés ($0,09$ μ g/mL).

5.2.2.5 Comparaison de l'effet activateur plaquettaire des complexes AcMm/antigène avec des auto-anticorps humains

De manière à comparer l'effet activateur plaquettaire observé avec les complexes AcMm/antigène avec des auto-anticorps connus pour induire une activation plaquettaire, des plaquettes lavées humaines ont été incubées avec du sérum pur ou des IgG humaines totales purifiées (1 mg/mL) de patients ayant des anticorps anti-PF4 et/ou anti-IL8 en présence ou non d'IL8 ($0,001$ ng/mL) et d'héparine ($0,1$ U/mL). Les caractéristiques des patients sont présentées **Tableau XVIII**.

Patient	Spécimen étudié	Anticorps	
		Anti-PF4	Anti-IL8
1	IgG totales	+	-
2	IgG totales	+	+
3	IgG totales	+	+
4	IgG totales	-	+
5	sérum	-	+

Tableau XVIII : Caractéristiques des patients.

Des mesures d'activité procoagulante des phospholipides ont été réalisées. Les résultats présentés **Figure 61** ont été obtenus avec des plaquettes lavées provenant d'un donneur

volontaire sain Arg131His pour le récepteur FcγRIIa et confirmés avec deux autres donneurs His131His.

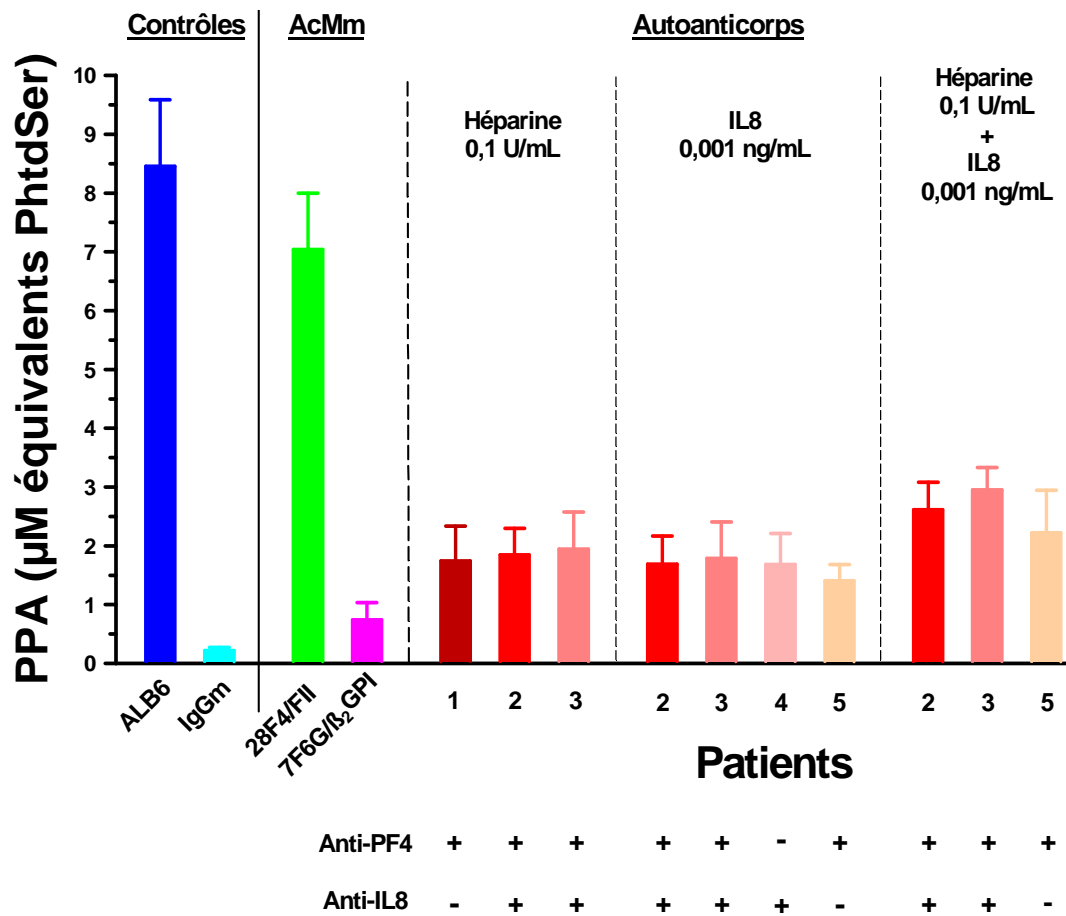


Figure 61 : Comparaison de l'effet activateur plaquettaire d'AcMm avec des auto-anticorps humains.

Les auto-anticorps sont incubés en présence d'héparine, d'IL8 ou des deux en fonction de la spécificité des auto-anticorps présents chez les patients. Les résultats (moyenne \pm SEM ; n = 3 à 6) sont exprimés en μ M d'équivalents PhtdSer.

Les résultats (moyenne \pm SEM, n = 3 à 6) sont exprimés en valeurs de PPA (μ M d'équivalents PhtdSer) et comparés à la valeur PPA obtenue pour les plaquettes non stimulées ($0,25 \pm 0,06 \mu$ M pour 6 préparations de plaquettes lavées). Il a été tout d'abord vérifié que l'addition d'héparine ou d'IL8 aux plaquettes lavées n'induisait pas d'activation plaquettaire. L'ajout d'héparine à une concentration de 0,1 U/mL n'induit pas d'effet sur la valeur de PPA de même que l'addition d'IL8 à 0,001 ng/mL ($0,25 \pm 0,11$ et $0,22 \pm 0,08 \mu$ M d'équivalents PhtdSer pour l'héparine et IL-8). De même, lors de l'addition des IgGm ainsi que des auto-anticorps humains purifiés en absence d'héparine et d'IL8, aucun effet significatif sur l'activation plaquettaire n'est observé. Des valeurs de PPA de 0,22 à 0,37 μ M ont été obtenues pour les anticorps seuls ($p > 0,1$).

Lors de l'addition d'héparine ou d'IL8, une augmentation significative des valeurs PPA est observée. Concernant les patients 1 et 4 positifs seulement pour les anticorps anti-PF4 et anti-IL8 respectivement, des valeurs 7 fois supérieures à celle du contrôle ont été observées ($1,74 \pm 0,59$ et $1,68 \pm 0,53 \mu\text{M}$; $p = 0,006$ et $0,02$). Pour les patients 2 et 3, positifs pour les deux types d'anticorps, une augmentation de PPA est observée en présence des deux antigènes ($1,69 \pm 0,48$ et $1,85 \pm 0,45$; $1,79 \pm 0,62$ et $1,94 \pm 0,63 \mu\text{M}$ d'équivalents PhtdSer en présence d'IL8 et d'héparine respectivement ; p de l'ordre de $0,02$). Cette augmentation de PPA est plus forte pour les 2 patients lors de l'addition simultanée d'IL8 et d'héparine ($2,61 \pm 0,47$ et $2,95 \pm 0,37 \mu\text{M}$ d'équivalents PhtdSer pour les patients 2 et 3 respectivement ; $p = 0,006$ et $0,01$). L'addition simultanée d'héparine et d'IL8 induit donc un effet additif sur les valeurs de PPA.

Une étude complémentaire a été réalisée avec le sérum de la patiente n°5 atteinte de TIH mais négative pour la détection d'anticorps anti-PF4 [383]. Nos expériences ont permis de révéler par SPR la présence d'anticorps anti-IL8. Ces anticorps sont capables d'induire une activation plaquettaire IL8-dépendante lors de l'addition d'IL8 exogène à différentes concentrations (Figure 61 et 62).

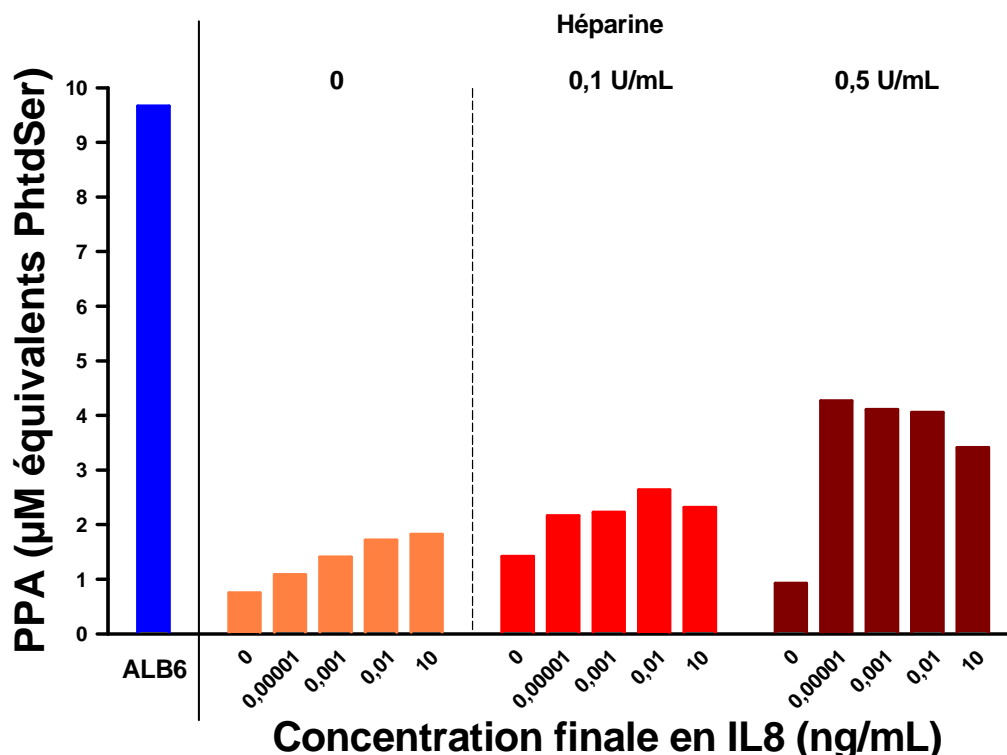


Figure 62 : Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) induite par des anticorps anti-IL8 contenus dans le sérum de la patiente n°5 en présence d'IL8 ± héparine.

Les résultats sont exprimés en μM d'équivalents PhtdSer.

Il a également été mis en évidence que cette activation était facilitée par l'héparine. Ainsi, un effet maximal d'activation des plaquettes a été observé pour des concentrations faibles en IL8 (à partir de 0,00001 ng/mL) lors de l'ajout d'héparine à 0,1 U/mL. En absence d'héparine, des concentrations en IL8 entre 0,01 et 10 ng/mL sont nécessaires pour obtenir un effet maximal d'activation. Les résultats sont présentés **Figure 62** [383].

5.2.3 Interférence des complexes AcMm-antigène avec la génération et l'inhibition de la thrombine

5.2.3.1 Influence de l'interférence des AcMm en présence de leur antigène au niveau des surfaces phospholipidiques

De manière à déterminer le rôle de l'interférence des AcMm en présence de leur cible avec les réactions pro- et anticoagulantes au niveau des surfaces phospholipidiques indépendamment du mécanisme d'activation plaquettaire, nous avons réalisé des expériences de thrombinographie en présence de spécimens plasmatiques où l'activation plaquettaire n'interfère pas.

Trois spécimens plasmatiques ont été étudiés : PPP 13000 g en présence de MVP (PPP/MVP) ou de VP (PPP/VP) comme surfaces phospholipidiques et PPP en présence de MVP générée par du collagène (PPP/MVP collagène).

Nous avons principalement étudié le PPP 13000 g auquel a été ajoutées des MVP (PPP/MVP) comme surface phospholipidiques anioniques. Les MVP étant la surface phospholipidique disponible lors de l'étape ultime de l'activation plaquettaire, l'effet activateur plaquettaire n'est pas pris en compte lors de l'étude de ce spécimen. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 63 A à D**.

L'addition d'IgGm à 200 µg/mL dans le système n'induit pas de variation de l'ETP₀, du pic de thrombine et de l'IC₅₀-PCa en comparaison avec le PPP 13000 g seul. Comme attendu, ALB6 n'induit pas non plus de variations de ces 3 paramètres comparé aux IgGm (ETP₀ = 1912 ± 24 et 1917 ± 18 nM.min ; pic de thrombine 258 ± 18 et 238 ± 12 nM ; IC₅₀-PCa = 6,7 ± 0,1 et 5,4 ± 0,6 nM pour ALB6 et IgGm respectivement). Au contraire, comparé au plasma supplémenté avec les IgGm, l'ajout d'AcMm 28F4 à 200 µg/mL dans le système induit une diminution de 84 % de l'ETP₀ (312 ± 45 vs 1917 ± 18 nM.min ; p < 0.0001), une forte réduction du pic de thrombine (9 ± 1 vs 238 ± 12 nM ; p < 0,0001) ainsi qu'une forte augmentation de l'IC₅₀-PCa (>65 vs 5,4 ± 0,6 nM soit une augmentation d'un facteur > à 12 ;

$p = 0,02$). L'addition d'AcMm 7F6G à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ n'interfère que sur la sensibilité à la PCa. L'ETP₀ n'est pas modifié (1935 ± 62 vs 1917 ± 18 nM.min), ni le pic de thrombine alors qu'une augmentation de 1,57 de l'IC₅₀-PCa est observée ($8,5 \pm 0,6$ vs $5,4 \pm 0,6$ nM, $p = 0,02$). Une étude de la sensibilité au système de la PC en présence des AcMm a également été réalisée par ajout d'une gamme de concentration en TM dans le système (**Figure 63 D**). Des résultats similaires à ceux obtenus lors l'addition de PCa ont été observés. Ainsi, l'ajout de 28F4 induit une forte résistance avec un IC₅₀-TM >20 nM. Ces résultats ont été confirmés avec le PPP 13000 g d'un autre donneur volontaire sain.

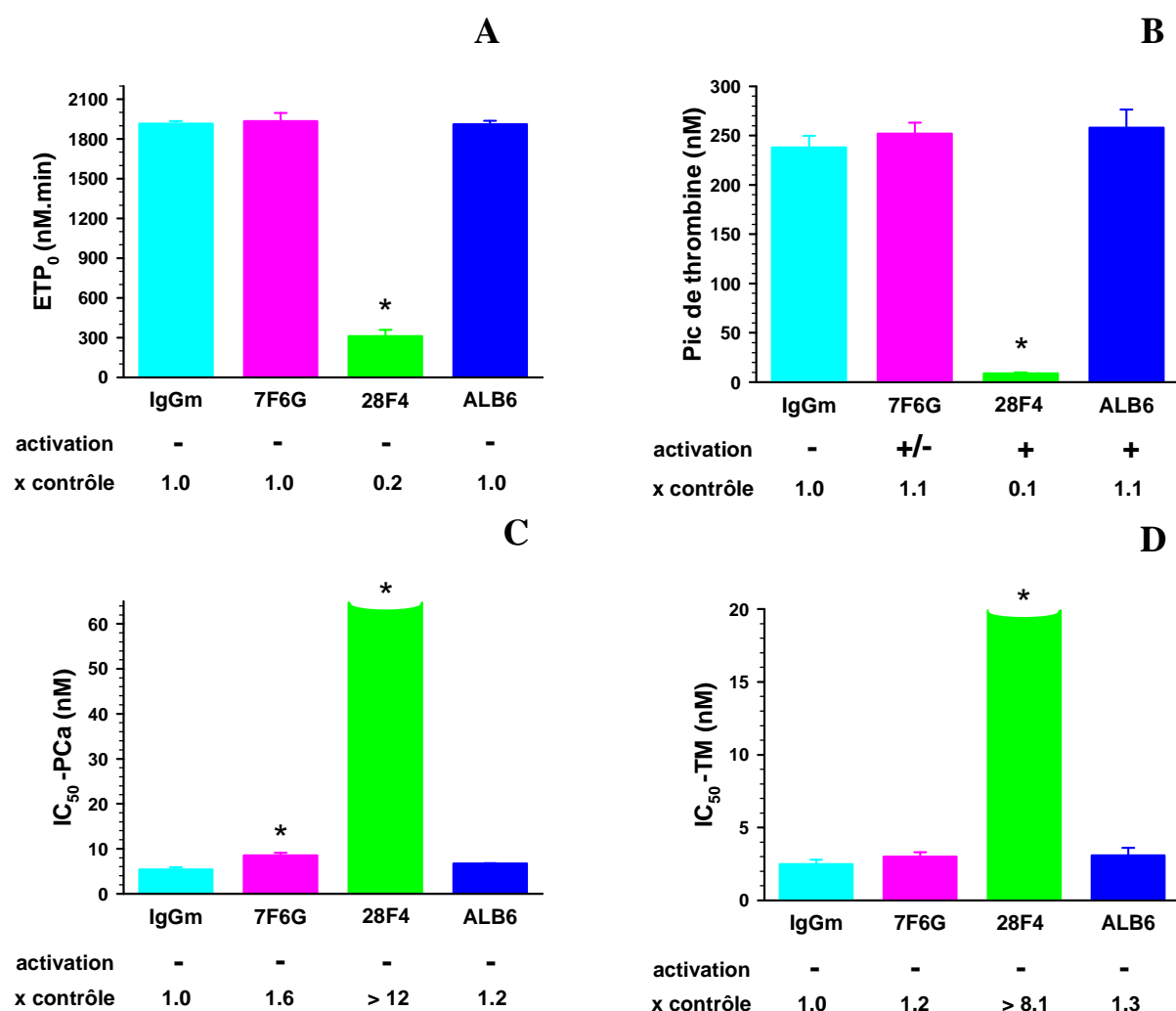


Figure 63 : Influence de l'interférence des AcMm avec les réactions pro- et anticoagulantes.

Les résultats (moyenne \pm SEM) ont été obtenus pour au moins 7 valeurs pour les ETP₀ et les pics de thrombine et 3 pour les IC₅₀-PCa et les IC₅₀-TM. * $p < 0,05$ AcMm vs IgGm.

La composition en phospholipides des MVP peut varier en fonction de l'agent utilisé pour les générer (ici : ionomycine 10 μM final). De plus, une membrane n'est pas seulement composée

de phospholipides mais également de protéines avec un domaine intra-membranaire. De manière à exclure un artéfact méthodologique dû à ces deux aspects (composition en phospholipides, contribution des protéines membranaires), des expériences ont également été réalisées en utilisant d'autres surfaces phospholipidiques anioniques. Des microvésicules générées à partir des plaquettes par activation avec du collagène (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ainsi que des vésicules phospholipidiques synthétiques ont été étudiées. Les plaquettes activées par le collagène permettent de générer une surface cellulaire par un activateur physiologique. Les VP construites avec des phospholipides synthétiques, PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 mole%, permettent de déterminer l'influence de la composition en phospholipides dans le système. Les résultats sont présentés **Figure 64**.

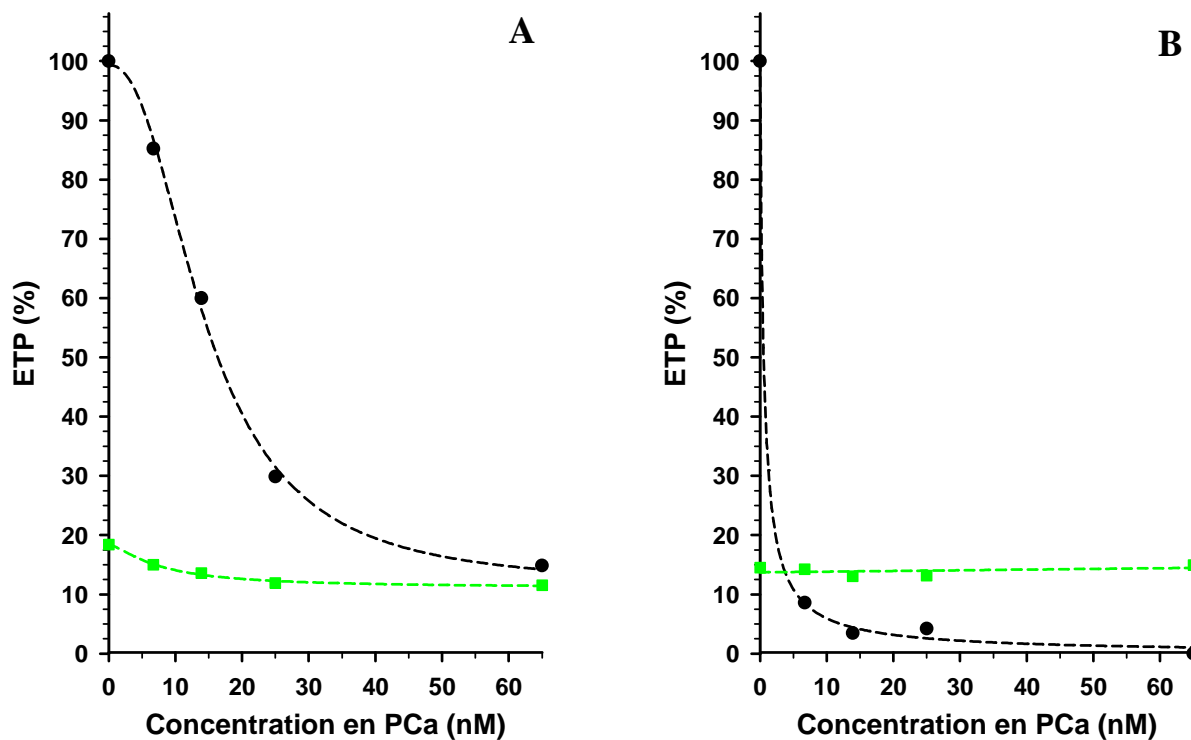


Figure 64 : Influence de la composition en phospholipides sur l'interférence avec les réactions pro et anti-coagulantes.

PPP/MVP collagène (A) et PPP/VP (B) supplémentés avec 28F4 (vert) ou des IgGm (noir) à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final. Les résultats sont exprimés en % par rapport à la valeur contrôle (ETP₀ en présence d'IgGm).

Des résultats similaires à ceux obtenus avec le PPP/MVP ont été obtenus avec ces deux spécimens plasmatiques supplémentés avec l'AcMm 28F4 tant pour la diminution de l'ETP₀ que pour la résistance à la PCa. Ainsi, une diminution de l'ETP₀ de 82 % a été observée lors l'addition de 28F4 à du PPP/MVP collagène (**Figure 64 A**). De même, une réduction de l'ETP₀ de 86 % a été observée lors de l'ajout de 28F4 à du PPP/VP (**Figure 64 B**).

Concernant la résistance à la PCa, des valeurs d'IC₅₀-PCa > à 65 nM ont été obtenues et ce pour les deux spécimens plasmatiques par comparaison avec les IgGm (16,2 et 0,5 nM pour le PPP/MVP collagène et le PPP/VP).

5.2.3.2 Influence de l'activation plaquettaire sur le phénotype procoagulant induit par l'interférence des complexes AcMm/antigène

Les AcMm étant capables d'induire une activation plaquettaire à des degrés variables, nous avons étudié la contribution de cette activation plaquettaire sur la génération et l'inhibition de la thrombine. Pour cela, des expériences de thrombinographie, similaires à celles présentées avec les différents PPP, ont été réalisées avec du PRP (**Figure 65**). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour au moins 7 valeurs.

Comme préalablement démontré, l'addition d'IgGm n'induit pas de variations significatives des paramètres thrombinographiques. Par contre, contrairement au PPP 13000 g, l'addition de l'anticorps activateur plaquettaire, ALB6, induit une augmentation significative de l'ETP₀ (2076 \pm 43 vs 1649 \pm 29 nM.min, p < 0,0001), du pic de thrombine (197 \pm 6 vs 114 \pm 3 nM, p < 0,0001) ainsi que de l'IC₅₀-PCa (42,5 \pm 8,4 vs 16,3 \pm 0,5 nM, p = 0,01) (**Figure 65 A à C**).

L'addition de l'AcMm 7F6G à 200 μ g/mL induit une augmentation significative de l'IC₅₀-PCa (23,4 \pm 3,0 vs 16,3 \pm 0,5 nM, p = 0,02) sans affecter la valeur de l'ETP₀ (1683 \pm 31 vs 1649 \pm 29 nM.min) ni du pic de thrombine. Cette augmentation de l'IC₅₀-PCa est similaire à celle observée pour le PPP 13000 g (1,43 et 1,57 fois respectivement). Au contraire, comparé aux IgGm, l'addition de l'AcMm 28F4 résulte en une diminution de l'ordre de 22 % de l'ETP₀ (1277 \pm 30 vs 1649 \pm 29 nM.min, p < 0,0002). Néanmoins, cette diminution est beaucoup plus faible que celle observée pour le PPP 13000 g en présence de MVP (312 \pm 45 vs 1917 \pm 18 nM.min, soit une réduction de 84 %). De même le pic de thrombine est diminué (37 \pm 2 vs 114 \pm 3 ; p = 0,0002) dans une proportion moindre que pour le PPP/MVP (9 \pm 1 vs 238 \pm 12 nM ; p < 0,0001). Cependant, comme pour le PPP/MVP, une résistance à la PCa est observée avec une valeur d'IC₅₀-PCa > 65 nM.

La sensibilité à la PCa a également été confirmée avec l'addition de TM dans le système (**Figure 65 D**). De façon similaire au PPP/MVP, une valeur d'IC₅₀-TM > à 20 nM a été obtenue lors de l'addition de 28F4 alors qu'une augmentation plus faible de l'IC₅₀-TM a été observée avec 7F6G (8,5 \pm 0,9 vs 5,6 \pm 0,9 nM pour 7F6G et IgGm respectivement ; p = 0,04). Ces données ont été confirmées avec le plasma d'un autre donneur volontaire sain.

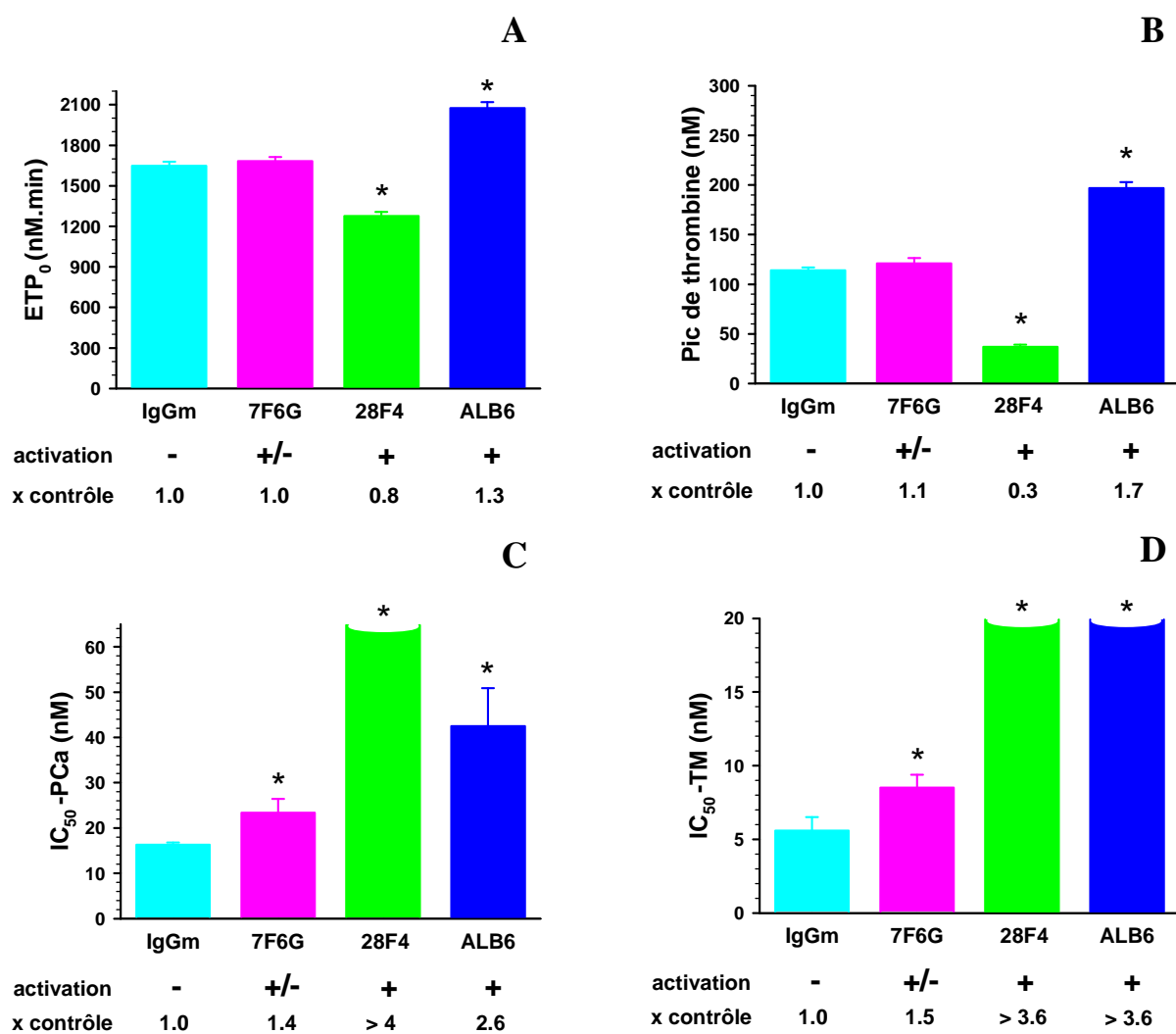


Figure 65 : Influence de l'effet activateur plaquettaire des AcMm sur l'activité de la thrombine générée.

Les résultats (moyenne \pm SEM) ont été obtenus pour au moins 7 valeurs pour les ETP₀ et les pics de thrombine et 3 pour les IC₅₀-PCa et les IC₅₀-TM. * $p < 0,05$ AcMm vs PRP IgGm.

5.2.3.3 Influence de la concentration en 28F4 sur l'effet activateur plaquettaire

L'AcMm 28F4, à 200 $\mu\text{g/mL}$, induit une forte activation plaquettaire contrairement à 7F6G à la même concentration. De manière à déterminer la contribution de cette activation sur le phénotype de la coagulation, nous avons fait varier la concentration en AcMm 28F4 dans le système. Ainsi, une gamme de concentration allant de 2 à 200 $\mu\text{g/mL}$ a été étudiée en PRP et PPP/MVP et les résultats (moyenne \pm SEM ; $n = 4$ à 10) sont présentés **Tableau XIX**.

Anticorps	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Plasma pauvre en plaquettes / MVP			Plasma riche en plaquettes		
		ETP ₀ (nM.min)	Pic de thrombine (nM)	IC ₅₀ -PCa (nM)	ETP ₀ (nM.min)	Pic de thrombine (nM)	IC ₅₀ -PCa (nM)
IgGm	10	1845 \pm 32	239 \pm 15	6.4 \pm 0.6	1658 \pm 44	120 \pm 3	12.9 \pm 1.9
	200	1917 \pm 18	238 \pm 12	5.4 \pm 0.6	1649 \pm 29	114 \pm 3	16.3 \pm 0.5
28F4	2	1707 \pm 29 * (<i>p</i> = 0,02)	159 \pm 12 * (<i>p</i> = 0,05)	10.2 \pm 0.7 * (<i>p</i> = 0,01)	1576 \pm 76	70 \pm 3 * (<i>p</i> = 0,04)	26.7 \pm 4.1 * (<i>p</i> = 0,01)
	10	1174 \pm 51 * (<i>p</i> = 0,003)	48 \pm 5 * (<i>p</i> = 0,03)	27.0 \pm 1.3 * (<i>p</i> = 0,01)	1556 \pm 28	73 \pm 2 * (<i>p</i> = 0,06)	> 65 * (<i>p</i> < 0,0001)
	200	312 \pm 45 * (<i>p</i> < 0,0001)	9 \pm 1 * (<i>p</i> < 0,0001)	> 65 * (<i>p</i> < 0,0001)	1277 \pm 30 * (<i>p</i> < 0,001)	37 \pm 2 * (<i>p</i> = 0,0002)	> 65 * (<i>p</i> < 0,0001)
7F6G	200	1935 \pm 62	252 \pm 11	8.5 \pm 0.6 * (<i>p</i> = 0,02)	1683 \pm 30	121 \pm 5	23.4 \pm 3.0 * (<i>p</i> = 0,02)

Tableau XIX : Influence de la concentration en AcMm sur l'activité de la thrombine générée.
 Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour n = 4 à 10. * *p* < 0,05 vs plasma en présence des IgGm.

Les données obtenues avec le PPP/MVP montrent que l'addition de 28F4 dans le système induit une modification des paramètres de la thrombinographie quelle que soit la concentration étudiée. Ainsi, en présence de l'AcMm 28F4, l'ETP₀, le pic de thrombine et l'IC₅₀-PCa sont modifiés de façon concentration dépendante. Comparées aux valeurs obtenues lors de l'addition des IgGm, les valeurs d'ETP₀ et de pic de thrombine sont toujours significativement plus faibles alors que les valeurs d'IC₅₀-PCa, sont toujours significativement plus élevées.

Concernant le PRP, les valeurs d'ETP₀ en présence d'AcMm 28F4, à 2 et 10 µg/mL, ne sont pas significativement différentes de celles observées en présence d'IgGm alors qu'à 200 µg/mL, une diminution significative de l'ETP₀ est observée. Au contraire, les valeurs de pic de thrombine sont statistiquement plus faibles que celles observées pour les IgGm quelle que soit la concentration en 28F4. De même, les valeurs d'IC₅₀-PCa sont toujours statistiquement supérieures à celles obtenues en présence d'IgGm. Néanmoins il est à noter qu'une très forte résistance à la PCa (IC₅₀-PCa > 65 nM) est observée pour l'AcMm 28F4 à 10 et 200 µg/mL alors qu'elle est plus faible à 2 µg/mL (26,7 ± 4,1 nM). De plus, à 2 µg/mL, 28F4 se comporte comme l'AcMm 7F6G à 200 µg/mL à savoir une absence d'effet anticoagulant (absence de diminution de l'ETP₀) et une faible inhibition de l'IC₅₀-PCa (26,7 ± 4,1 vs 23,4 ± 3,0 pour 28F4 et 7F6G respectivement).

Une comparaison des deux spécimens plasmatiques, PPP/MVP et PRP, montrent que l'effet anticoagulant, reflété par la diminution de l'ETP₀, est dominant en présence de PPP/MVP alors que l'effet procoagulant, reflété par une élévation de l'IC₅₀-PCa, est le phénomène principal en présence de PRP. Contrairement au PPP/MVP, le PRP intègre à la fois l'activation plaquettaire et les interférences avec les réactions dépendantes des phospholipides. Ainsi, l'effet anticoagulant de l'AcMm 28F4 est partiellement atténué par l'activation plaquettaire alors qu'elle vient renforcer l'effet procoagulant et ce de façon concentration dépendante.

5.2.4 Influence d'inhibiteurs plaquettaires sur l'action des AcMm

Pour essayer de mieux comprendre par quel(s) mécanisme(s) l'AcMm 28F4 induit une activation plaquettaire contribuant à un phénotype hypercoagulable par neutralisation partielle de son effet anticoagulant, des expériences en présence d'inhibiteurs plaquettaires ont été réalisées.

5.2.4.1 Influence d'inhibiteurs plaquettaires sur l'activation des plaquettes en agrégation photométrique

L'influence de plusieurs inhibiteurs plaquettaires choisis pour inhiber différentes voies d'activation des plaquettes a été étudiée en agrégation photométrique de manière à contrôler leur qualité et leur effet. Les expériences ont été réalisées avec du PRP citraté prélevé dans des tubes Monovette® (Sarstedt) ajusté à 150 G/L en présence de l'anticorps activateur plaquettaire ALB6 (1,875 µg/mL) ou d'ADP (10 µM). Une absence d'autoagrégation des plaquettes a été observée.

Des agrégations de l'ordre de 50 % et de 55 à 80 % ont été obtenues en présence d'ADP et d'ALB6 respectivement. Nous avons vérifié que l'ajout d'inhibiteurs plaquettaires à l'ADP (10 µM) n'induisait pas de modifications de l'agrégation plaquettaire (agrégation ≈ 50 %). Les expériences réalisées avec l'anticorps ALB6 ont montré un effet des inhibiteurs plaquettaires sauf pour ASA. Ainsi, il a été observé lors de l'ajout de dipyridamole, de c7e3 (abciximab) et de IV-3 une inhibition de l'agrégation plaquettaire avec des valeurs d'agrégation < à 20 %.

5.2.4.2 Influence d'inhibiteurs plaquettaires en thrombinographie

L'influence d'inhibiteurs plaquettaires a été étudiée en thrombinographie avec du PRP ajusté à 150 G/L de donneur sain. Le PRP a été préincubé, 10 min à température ambiante, en présence de divers inhibiteurs des plaquettes avant d'être étudié en thrombinographie.

Des expériences préliminaires avec 3 concentrations pour chaque inhibiteur sauf pour l'anticorps AK2 ont été réalisées de manière à s'assurer que ces inhibiteurs étaient neutres en absence de l'AcMm 28F4 sur une large gamme de concentrations (**Tableau XX**). De plus, de manière à confirmer la spécificité de ces agents sur les plaquettes, il a été vérifié qu'aucun n'avait d'effet en PPP/MVP. Enfin, il a été contrôlé que l'AcMm IV-3 (anticorps anti-FcγRIIa) inhibait l'effet activateur plaquettaire d'ALB6.

Inhibiteur	Concentration	ETP ₀	Pic de thrombine
contrôle		100	100
acide acétylsalicylique	10 µM	103 ± 2	99 ± 5
	100 µM	101 ± 2	100 ± 3
	1000 µM	109 ± 1	105 ± 1
dipyridamole	10 µM	97 ± 2	91 ± 6
	20 µM	99 ± 3	76 ± 1
	40 µM	101 ± 2	100 ± 3
milrinone	10 µM	96 ± 4	77 ± 5
	40 µM	89 ± 1	72 ± 1
	100 µM	94 ± 3	76 ± 1
IV.3	1 µg/mL	109 ± 3	111 ± 6
	2 µg/mL	98 ± 2	97 ± 3
	4 µg/mL	97 ± 2	88 ± 4
Abciximab (anti-α_{IIb}β₃)	10 µg/mL	93 ± 1	78 ± 5
	20 µg/mL	99 ± 2	78 ± 2
	30 µg/mL	103 ± 2	63 ± 2
AK2	20 nM	109 ± 1	110 ± 2
	85 nM	105 ± 6	119 ± 9

Tableau XX : Effet de la concentration de différents inhibiteurs plaquettaires sur l'activité de la thrombine générée.

Les résultats sont exprimés en % par rapport à la valeur contrôle (PRP sans inhibiteurs).

Le **Tableau XXI** présente les valeurs d'ETP₀ et de pic de thrombine (moyenne ± SEM ; n = 3), en absence et présence de l'AcMm 28F4, exprimées en pourcentage par rapport au contrôle (PRP sans 28F4).

Inhibiteurs	ETP ₀		Pic de thrombine	
	sans	avec	sans	avec
	28F4	28F4	28F4	28F4
Contrôle	100	76 ± 3	100	31 ± 1
acide acétylsalicylique (100 µM)	101 ± 2	70 ± 5	100 ± 3	31 ± 4
dipyridamole (40 µM)	101 ± 2	28 ± 3 *	100 ± 3	11 ± 1 *
Milrinone (40 µM)	87 ± 2 #	16 ± 2 *	79 ± 3 #	7 ± 1 *
IV.3 (2 µg/mL)	98 ± 2	74 ± 6	97 ± 3	32 ± 5
abciximab (20 µg/mL)	99 ± 2	35 ± 3 *	78 ± 2 #	15 ± 1*
AK2 (85 nM)	101 ± 7	75 ± 4	114 ± 8	32 ± 7

Tableau XXI : Effet de différents inhibiteurs plaquettaires sur l'activité de la thrombine générée.

Les résultats sont exprimés en % par rapport à la valeur contrôle (PRP sans inhibiteur). # p < 0,05 vs PRP contrôle et * p < 0,05 vs PRP contrôle en présence de l'AcMm 28F4.

Dans ces conditions expérimentales, aucun des inhibiteurs plaquettaires ajoutés en absence de l'AcMm 28F4 dans le système n'a d'effet sur l'ETP₀ sauf milrinone. Une diminution du pic de thrombine est obtenue pour deux inhibiteurs, abciximab et milrinone (78 ± 2 et 79 ± 3 % respectivement ; p < 0,001) en absence de 28F4.

En présence de l'AcMm 28F4 à 200 µg/mL, les inhibiteurs plaquettaires induisent des effets variables sur l'activité de la thrombine générée. Ainsi, l'acide acétylsalicylique qui bloque la production de thromboxane est sans effet sur l'ETP₀ (70 ± 5 vs 76 ± 3 %). Au contraire, le milrinone et le dipyridamole, connus pour inhiber la phosphodiesterase plaquettaire concourant ainsi à l'augmentation du taux d'AMPc ou de GMPc, abolissent l'effet activateur plaquettaire de l'AcMm 28F4 (ETP₀ = 16 ± 2 et 28 ± 3 pour le milrinone et le dipyridamole respectivement vs 76 ± 3 % pour le contrôle ; p < 0,02). Cette diminution de l'ETP₀ de 84 et

72 % est du même ordre de grandeur que celle observée avec du PPP/MVP (84 %, résultats présentés paragraphe 5.2.3.1). Cette diminution peut être attribuable au seul effet anticoagulant de l'AcMm 28F4 en présence de dipyridamole. Néanmoins, il est difficile de l'affirmer lors de l'ajout de milrinone qui a déjà un effet sur l'ETP₀ en absence de 28F4 (87 ± 2 ; p = 0,001). En ce qui concerne l'abciximab qui bloque le récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$, il réduit très fortement l'effet activateur de l'AcMm 28F4 (35 ± 3 vs 76 ± 3% ; p = 0,002). Au contraire, l'AcMm IV.3 dirigé contre le Fc γ RIIa et l'AcMm AK2 dirigé contre GpIb α n'ont pas d'effet en présence de l'AcMm 28F4 (ETP₀ = 74 ± 6 et 75 ± 4 pour IV-3 et AK2 vs 76 ± 3 % pour le contrôle).

5.3 Etude de l'influence des surfaces phospholipidiques sur les réactions pro- et anticoagulantes.

Les résultats obtenus sont en faveur de l'hypothèse d'une diminution des surfaces phospholipidiques disponibles pour les réactions pro- et anticoagulantes par la liaison des complexes anticorps/antigène au niveau des phospholipides membranaires.

Les différentes protéines impliquées, leur avidité pour les surfaces phospholipidiques ainsi que la cinétique des réactions mises en jeu pourraient favoriser une interférence avec les réactions procoagulantes plutôt que les réactions anticoagulantes. La PhtdSer est considérée comme le phospholipide essentiel pour la liaison du FII et la PhtdEth est rapportée comme importante pour le système de la PCa [315].

5.3.1 Influence de la composition en phospholipides sur la génération et l'inhibition de la thrombine

L'influence de la composition en phospholipides membranaires sur les réactions pro- et anticoagulantes au niveau des surfaces a tout d'abord été étudiée par thrombinographie de manière à avoir la résultante globale sur le système de la coagulation.

Nous avons ensuite déterminé la capacité de liaison de facteurs procoagulant (FII) et anticoagulant (PCa) en fonction des surfaces par SPR.

Enfin, dans le but d'explorer l'influence des phospholipides sur les réactions pro- et anticoagulantes séparément, nous avons étudié respectivement l'action du complexe prothrombinase et l'inactivation du FVa par la PCa en systèmes purifiés.

5.3.1.1 Influence de la composition en phospholipides sur l'activité de la thrombine générée

De manière à étudier l'influence de la composition en phospholipide sur l'activité de la thrombine générée, des VP, à 4 μM , variant par le rapport entre les trois phospholipides PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth ont été ajoutées à du PPP 13000 g et étudiées en thrombinographie.

Les MVP sont la surface idéale pour l'étude du PPP 13000 g en thrombinographie. Nous l'avons donc choisi comme comparateur. Lors de l'addition de VP, l'emploi de vésicules composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 mole% est recommandé et utilisé par d'autres équipes.

Les thrombinogrammes présentés **Figure 66** montrent un effet de la composition en phospholipides sur l'activité de la thrombine.

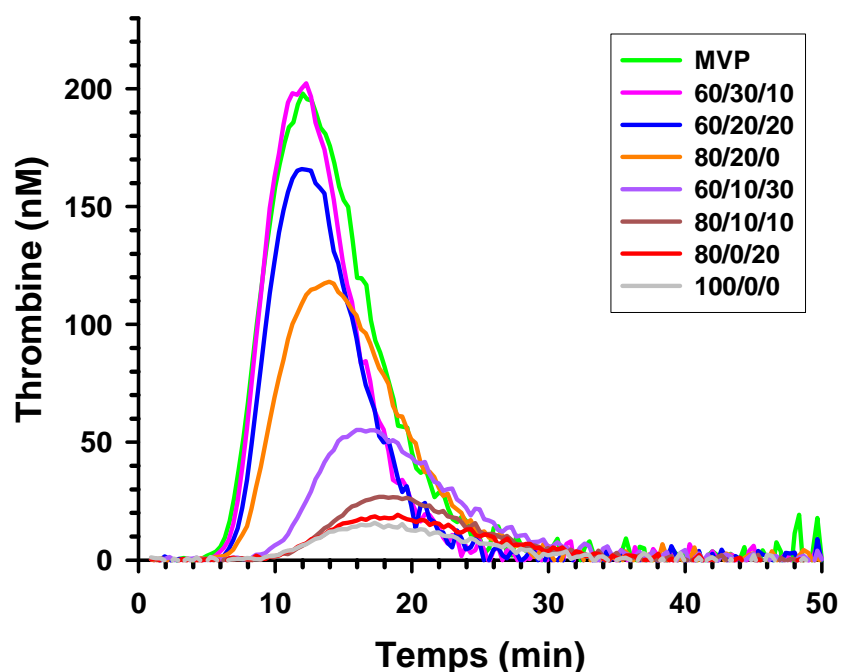


Figure 66 : Influence de la composition en phospholipides sur le thrombinogramme.
PPP 13000 g normal enrichi en vésicules phospholipidiques variant par le rapport en PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth.

Concernant l'addition de MVP dans le système, comparé aux VP induisant la plus forte activité thrombinique (PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/30/10 mole%), nous avons observé une phase d'initiation de génération de thrombine plus faible (6,8 et 7,3 min) ainsi qu'un ETP_0 plus élevé (1825 et 1563 $\text{nM}\cdot\text{min}$ pour les MVP et VP). Les valeurs de pic sont similaires (**Tableau XXII**).

Surface phospholipidique	Composition PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth (mole%)	ETP (nM.min)	Temps de latence (min)	Pic (nM)	Temps au pic (min)
MVP	-	1825	6,8	197	12,2
VP	60/30/10	1563	7,3	202	11,9
	60/20/20	1331	7,5	166	11,9
	80/20/0	1224	7,5	118	13,4
	60/10/30	648	10,4	56	16,5
	80/10/10	323	10,3	27	18,4
	80/0/20	251	10,7	18	18,4
	100/0/0	195	10,4	15	17,5

Tableau XXII : Influence de la composition en phospholipides sur les paramètres thrombinographiques.

L'augmentation de la quantité en PhtdSer dans les VP se traduit sur le thrombinogramme par une augmentation de l'activité de la thrombine générée (**Figure 66 et Tableau XXII**) ainsi que par une modification de tous les paramètres thrombinographiques (**Tableau XXII**). Une diminution de la phase d'initiation de génération de thrombine, une génération explosive plus rapide de thrombine ainsi qu'une augmentation de l'ETP₀ et du pic de thrombine ont été observées en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/20/0 mole% comparées à des VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/10/10 mole%. De même, une diminution de la phase d'initiation de génération de thrombine (10,4 à 7,3 min), une génération explosive plus rapide de thrombine ainsi qu'une augmentation de l'ETP₀ (648 à 1563 nM.min) et du pic de thrombine (56 à 202 nM) ont été observées avec l'augmentation de la quantité de PhtdSer (**Tableau XXII**) en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport de 60/10/30 ; 60/20/20 et 60/30/10 mole%. La présence de PhtdSer est meilleure pour l'activité de la thrombine générée que la présence de PhtdEth. Cependant la présence de PhtdEth joue un rôle puisque l'ETP₀ et le pic de thrombine sont plus élevés en présence de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 que dans un rapport 80/20/0 mole%. La présence à la fois de PhtdSer et de PhtdEth favorise l'activité de la thrombine générée. A somme égale, la présence de PhtdSer est meilleure que la présence de PhtdEth.

L'activité de la thrombine est quasi négligeable en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/0/20 mole% puisqu'elle est peu différente de celle observée en présence de VP composées de PhtdChol 100 mole% (251 vs 195 nM.min) et

utilisées comme contrôle négatif. La faible génération de thrombine observée en présence de vésicules uniquement composées de PhtdChol, donc ne contenant pas de phospholipides anioniques est imputable à la présence d'une faible quantité de phospholipides procoagulants encore présents dans le PPP 13000 g (0,05 à 0,07 μM équivalents PhtdSer).

5.3.1.2 Influence de la composition en phospholipides sur le système de la PCa

L'influence de la composition en phospholipide sur le système de la PCa a été étudiée par ajout d'une gamme de concentration en PCa à du PPP 13000 g en présence des différentes surfaces phospholipidiques (VP et MVP). Habituellement, il est utilisé une gamme en PCa s'étendant de 0 à 25 nM en présence de PPP 13000 g. Cependant de manière à pouvoir observer une différence d'effet sur la sensibilité à la PCa avec les différentes préparations de VP, l'échelle des concentrations a été adaptée par ajout d'une concentration plus faible (0,85 nM) et retrait de la plus forte concentration (25nM). La gamme de PCa étudiée ici s'étend donc de 0,85 à 13,9 nM. La **Figure 67 (A) et (B)** présente les résultats obtenus pour deux donneurs volontaires sains de manière à prendre en compte la variabilité de quantité de phospholipides procoagulants présents dans le PPP 13000 g et qui interfère dans l'activité thrombinique.

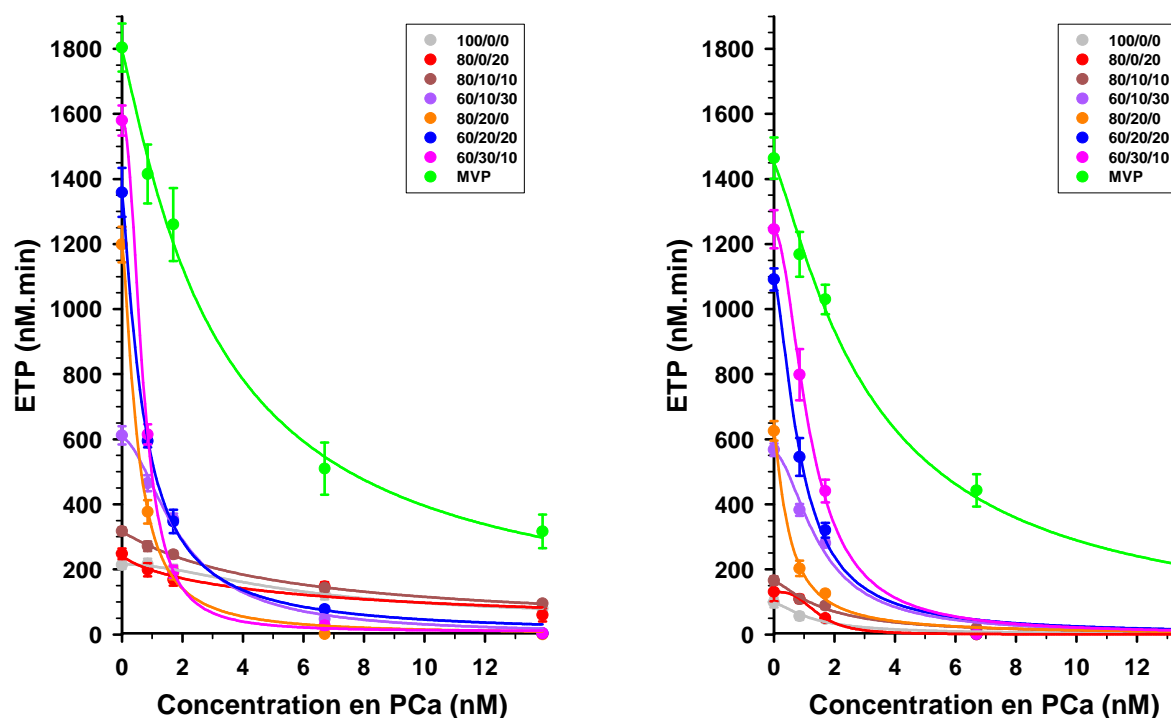


Figure 67 : Sensibilité de l'ETP à la PCa en présence de différentes surfaces phospholipidiques ajoutées à du PPP 13000 g de deux donneurs (A) et (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n = 3 à 5). La composition en VP est exprimée en mole% de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth.

Comparé au MVP surface optimale pour l'étude de la sensibilité à la PCa en PPP 13000 g, des valeurs d'ETP plus faibles sont observées en présence des VP quel que soit le rapport en PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth et quelle que soit la concentration en PCa.

L'addition de MVP comme surface phospholipidique au PPP 13000g, comparé aux VP, permet une étude de la sensibilité à la PCa sur une gamme plus large de concentration. Ainsi, alors qu'à 6,7 nM en PCa le suivi de l'activité thrombinique n'est plus possible en présence des différentes préparations de VP, seule une inhibition de l'ordre de 70 % de l'ETP est observée avec les MVP (**Figure 67**). Néanmoins, un effet de la composition en phospholipide des VP est observable pour les très faibles concentrations en PCa. Ainsi, à 0,85 nM, la sensibilité à la PCa augmente avec la quantité de PhtdEth. Ainsi l'addition de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/30/10, 60/20/20 et 60/10/30 mole% au PPP 13000 g se traduit par une diminution significative de l'ETP en rapport avec la quantité de PhtdEth. Des valeurs d'ETP de 798 ± 79 , 545 ± 58 et 383 ± 18 nM.min pour le donneur 2 (**Figure 67 B**) ont été observées à 0,85 nM ($p < 0,04$). Pour le donneur 1 (**Figure 67 A**), l'ETP tend à diminuer avec la quantité de PhtdEth mais n'est pas significativement différente entre les VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/30/10 et 60/20/20 mole% alors qu'elle l'est entre les VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 et 60/10/30 mole% ($p = 0,004$).

Cependant des différences mineures d'IC₅₀-PCa sont observées entre ces trois préparations (IC₅₀-PCa de 0,9 à 1,6 nM pour le donneur 1 et de 0,6 à 1,9 pour le donneur 2).

Concernant les VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/10/10 et 80/0/20 mole%, la sensibilité à la PCa varie peu avec la concentration et est similaire à celle obtenue en présence de VP PhtdChol 100 mole% et ce pour les deux donneurs. Cependant il est à noter que les valeurs d'ETP, en absence et en présence de PCa, sont un peu plus élevées pour le donneur 1 que le donneur 2. Ces différences peuvent s'expliquer par une quantité plus importante de résidus de phospholipides procoagulants dans le PPP 13000 g du donneur 1 (0,051 vs 0,046 μ M) ainsi que par la différence de génération de thrombine et de sensibilité à la PCa inter-individus.

5.3.2 Liaison de protéines de la coagulation en fonction des surfaces phospholipidiques

Les différences d'avidité pour les surfaces phospholipidiques des protéines impliquées dans la coagulation pourraient jouer un rôle dans le phénotype hypercoagulable induit par les aPL.

Nous avons donc déterminé la capacité de liaison ainsi que les caractéristiques cinétiques de facteurs de la coagulation en fonction des surfaces phospholipidiques. Ainsi, la liaison de la FII et de la PCa sur différentes surfaces phospholipidiques a été étudiée en présence de calcium (2 mM), par SPR en utilisant des protéines purifiées. Les différentes surfaces phospholipidiques (VP et MVP) ont été immobilisées sur un biocapteur L1 et les résultats ont été obtenus à partir d'au moins deux expériences indépendantes.

5.3.2.1 Liaison de la prothrombine

Un exemple de l'interaction du FII avec des VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/10/30 et 60/30/10 mole% est présenté **Figure 68**. Du FII à différentes concentrations (de 31 à 500 nM) est injectée sur les surfaces phospholipidiques immobilisées.

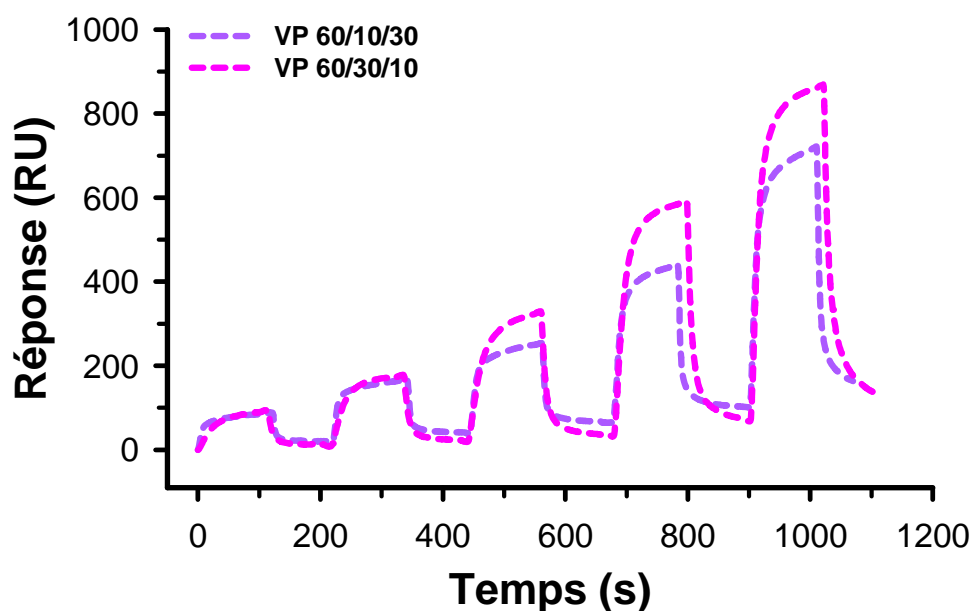


Figure 68 : Cinétiques de liaison du FII à différentes surfaces phospholipidiques.

Le FII est injectée à différentes concentrations sur les VP (ici : VP PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/10/30 et 60/30/10 mole%) immobilisées sur un biocapteur L1.

Les résultats (moyennes de 2 expériences) pour les différentes surfaces phospholipidiques sont présentés **Figure 69** et sont exprimés en unité de résonance (RU). Les valeurs correspondent au signal mesuré 20 s après la fin de l'injection et soustrait au signal obtenu pour le canal de référence sur lequel ont été immobilisé des VP composées de PhtdChol 100 mole%.

Des variations importantes de réponses ont été obtenues en fonction de la composition en phospholipides. Cette variation est d'autant plus forte que la concentration en FII augmente. Ainsi des réponses de 12 à 70 RU et de 42 à 655 RU sont observées pour les différentes

préparations en VP pour des concentrations en FII allant de 31 à 500 nM. La liaison augmente avec la concentration en PhtdSer ce qui est en accord avec les résultats obtenus en thrombinographie. La meilleure liaison est obtenue pour les VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 et 60/30/10 mole%. En comparaison avec les surfaces synthétiques, la liaison de FII sur les MVP immobilisées induit des réponses de 33 à 322 RU pour 31 à 500 nM. Comparé aux expériences de thrombinographie où les MVP sont les surfaces permettant la meilleure génération de thrombine, la liaison de FII sur les MVP est plus faible que celles observées pour la plupart des VP.

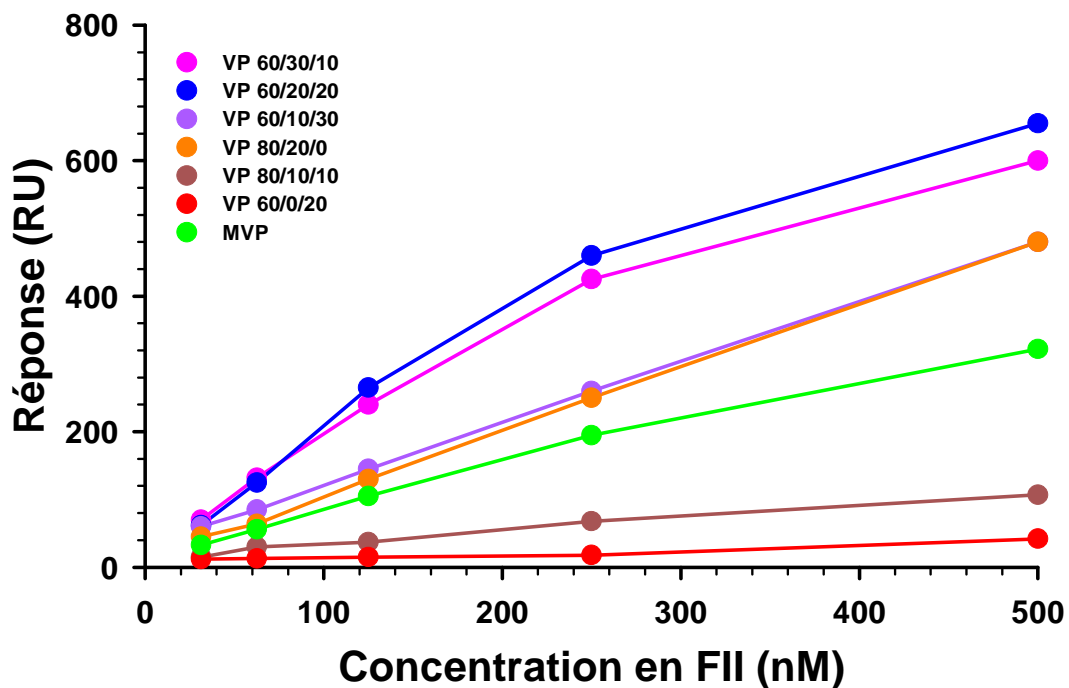


Figure 69 : Comparaison de la liaison du FII à différentes surfaces phospholipidiques immobilisées sur un biocapteur L1.

Les valeurs sont mesurées 20 s après la fin de l'injection et correspondent aux valeurs après soustraction du canal de référence (VP PhtdChol 100 mole%).

5.3.2.2 Liaison de la PCa

Les cinétiques de liaison de la PCa sur les surfaces phospholipidiques ont été déterminées en utilisant 5 concentrations (de 27,5 à 446 nM). Un exemple de cinétiques de liaison de la PCa obtenue pour deux préparations de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/10/30 et 60/30/10 mole% est présenté **Figure 70**.

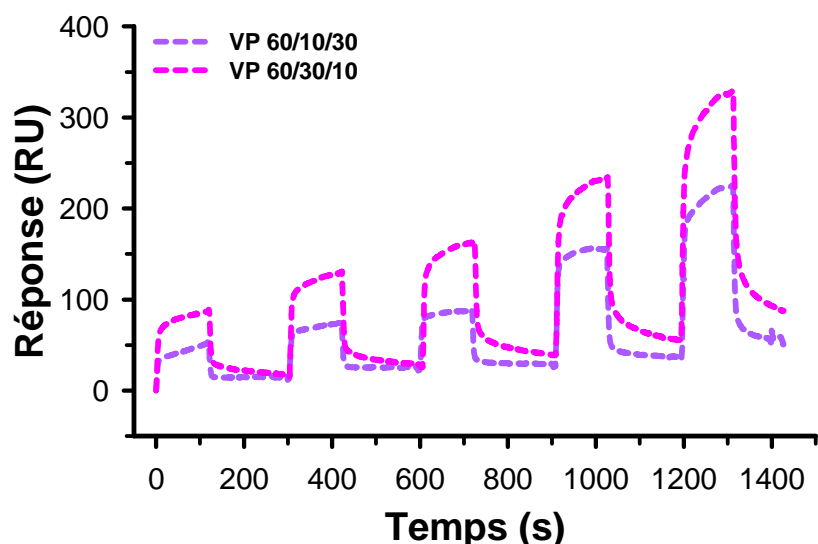


Figure 70 : Cinétiques de liaison de la PCa à différentes surfaces phospholipidiques.
 La PCa est injectée à différentes concentrations sur les VP (ici VP PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/10/30 et 60/30/10 mole%) immobilisées sur un biocapteur L1.

Les résultats (moyenne de deux expériences) pour les différentes surfaces phospholipidiques sont présentés **Figure 71** et sont exprimés en unité de résonance (RU). Les valeurs correspondent au signal mesuré 20 s après la fin de l'injection et soustrait au signal obtenu pour le canal de référence.

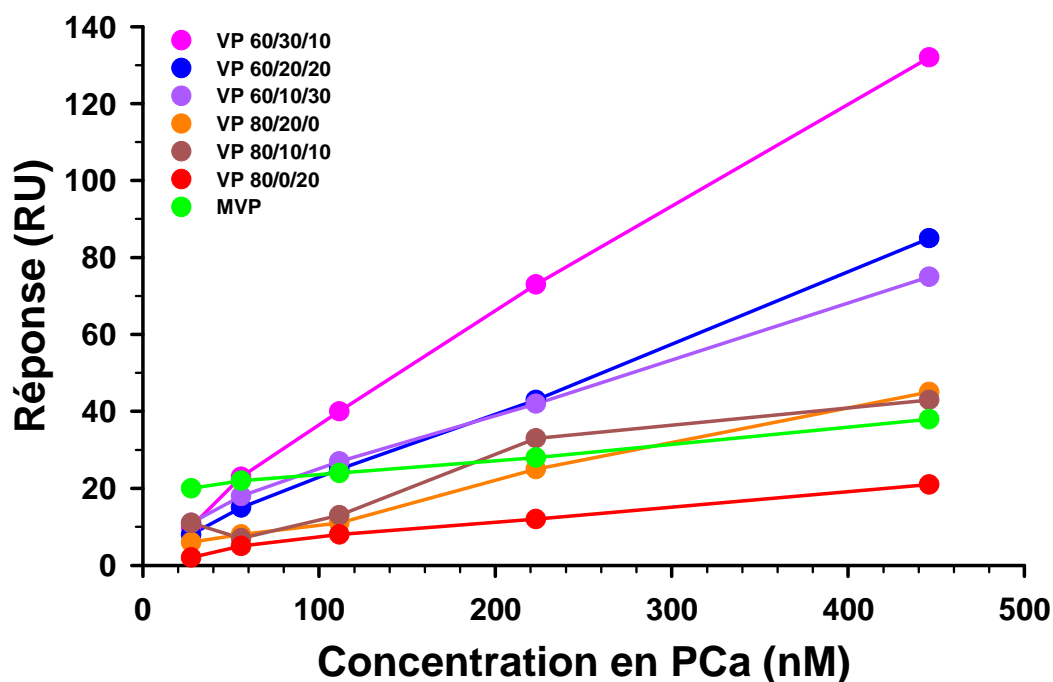


Figure 71 . Comparaison de la liaison de la PCa à différentes surfaces phospholipidiques immobilisées sur un biocapteur L1.

Les valeurs sont mesurées 20s après la fin de l'injection et correspondent aux valeurs après soustraction du canal de référence (immobilisation de VP PhtdChol 100 mole%).

La liaison est très faible à 27,5 nM en PCa, et une absence de variation entre les différentes préparations de VP est observée (réponses de 2 à 11 RU). Cette variation de liaison entre les différentes VP augmente néanmoins avec la concentration de la protéine mais reste faible. Des variations de 21 à 132 RU sont observées à une concentration en PCa de 446 nM. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus en thrombinographie. La faible liaison de la PCa au niveau des surfaces phospholipidiques quelle que soit le rapport molaire en PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth justifie, en thrombinographie, l'absence de différences majeures observées entre les différentes VP étudiées. Concernant la liaison de la PCa au niveau des MVP, elle varie peu quelle que soit la concentration mais est néanmoins supérieure aux VP aux plus faibles concentrations. Des variations de réponse de l'ordre de 20 à 38 RU ont été observées pour la gamme de concentration en PCa.

5.3.2.3 Constantes cinétiques d'interaction du FII et de la PCa

Les constantes d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) ainsi que l'avidité (K_D) de l'interaction du FII et de la PCa sur les différentes surfaces ont été calculées (Tableau XXIII).

surface phospholipidique	FII			PCa		
	$k_{on} \times 10^4$	$k_{off} \times 10^{-2}$	$K_D \times 10^{-6}$	$k_{on} \times 10^6$	$k_{off} \times 10^{-2}$	$K_D \times 10^{-9}$
	(1/Ms)	(1/s)	(M)	(1/Ms)	(1/s)	(M)
VP 80/0/20	6,5	7,8	1,20	20,0	28	13,9
VP 80/10/10	2,2	7,0	3,18	3,0	27	90,0
VP 60/10/30	5,8	7,5	1,29	2,5	22	88,0
VP 80/20/0	6,0	8,1	1,35	30,0	113	36
VP 60/20/20	24,0	8,4	0,35	63,0	48	7,6
VP 60/30/10	85,0	83,3	0,98	9,5	18	18,0
MVP	8,0	6,0	0,75	28	31	11,0

Tableau XXIII : Constantes cinétiques d'interaction (k_{on} , k_{off} et K_D) du FII et de la PCa avec différentes surfaces cellulaires immobilisées sur un biocapteur L1.

Concernant la liaison du FII, peu de différences au niveau des valeurs de k_{off} ont été observées entre les différentes VP (de 7 à $8,4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) sauf pour celles composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/30/10 mole%. Une valeur similaire aux différentes VP a été observée pour les surfaces d'origine plaquettaire. Les variations observées au niveau des K_D s'expliquent donc seulement par la différence de capacité de liaison au niveau des surfaces (k_{on}). Une avidité similaire a été observée pour les VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/0/20 et 80/20/0 mole% ($K_D \approx 1,3 \mu\text{M}$). Cette avidité est plus faible en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/10/10 mole%. Une augmentation de l'avidité a été observée avec la concentration en PhtdSer. L'avidité des VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 mole% est plus forte qu'en présence de VP dans un rapport de 60/10/30 mole%. Néanmoins la présence de PhtdEth joue un rôle puisque l'avidité du FII pour les VP est meilleure en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 mole% que dans un rapport de 60/30/10 mole%. Une avidité intermédiaire à celles observées pour les VP a été obtenue en présence de MVP ($0,75 \mu\text{M}$).

De même que pour le FII, peu de différences au niveau des valeurs de k_{off} ont été observées pour la liaison de la PCa en fonction des VP sauf pour celles composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/0 mole%. Une valeur de $31 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ a été calculée pour les surfaces d'origine plaquettaire. Des variations de valeurs de K_D ont été mises en évidence et s'expliquent donc seulement par la différence de liaison de la protéine au niveau des surfaces (k_{on}) qui varie de 2,5 à $63 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Une faible avidité a été observée pour les VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/10/10 et 80/20/0 mole%. Cette avidité est plus forte en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/0/20 mole%. La présence de PhtdEth influe donc sur la liaison de la PCa mais ne semble néanmoins pas suffisante pour la liaison de la protéine. Ainsi l'avidité de la PCa est plus forte en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 mole% que dans un rapport 60/10/30 mole%. La présence à la fois de PhtdSer et de PhtdEth à somme égale favorise donc la liaison de la PCa. Concernant la liaison de la PCa au niveau des MVP, une avidité intermédiaire à celles observées pour les différentes VP a été observée.

5.3.3 Génération de thrombine en fonction de la composition en phospholipides

Dans le but de déterminer l'influence de la composition en phospholipide sur la conversion de FII en thrombine, des mesures de l'activité de la prothrombinase en fonction de la composition en phospholipides ont été réalisées. Comparé à la thrombinographie qui mesure la résultante globale des réactions de coagulation, cette technique permet de déterminer l'influence des phospholipides uniquement sur la conversion de FII en thrombine.

L'activité de la prothrombinase a été mesurée dans des conditions où la thrombine formée est seulement dépendante des phospholipides. Les résultats (moyenne \pm SEM pour $n = 9$), présentés **Figure 72** sont exprimés en variation d'absorbance par seconde (Δ absorbance/s) après soustraction de la valeur contrôle (Δ absorbance/s en présence de VP composées de PhtdChol 100 mole%)

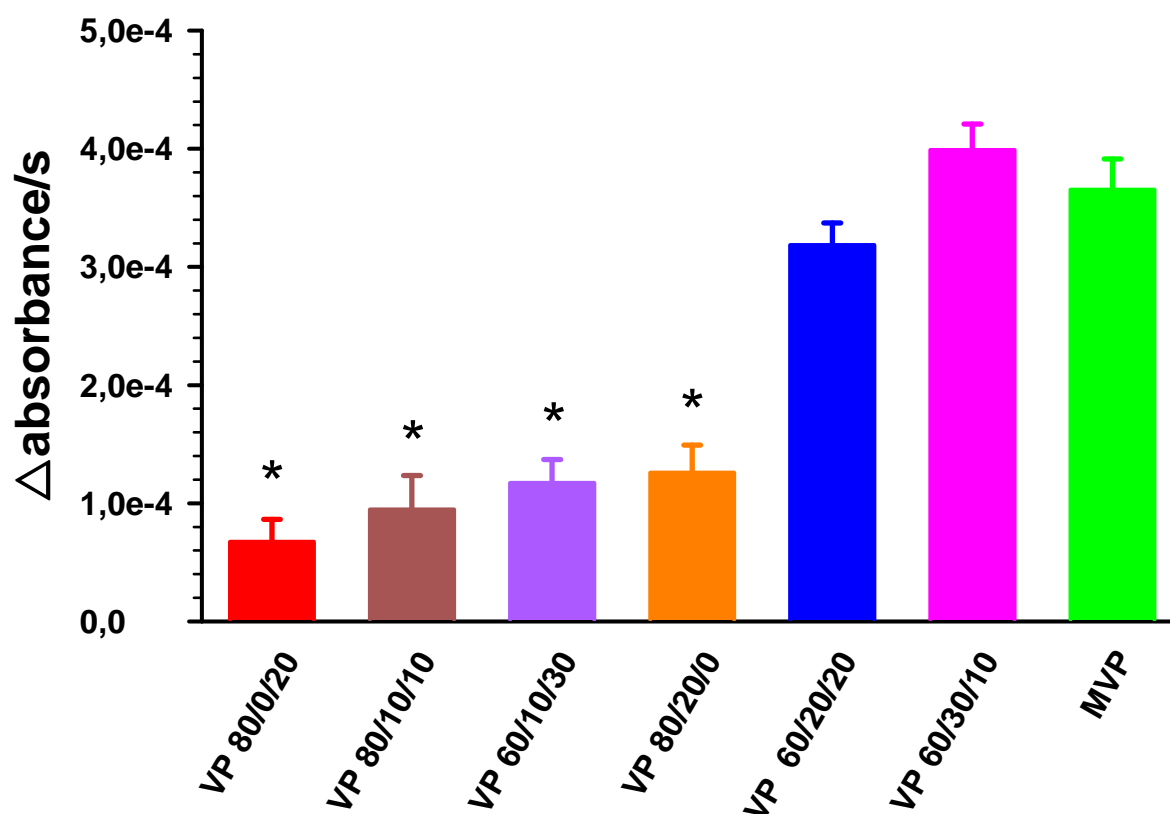


Figure 72 : Effet de la composition en phospholipides sur la génération de thrombine.

La composition en vésicules phospholipidiques (VP) est exprimée en mole% de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth. MVP = microvésicules plaquettaires. * $p < 0,05$ vs MVP.

Les différentes VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans des rapports molaires différents induisent un effet hétérogène sur la conversion de FII en thrombine. La capacité des

VP d'influer sur la conversion de FII augmente avec la quantité en PhtdSer ce qui est en accord avec les résultats obtenus en thrombinographie et en SPR.

Comparé aux MVP, la conversion de FII tend à être plus élevée avec les VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/30/10 mole% et plus faible avec celles composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 mole% respectivement bien que la différence ne soit pas significativement différente pour les trois surfaces. Ces données sont différentes de celles obtenues en thrombinographie. L'ETP₀ en présence de MVP est supérieur à ceux obtenus pour les VP ce qui traduit une génération de thrombine plus importante en présence de ces surfaces.

Pour les autres préparations de VP, une différence significative de conversion de FII a été observée ($p < 0,0001$) en comparaison avec les MVP. Enfin, une absence de variation significative de la génération de thrombine est observée entre les VP composées de 80/20/0, 60/10/30, 80/10/10 et 80/0/20 mole% PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth.

Nous avons observé des valeurs similaires d'absorbance/s entre les VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans des rapports 60/10/30 et 80/20/0 mole% ($p = 0,53$). Ces données montrent que, bien que la PhtdSer soit nécessaire à la conversion de FII, la présence de PhtdEth favorise également la génération de thrombine. Pour obtenir une génération de thrombine de l'ordre de celle obtenue avec les MVP, la PhtdSer et la PhtdEth doivent être présentes ensemble et dans des rapports d'au moins 20 mole%.

5.3.4 Inactivation du FVa par la PCa

Dans le but de déterminer l'influence de la composition en phospholipide uniquement sur les réactions anticoagulantes, principalement le système de la PCa, des mesures d'inactivation du FVa par la PCa ont été réalisées.

L'inactivation du FVa par la PCa est une réaction en deux phases, une phase rapide associée à un clivage du FVa en Arg 506 de la chaîne lourde et une phase lente associée à un clivage en Arg 306 de la chaîne lourde.

5.3.4.1 Effet de la protéine S sur l'inactivation du FVa par la PCa

La PS est rapportée dans la littérature comme le cofacteur de l'inactivation du FVa par la PCa. Nous avons donc vérifié dans un premier temps, l'effet de l'addition de PS sur l'inactivation du FVa.

Du FVa purifié (1 nM) a été incubé avec de la PCa (0,2 nM), des VP (50 μ M) composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth variant par leur rapport molaire et du FXa (5 nM) en absence ou présence de 490 nM de PS. L'activité du FVa a été déterminée via son activité cofacteur dans l'activation du FII par le FXa en fonction de temps. L'inactivation du FVa est exprimée en pourcentage par rapport à la quantité de FVa présent au début de l'expérience (t = 0 min).

Comme observé sur l'exemple présenté sur la **Figure 73**, en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/10/30 mole%, la PS catalyse l'inactivation du FVa. Ainsi, le temps nécessaire à 50 % d'inactivation du FVa est divisé par 2 en présence de PS (1 min vs 30 s). A 5 min de réaction, l'activité du FVa n'est plus que de 17 % en présence de PS alors qu'elle est encore de 36 % en présence de PCa seule. L'effet de la PS a été confirmé en présence des autres VP. La PS agit en accélérant le clivage du FVa en Arg 306. Pour la suite des expériences, de la PS à 490 nM a été ajoutée dans le système.

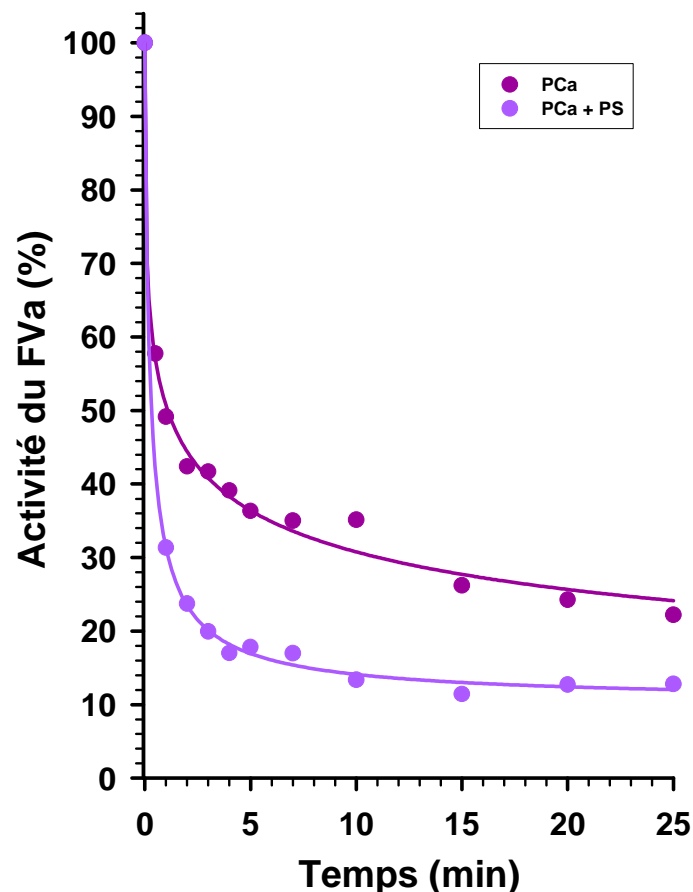


Figure 73 : Inactivation du FVa par la PCa en absence ou présence de PS et en présence de surface phospholipidique.

Les VP sont composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/10/30 mole%.

5.3.4.2 Effet de la composition en surface phospholipidique sur l'inactivation du FVa par la PCa

Dans le but d'étudier l'influence de la composition en phospholipides sur l'inactivation du FVa, des VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth variant par leur rapport molaire ont été étudiés. Les VP (50 μ M) ont été incubées avec du FVa purifié (1 nM), du FXa (5 nM), de la PCa (0,2 nM) et de la PS (490 nM). Les résultats sont présentés **Figure 74**.

Nous avons vérifié que les VP seulement composées de PhtdChol (contrôle négatif) n'induisait pas d'inactivation du FVa. Une inactivation négligeable du FVa a été observée.

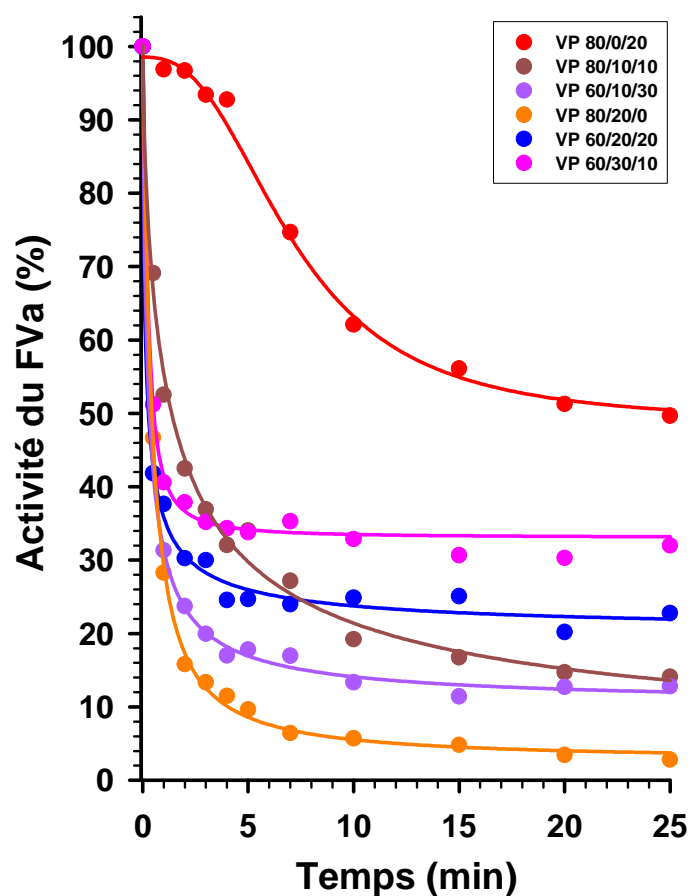


Figure 74 : Effet de la composition en surface phospholipidique sur l'inactivation du FVa par la PCa en présence de protéine S.

Les VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth sont exprimées en rapport molaire.

L'inactivation du FVa par la PCa est dépendante de la composition en phospholipides. La quantité de PhtdSer et PhtdEth influe sur l'activité du FVa. Ainsi, une très faible inactivation du FVa est observée lorsque la surface phospholipidique ne contient pas de PhtdSer. Une inactivation d'environ 50 % est obtenue seulement au bout de 25 min en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/0/20 mole%. L'inactivation du

FVa la plus forte est obtenue lors de la présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/20/0 mole%.

L'inactivation du FVa augmente avec la quantité de PhtdEth. Ainsi, nous avons observé une inactivation du FVa plus forte en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/10/30 mole% que dans un rapport 60/20/20 mole%. De même, l'inactivation du FVa en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/20/20 est plus forte que dans un rapport 60/30/10 mole%. La composition en phospholipides semble jouer un rôle sur l'accélération du clivage en Arg 306 par la PS.

L'étude des VP contenant une quantité importante de phospholipides neutres (PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/10/10 mole%) a montré une inactivation intermédiaire par rapport aux autres VP. Ainsi, jusqu'à environ 4 min, l'inactivation du FVa est inférieure à celle observée avec les autres VP sauf celles composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 80/0/20 mole%, alors qu'à 25 min, elle est similaire à celle observée en présence de VP composées de PhtdChol/PhtdSer/PhtdEth dans un rapport 60/10/30 mole%. L'interférence de la PS sur la vitesse de clivage en Arg 306 semble moins importante en présence de ces VP.

En conclusion, l'inactivation du FVa est donc fortement accélérée en présence de surfaces phospholipidiques anioniques et est dépendante de la composition en phospholipides. Ces surfaces induisent une augmentation variable du clivage de l'Arg 306 par la PS.

5.4 Caractérisation épitopique et cinétique des AcMm

Les caractéristiques cinétiques d'interaction des complexes anticorps/antigène pourraient expliquer les variations du phénotype observé chez les patients aPL. Notre objectif est de déterminer à partir des AcMm, les contributions relatives de la cible, de l'épitope reconnu et des constantes cinétiques sur le phénotype hypercoagulable. Une étude de l'influence sur le phénotype hypercoagulable de la région épitopique reconnue ainsi que des caractéristiques cinétiques des complexes anticorps/antigène a été réalisée par SPR.

5.4.1 Carte épitopique

Les 9 AcMm, obtenus grâce à une collaboration avec une équipe australienne, sont tous dirigés contre le domaine I de la β_2 GPI. En utilisant la SPR, nous avons affiné la détermination de la spécificité épitopique de ces anticorps au sein de ce domaine. Les résultats obtenus à partir de deux méthodes sont présentés **Tableau XXIV et XXV**. Dans la première méthode (**Tableau XXIV**), la β_2 GPI est liée par l'intermédiaire du premier AcMm fixé au

RAMFc puis le 2^{ème} AcMm est injecté. Lorsque la liaison du 2^{ème} anticorps est diminuée, les épitopes de cette paire ont été considérés comme identiques ou partiellement chevauchants (selon le ratio molaire). Dans la deuxième méthode (**Tableau XXV**), la β_2 GPI est immobilisée sur le biocapteur et les deux AcMm sont injectés successivement. Lorsque la liaison du 2^{ème} AcMm est diminuée les épitopes de cette paire ont été considérés comme identiques ou partiellement chevauchants (selon le pourcentage d'inhibition). Les deux méthodes présentent des avantages et des inconvénients. La 1^{ère} méthode permet de s'affranchir d'une modification de conformation de la protéine puisque la β_2 GPI n'est pas directement immobilisée sur le biocapteur contrairement à la 2^{ème} méthode. Une modification de conformation de la protéine pourrait supprimer ou modifier le site de liaison d'un ou plusieurs AcMm. Si cette méthode ne modifie pas la conformation de la protéine, elle comporte un assemblage moléculaire moins stable que dans la 2^{ème} méthode où les AcMm injectés se lie directement à la protéine immobilisée. La 1^{ère} méthode comporte 3 assemblages moléculaires avant la liaison du deuxième AcMm. De plus, toutes les paires d'AcMm n'ont pu être étudiées avec la 1^{ère} méthode du fait d'une absence ou faible liaison de la β_2 GPI sur certains AcMm fixés sur le RAMFc. Ces deux méthodes sont donc complémentaires pour la détermination de la carte épitopique.

Si la plupart des interactions sont réciproques, des interactions asymétriques ont été observées pour plusieurs AcMm. Ainsi, concernant les AcMm 3G11C et 3G11F, lorsque l'AcMm 3G11F est fixé en premier, l'inhibition de liaison de 3G11C est presque totale (7 %) alors que si 3G11F est fixé après 3G11C sa liaison est chevauchante (56 %). Concernant les AcMm 4B2C et 3G11C, lorsque 4B2C est fixé en premier, la liaison de 3G11C est inhibée partiellement (28 %) alors que si 4B2C est fixé après 3G11C sa liaison n'est pas inhibée (70 %). De même pour les AcMm 4B2E et 3G11C lorsque 4B2E est fixé en premier, la liaison de 3G11C est partiellement inhibée (29 %) alors que si 4B2E est fixé après 3G11C sa liaison n'est pas inhibée (65 %) (**Tableau XXV**).

Ces résultats mettent en évidence que l'AcMm 3G11C reconnaît une région épitopique commune à 3G11F mais néanmoins moins importante ce qui permet à l'AcMm 3G11F de se lier mais dans une plus faible proportion que seul. Au contraire, l'AcMm 3G11F une fois fixé masque quasi complètement l'épitope reconnu par 3G11C ce qui l'empêche de se fixer sur la protéine. Des conclusions similaires peuvent être faites pour les paires d'AcMm 3G11C ; 4B2C et 3G11C ; 4B2C.

Anticorps 1 (RU)		IgGm (RU)	β_2 GPI	Anticorps 2									
				2B8G	2C7G	3G11C	3G11F	4B2C	4B2E	7F6G	8G4E	9G1	
2B8G	690	214	0,35										
2C7G	609	304	0,13										
3G11C	593	233	< 0										
3G11F	638	265	0,82	0,66	0,48	0	0,05	0	0	0,89	0,95	0,78	
4B2C	535	290	0,68	0,97	0,83	0,2	0,17	0,18	0,17	1,1	1,1	1,6	
4B2E	621	270	0,55	0,97	0,96	0,47	0,29	0,35	0,21	1,2	1,1	1,6	
7F6G	730	240	0,64	0,7	0,39	0,27	0,66	0,46	0,55	0,18	0,98	0,58	
8G4E	681	269	0,64	0,46	0,18	0,08	0,6	0,31	0,28	0,67	0,08	0,33	
9G1	659	255	0,1										

Tableau XXIV : Interaction de la β_2 GPI avec les AcMm – ratios molaires des interactions par paires d’AcMm.

Le ratio molaire de liaison de la β_2 GPI (Diagnostica Stago ; 200 μ g/mL) au premier AcMm à la surface de la RAMFc est calculé par : $[\text{RU } \beta_2\text{GPI} / \text{RU } 1^{\text{er}} \text{ AcMm}] \times [\text{masse moléculaire } 1^{\text{er}} \text{ AcMm} / \text{masse moléculaire } \beta_2\text{GPI}]$. Le ratio molaire de liaison du second AcMm à la β_2 GPI est calculé par : $[\text{RU } 2^{\text{ème}} \text{ AcMm} / \text{RU } \beta_2\text{GPI}] \times [\text{masse moléculaire } \beta_2\text{GPI} / \text{masse moléculaire } 2^{\text{ème}} \text{ AcMm}]$. Comme précédemment proposé par Daiss *et al* [384], une inhibition d’interaction a été définie par un ratio molaire plus faible que la moyenne des ratios molaires des interactions entre AcMm identiques (cases grisées) plus deux écarts types (ratio molaire < 0,28 - **noir**) et une absence d’inhibition d’interaction par un ratio molaire plus grand que la moyenne des ratio molaires des interactions entre AcMm identiques plus trois écarts types (ratio molaire > 0,35 - **bleu**). Les liaisons sont dites chevauchantes lorsque les ratios molaires sont situés entre ces deux valeurs (**rose**). Les cases grisées représentent les ratios obtenus pour les paires d’AcMm identiques. Ils ne sont pas égaux à 0 du fait de la dissociation du premier AcMm fixé sur la RAMFc.

<u>Anticorps</u>	2B8G	2C7G	3G11C	3G11F	4B2C	4B2E	7F6G	8G4E	9G1
2B8G	5	1,5	80	95	92	95	90	95	90
2C7G	12	8	95	97	85	92	95	97	90
3G11C	95	95	45	56	70	65	95	95	98
3G11F	93	94	7	5	30	27	95	95	95
4B2C	94	93	28	32	20	22	96	99	94
4B2E	90	90	29	35	30	32	96	99	93
7F6G	90	88	75	85	90	88	10	97	60
8G4E	89	93	75	90	88	95	92	6	80
9G1	92	92	78	95	85	85	80	88	25

Tableau XXV : Interaction de la β_2 GPI avec les AcMm – pourcentage de fixation du deuxième anticorps après fixation du premier sur la β_2 GPI immobilisée sur un biocapteur CM5.

Une inhibition d'interaction a été définie pour un pourcentage de fixation plus faible que la moyenne des pourcentages de fixation des interactions entre AcMm identiques (cases grisées) plus deux écarts types (fixation < 45,8 % - **noir**) et une absence d'inhibition d'interaction par un pourcentage de fixation plus grand que la moyenne des pourcentages de fixation des interactions entre AcMm identiques plus trois écarts types (rapport molaire > 60 % – **bleu**). Les liaisons sont dites chevauchantes lorsque les pourcentages de fixation sont situés entre ces deux valeurs (**rose**). Les cases grisées représentent les pourcentage de fixation du deuxième AcMm pour les paires d'AcMm identiques. Ils ne sont pas égaux à 0 du fait de la dissociation du premier AcMm fixé sur la β_2 GPI.

La carte épitopique résultante des études de liaison de paires d'AcMm anti- β_2 GPI sur RAMFc ainsi que de la liaison de paires d'AcMm sur la β_2 GPI immobilisée sur un biocapteur CM5 est représentée **Figure 75**.

Elle permet d'identifier six régions épitopiques sur le domaine I de la protéine dont deux sont chevauchantes (3G11F, 3G11C, 4B2E, 4B2C) et deux très proches (7F6G et 9G1) mais pas chevauchantes.

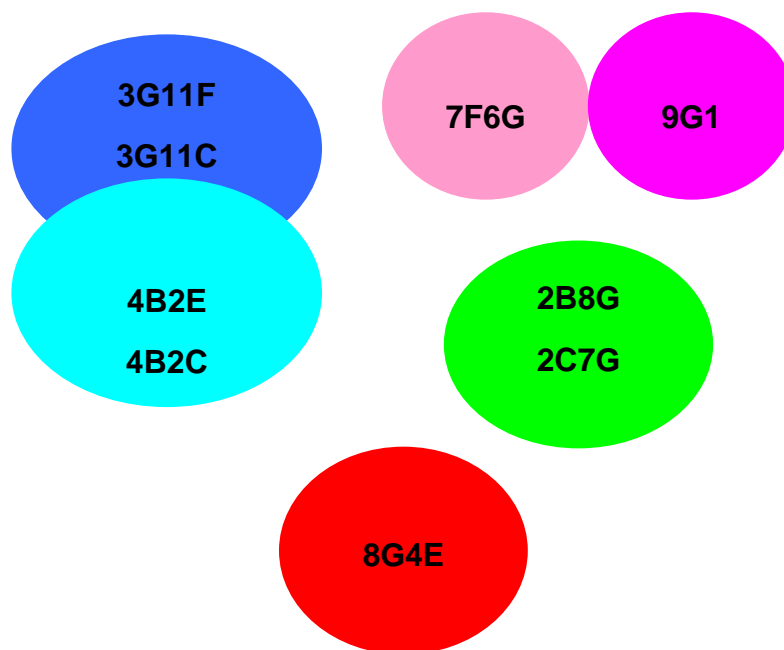


Figure 75 : Carte épitopique des AcMm anti- β_2 GPI dirigés contre le domaine I de la β_2 GPI.

5.4.2 Détermination des constantes cinétiques d'interaction des AcMm

La liaison des AcMm à leur protéine immobilisée par couplage covalent sur un biocapteur CM5 a été étudiée et les constantes cinétiques d'association et de dissociation (k_{on} et k_{off}) ainsi que la constante de dissociation (K_D) ont été calculées. Les AcMm ont été injectés à 5 concentrations et les expériences ont été réalisées en double. Un profil typique de liaison des AcMm est présenté **Figure 76**.

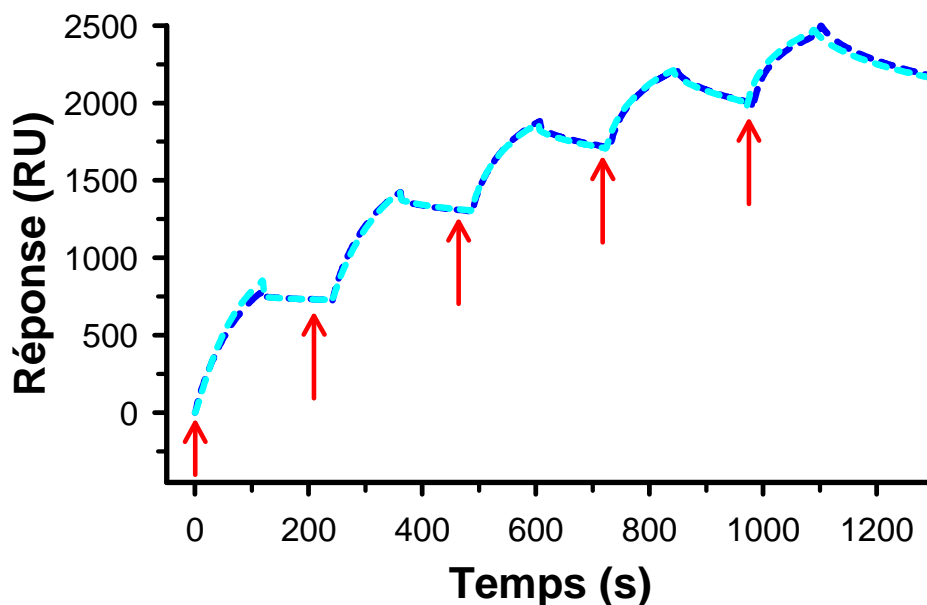


Figure 76 : Cinétiques d'interaction entre l'AcMm 28F4 et le FII sur un biocapteur CM5.

Les flèches rouges correspondent aux différentes injections de l'AcMm. Les résultats ont été obtenus à partir de deux expériences indépendantes (courbes bleu et bleu clair).

La synthèse des résultats est présentée **Tableau XXVI**. Concernant les AcMm dirigés contre la β_2 GPI et principalement ceux dirigés contre le domaine I, il existe des variations d'un facteur dix tant pour les constantes d'avidité que pour les constantes d'association et de dissociation. Les AcMm non dirigés contre le domaine I de la β_2 GPI présentent des avidités variables, certains ont une avidité assez proche de celles observées pour les AcMm dirigés contre le domaine I (8C3 et 6A4) alors que 6F3 présente une avidité plus faible (71,4 nM). De même, concernant les anticorps dirigés contre la PC/PCa, une hétérogénéité de liaison est observée. Des variations de 0,7 à 157 nM ont été obtenues pour trois AcMm. Des observations similaires ont été obtenues avec l'étude d'AcMm dirigés contre le FII. De plus, il est à noter que certains anticorps sont très dépendants de la conformation de la protéine immobilisée pour la reconnaissance de leur antigène. Ainsi pour l'AcMm RL1-3, les cinétiques d'interaction de l'AcMm avec le FII n'ont pas pu être déterminées par SPR. L'immobilisation du FII sur le biocapteur induit probablement une modification de la conformation de la protéine qui n'est alors plus reconnue par RL1-3.

L'hypercoagulabilité variable associée aux aPL peut être expliquée par les constantes cinétiques. Notre hypothèse est que la constante de dissociation a un rôle primordial. Comparées aux données obtenues en thrombinographie, les AcMm 3G11F et 7F6G induisent

des effets similaires avec une augmentation modérée de l'IC₅₀-PCa (20,7 et 23,4 nM respectivement). Ces AcMm reconnaissent une région épitopique différente sur le domaine I de la β_2 GPI mais présente une constante de dissociation identique ($1,68$ et $1,38 \times 10^{-4}$ M pour 3G11F et 7F6G respectivement). Ces résultats sont donc en faveur de notre hypothèse d'un rôle important de la constante de dissociation. Néanmoins, l'AcMm 28F4 qui interfère à la fois avec les réactions pro- et anticoagulantes (diminution de l'ETP₀ et augmentation de l'IC₅₀-PCa) présente une constante de dissociation forte comparée à 7F6G et 3G11F. Cependant cet AcMm est dirigé contre le FII et non contre la β_2 GPI ce qui impliquerait également un rôle de la cible et donc de la région épitopique. Les AcMm 3G11C et 3G11F ont un effet similaire en thrombinographie. Ils reconnaissent des régions épitopiques identiques mais possèdent des constantes de dissociation qui diffèrent d'un facteur 10.

Plusieurs paramètres peuvent expliquer l'hétérogénéité d'effet observée chez les aPL. Les constantes cinétiques peuvent interférer dans le mécanisme mais ne semblent pas jouer un rôle primordial d'après ces résultats. Néanmoins, il est à noter que les constantes cinétiques ont été déterminées par immobilisation de la protéine sur le biocapteur. Physiologiquement, les réactions ont lieu au niveau des membranes plaquettaires. La détermination des constantes cinétiques en SPR sur des surfaces plaquettaires (MVP ou plaquettes lavées) immobilisées sur le biocapteur permettrait peut être de mettre en évidence un rôle plus important de ces constantes. La cible ainsi que la région épitopique semble également interférer dans le mécanisme.

AcMm	Antigène	$k_{on} \times 10^4$ (1/Ms)	$k_{off} \times 10^{-4}$ (1/s)	$K_D \times 10^{-9}$ (M)	ETP ₀ (%)	IC ₅₀ -PCa (nM)
3G11F	β ₂ GPI	29,3 ± 0,3	1,68 ± 0,87	0,57	103	20,7
4B2C		10,1 ± 0,1	0,62 ± 0,4	0,62	101	11
2C7G		5,3 ± 0,1	0,40 ± 0,13	0,77		
4B2E		8,6 ± 0,1	0,66 ± 0,31	0,77		
2B8G		14,6 ± 0,1	1,24 ± 0,27	0,85		
9G1		41,7 ± 0,1	4,07 ± 0,50	0,98		
8G4E		27,0 ± 0,1	3,22 ± 0,33	1,20	103	8
7F6G		11,3 ± 0,1	1,38 ± 0,45	1,22	101	23,4
3G11C		1,6 ± 0,1	0,84 ± 0,07	5,21		
8C3		8,4 ± 0,4	0,12 ± 0,03	1,20	98	> 65
6F3		6,9 ± 0,4	0,23 ± 0,04	3,30	109	> 65
6A4		1,4 ± 0,1	10,00 ± 1,00	71,40	102	14
12H8		PC/PCa	0,4 ± 0,3	6,60 ± 0,50	157	99
B1-3	2,7 ± 0,6		0,18 ± 0,02	0,68		
9E2	0,5 ± 0,1		2,90 ± 0,20	62	107	16
RL1-3	FII	non déterminée	non déterminée	non déterminée		
J01-1		0,5 ± 0,1	10,60 ± 0,80	214	107	32
28F4		2,8 ± 0,1	21,60 ± 0,07	76	80	> 65

Tableau XXVI : Caractéristiques cinétiques de liaison des AcMm à leur cible immobilisée par couplage covalent.

Les valeurs de constantes cinétiques d'association et de dissociation ainsi que la constante de dissociation n'ont pas pu être déterminées pour l'AcMm RL1-3, la méthode de SPR n'étant pas adaptée pour cet AcMm dont la liaison au FII est très dépendante de la conformation de la protéine. En bleu : les AcMm dirigé contre le domaine I de la β₂GPI. Les valeurs d'ETP₀ et d'IC₅₀-PCa ont été déterminées en thrombinographie avec du PRP ajusté à 150 G/L. L'ETP₀ est exprimé en % par rapport à la valeur contrôle (PRP en présence d'IgGm à 200 µg/mL).

6 DISCUSSION

Plusieurs mécanismes non mutuellement exclusifs ont été proposés dans la littérature pour rendre compte de l'effet thrombotique associé aux aPL. Les deux principaux sont une activation cellulaire plus particulièrement plaquettaire et une interférence avec le système anticoagulant de la PCa aux surfaces des plaquettes [1, 2].

Nous avons montré en utilisant principalement deux AcMm (28F4 et 7F6G) dirigés l'un contre le FII et l'autre contre la β_2 GPI que ces deux mécanismes jouaient un rôle [385]. Nous avons démontré que la diminution d'activité du système anticoagulant de la PCa par les aPL survient indépendamment de l'activation des plaquettes [385]. Nous avons également démontré qu'une activation plaquettaire induite par les anticorps, lorsqu'elle conduit à une forte exposition des phospholipides à la surface plaquettaire, s'oppose à l'effet anticoagulant des aPL [385]. Cela contribue à renforcer le phénotype procoagulant induit par la résistance à la PCa.

Les avidités des AcMm pour leurs cibles sont le plus souvent rapportées pour être plus élevées (de l'ordre de 10^{-9} – 10^{-10} M ; [283]) que celles des auto-anticorps (de l'ordre de 10^{-6} M ; [256, 258]). Néanmoins, la pertinence clinique de notre étude est attestée par la démonstration que les AcMm étudiés ont des effets similaires à ceux observés chez des patients aPL en thrombinographie [9]. Lors de l'addition à du plasma de donneur sain, l'AcMm 28F4 se comporte comme les IgG purifiées de patients ayant un LA qu'ils possèdent ou non des anticorps anti- β_2 GPI. Ainsi, l'AcMm 28F4 induit une inhibition des réactions procoagulantes (effet anticoagulant – LA) qui se traduit par une diminution de l'ETP₀ et une inhibition des réactions anticoagulantes (forte diminution de la sensibilité à la PCa) qui se traduit par une augmentation de l'IC₅₀-PCa. L'AcMm 7F6G, lui, mime l'effet observé avec les IgG de patients n'ayant pas de LA mais possédant des anticorps anti- β_2 GPI, montrant seulement une diminution de la sensibilité à la PCa qui se traduit par une augmentation de l'IC₅₀-PCa. Cela est en accord avec les données cliniques récentes qui suggèrent que les profils de patients LA possédant des anticorps anti-FII sont associés à des événements thrombotiques, en particulier veineux, tandis que les profils des patients LA possédant des anticorps anti- β_2 GPI sont associés à des événements thrombotiques dans tous les territoires et spécialement des événements artériels [386]. De plus, les effets observés avec l'AcMm 28F4 sont en accord avec les données que nous avons rapportées sur une série de quarante patients aPL [9] : l'association entre la résistance à la PCa dans un système mesurant le suivi en

thrombine active et les manifestations cliniques est plus évidente quand l'effet anticoagulant (effet LA) est pris en compte [9].

Dans plusieurs travaux étudiant l'activation plaquettaire par les aPL, les auteurs ont utilisé la synthèse de thromboxane pour déterminer la présence d'une activation plaquettaire chez des patients aPL [338, 339, 342, 382, 387]. Puisque la génération de thrombine est dépendante de la quantité en phospholipides anioniques présente à la surface des plaquettes, nous avons dans un premier temps étudié l'étape ultime de l'activation plaquettaire à savoir l'exposition des phospholipides anioniques. Nos travaux, réalisés avec des protéines purifiées et des plaquettes lavées humaines, ont montré que les AcMm induisaient une activation plaquettaire jusqu'à l'exposition des phospholipides anioniques seulement en présence de leur antigène. Cette exposition des phospholipides anioniques induite par les AcMm est donc en faveur de la génération de thrombine. En accord avec le fait que l'augmentation des surfaces phospholipidiques accélère la génération de thrombine, nous avons montré qu'ALB6 induisait une forte augmentation de l'exposition des phospholipides anioniques ainsi qu'une augmentation de la quantité totale de thrombine générée.

Il est clairement admis que les plaquettes lavées sont plus sensibles à l'activation par les anticorps que les plaquettes présentes dans le plasma [381]. Nous avons trouvé une activation plaquettaire par les AcMm ajoutés à du PRP mais cette activation était comparativement moins forte que celle observée lors de l'ajout des AcMm à des plaquettes lavées. Des valeurs de l'ordre de $7 \mu\text{M}$ *versus* $2 \mu\text{M}$ ont été observées en présence de 28F4 en plaquettes lavées et en PRP respectivement. Des valeurs $< 1 \mu\text{M}$ ont été observées pour 7F6G. En thrombinographie, une quantité de phospholipides de $4 \mu\text{M}$ est optimale pour la génération de thrombine. L'augmentation de la quantité de phospholipides anioniques induite par les AcMm et présents au début de la réaction serait donc en faveur d'une augmentation de génération de thrombine. Néanmoins, une absence d'effet sur l'activité de la thrombine générée (ETP_0) en présence de l'AcMm 7F6G a été observée. L'AcMm qui induit une faible augmentation d'exposition des phospholipides anioniques comparé à un anticorps connu pour être activateur plaquettaire, ALB6, suggère qu'un seuil minimum d'exposition des phospholipides anioniques est nécessaire pour interférer avec les réactions procoagulantes. Bien que les plaquettes lavées soient plus sensibles à l'activation plaquettaire, l'étude de l'activation plaquettaire en présence de plaquettes lavées permet de montrer que les anticorps, sans leur antigène, n'ont pas d'effet et donc de s'assurer que l'activation plaquettaire est dépendante de

la présence de l'anticorps et de son antigène. Nos résultats sur la capacité des AcMm à induire une activation plaquettaire jusqu'à exposition des phospholipides anioniques sont en accord avec les données rapportées par Warner *et al* [345] qui ont montré que du sérum de patients aPL induisait une augmentation modeste de l'exposition des phospholipides anioniques comparée à un ionophore calcique et comparée à nos données. Cependant, notre étude présente l'avantage d'étudier des IgG purifiées et donc d'attribuer l'effet observé aux anticorps alors que les données présentées par Warner *et al* [345] ont été obtenues à partir de sérums. Des données antérieures obtenues en cytométrie en flux n'avaient pas montré de différences dans la capacité à activer les plaquettes entre des sérums de patients aPL et de donneurs sains [344]. Ces résultats discordants peuvent s'expliquer par le fait que les sérums dans cette dernière étude n'ont pas été inactivés par chauffage et que les sérums contrôles induisent la formation de microvésicules plaquettaires. L'exposition des phospholipides anioniques est normalement associée à la formation de microvésicules plaquettaires comme décrit par Solum NO [18] et Holmsen et Day [388]. L'exposition des phospholipides anioniques induite par les AcMm est en cohérence avec l'augmentation du taux de microvésicules circulantes observée chez les patients aPL [389-391], bien que leur présence soit controversée [392, 393].

Du fait d'une avidité plus forte des AcMm mais également de leur caractère monoclonal, le degré d'activation plaquettaire observé pouvait être surévalué par rapport à ce qui peut survenir physiologiquement. Dans le but de renforcer la pertinence clinique de notre étude avec les AcMm, nous avons comparé l'effet activateur plaquettaire observé en présence des AcMm avec celui obtenu avec des auto-anticorps humains connus pour être activateurs plaquettaires. Un effet activateur plaquettaire par des auto-anticorps a été clairement démontré dans la littérature dans plusieurs pathologies. Ainsi, des anticorps dirigés contre le facteur 4 plaquettaire ou l'interleukine 8 dans les thrombopénies induite par l'héparine [70, 72] et des anticorps anti-streptokinase lors d'un traitement thrombolytique par la streptokinase [66, 71] sont activateurs plaquettaires dans des études en système purifié. Les résultats observés ont montré que la quantité d'exposition des phospholipides anioniques induite par les AcMm était de l'ordre de celle observée avec des auto-anticorps humains activateurs plaquettaires.

De manière à établir un parallèle entre nos résultats d'exposition des phospholipides anioniques et les données de sécrétion plaquettaire étudiées par différents auteurs [338, 339, 342, 382, 387], nous avons mesuré la synthèse de thromboxane. L'activation plaquettaire se déroule selon une succession de séquences : changement de forme, agrégation, sécrétion et

exposition des phospholipides anioniques à la surface jusqu'à la microvésiculation. Nos données observées avec les AcMm sont en accord avec cette séquence puisque les anticorps induisent de façon hétérogène également la sécrétion des granules. La sécrétion a également été étudiée par mesure du facteur 4 plaquettaire afin de conforter les données.

Cependant en regard de la sécrétion plaquettaire, il est à noter que nos résultats ne sont pas en accord avec ceux de Warner *et al* [345] qui n'ont pas observé d'agrégation et de sécrétion plaquettaire lors de l'incubation de plaquettes lavées avec des sérums de patients aPL alors qu'ils ont observé une augmentation de l'exposition des phospholipides anioniques

Des données contradictoires concernant le rôle du polymorphisme en position 131 du Fc γ RIIa sur l'activation plaquettaire ont été rapportées [50-52]. Ainsi Brandt *et al* [51] ont montré une activation plaquettaire par des anticorps de patients ayant une TIH moins forte en présence du phénotype His131His. Bachelot *et al* [50] et Denomme *et al* [52] n'ont pas trouvé d'effet du phénotype sur l'activation plaquettaire par des anticorps de patients ayant une TIH et des anticorps connus pour être activateurs plaquettaires (ALB6 et P256) respectivement. De manière à prendre en compte un effet possible du polymorphisme du Fc γ RIIa, les expériences ont été réalisées avec un donneur présentant un phénotype Arg131His. Les résultats obtenus ont été confirmés avec des donneurs His131His. Une absence de variation entre le phénotype Arg131His et His131His a été observée sur la quantité d'exposition des phospholipides anioniques par les AcMm. Ces données sont en accord avec l'absence d'implication du phénotype Fc γ RIIa avec les manifestations du SAPL rapportée par Atsumi *et al* [394]. Néanmoins, une différence a été observée entre les différents phénotypes sur l'activité de la thrombine générée en présence et en absence de PCa.

Le mécanisme d'action des anticorps conduisant à l'activation des plaquettes n'est pas clairement établi. Nos résultats montrant que l'exposition des phospholipides anioniques et la sécrétion plaquettaire pour les AcMm/antigène sont similaires suggèrent une voie d'activation commune. Il est envisageable que l'activation plaquettaire intervienne par l'intermédiaire du récepteur Fc γ RIIa par liaison de la partie Fc des IgG. Cependant, Jankowski *et al* [347] ont démontré qu'une activation cellulaire pouvait avoir lieu indépendamment du domaine Fc des IgG. Un autre mécanisme possible pour expliquer cette activation pourrait impliquer des récepteurs présents à la surface des plaquettes. L'identification de récepteurs plaquettaires pour les deux cibles principales des aPL [395, 396] est en faveur de cette hypothèse. Le FII se lie aux intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$ [396, 397] et la β_2 GPI aux récepteurs GpIb α et apoER2' [339, 353]. Nous pouvons donc envisager que les complexes anticorps/antigène activent les

plaquettes *via* ces récepteurs. La **Figure 77** représente une proposition des mécanismes possibles par lesquels les aPL peuvent induire une activation plaquettaire.

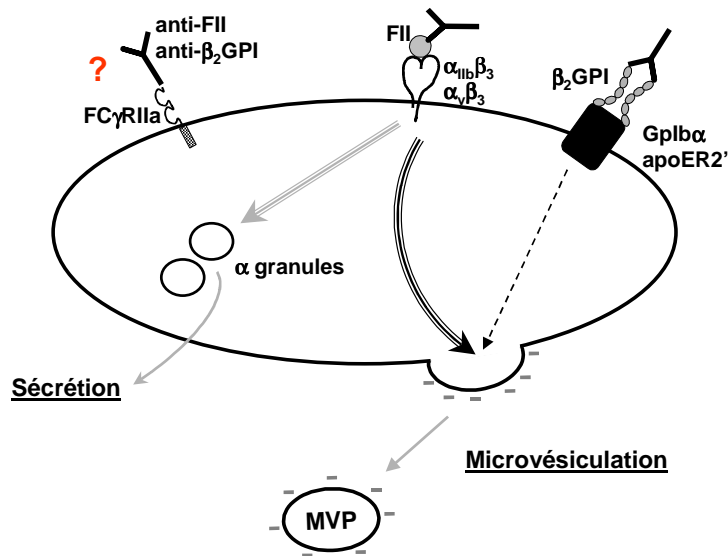


Figure 77 : Proposition de mécanismes pour expliquer l'effet activateur plaquettaire par les aPL.

L'épaisseur des flèches rend compte de l'intensité du phénomène induit par les complexes anticorps/antigène.

Hanly et Smith [398] ont montré que des aPL pouvaient accélérer ou inhiber le taux de formation de thrombine. Les aPL pourraient ainsi accélérer la génération de thrombine en augmentant la quantité de surface procoagulante au début du processus de la coagulation permettant une génération de thrombine plus rapide. Cette disponibilité plus rapide de surfaces phospholipidiques anioniques peut également induire une liaison plus importante des complexes anticorps/antigène qui entre en compétition avec la liaison des complexes procoagulants sur ces surfaces. Cette liaison pourrait interférer avec les réactions procoagulantes au niveau des surfaces phospholipidiques conduisant à moduler l'accélération de la génération de thrombine.

En présence d'ALB6, l'augmentation de la thrombine générée est plus élevée en présence (augmentation de l'ETP de 1,5 à 2,3 fois) qu'en absence de PCa (augmentation de l'ETP de 1,3 fois). Ces données sont en accord avec le phénotype de résistance à la PCa dépendant des plaquettes rapporté par Taube *et al* [399] chez des donneurs sains. Ces auteurs suggèrent que l'activation plaquettaire favorise la génération de thrombine par relargage du FV plaquettaire qui est décrit comme moins sensible à la protéolyse par la PCa que le FV plasmatique [400]. Le PCI, principal inhibiteur de la PCa, est également relargué par les plaquettes. Cela résulte en un phénotype comparable à celui observé pour les plasmas de patients avec une mutation

du gène du FV (FV Leiden) à savoir un phénotype de résistance à la PCa. La génération de thrombine initiée par de faible concentration en FT et en FVIIa a lieu de façon explosive lors de la phase de propagation après une phase d'initiation où de faibles quantités de thrombine sont produites. Ainsi, le début de la phase de propagation de génération de thrombine coïncide avec le clivage du FV par la thrombine pour générer la chaîne légère [401]. La PCa n'agit qu'à partir de la phase de propagation lorsque le FVa est formé par les premières traces de thrombine. La régulation, par la PCa de la génération de thrombine initiée par le FT dépend de la rapidité et de la quantité d'inactivation du FVa par la PCa. Nos données concernant l'augmentation de la thrombine générée, en présence d'ALB6 et de PCa, suggèrent que l'activation plaquettaire induit une résistance à la PCa sur la génération de thrombine en accélérant plus fortement l'activation du FV que l'inactivation du FVa.

Notre étude a été réalisée en thrombinographie avec deux spécimens plasmatiques : le PRP et le PPP en présence de MVP comme surfaces phospholipidiques. Le PRP a été utilisé car il est le spécimen le plus physiologique possible pour une étude en thrombinographie puisqu'il permet de prendre en compte l'activation plaquettaire. Le PPP/MVP lui a été utilisé car il contient des surfaces phospholipidiques d'origine cellulaire. Nos résultats montrent que les réactions pro- et anticoagulantes au niveau des surfaces membranaires peuvent être inhibées par l'AcMm 28F4 en présence de plasma dépourvu de plaquettes (PPP/MVP). L'activation plaquettaire ne peut pas être impliquée dans l'effet médié par les anticorps en PPP/MVP pour les raisons qui suivent : (1) les résidus plaquettaires sont quasiment tous éliminés lors de l'étape de centrifugation à 13000 g et (2) les MVP ajoutées comme surface phospholipidique sont le produit final de l'activation plaquettaire.

La génération de thrombine est dépendante de la présence et de la nature des phospholipides anioniques apportées dans le système [7]. En PRP, les plaquettes apportent les phospholipides procoagulants. Au contraire, en PPP les phospholipides procoagulants sont apportés directement au début de la réaction par ajout de surfaces phospholipidiques. Ces phospholipides déterminent l'ensemble des réactions pro- et anticoagulantes donc la génération de thrombine. Néanmoins en absence de phospholipides ajoutés dans le système, la génération de thrombine est dépendante des phospholipides présents dans le plasma. Cette quantité de phospholipides dans le plasma est variable selon la méthode de préparation du PPP. La présence de ces phospholipides pourrait interférer avec la génération de thrombine. Chantarangkul *et al* [402] ont ainsi montré que la présence de résidus plaquettaires dans le

PPP influençait les valeurs d'ETP. Pour cette raison, nous avons étudié plusieurs protocoles de préparation du PPP mais contenant tous une étape de centrifugation à 13000 g. Dans le cadre de nos expériences réalisées en thrombinographie en présence de plasma où nous nous sommes affranchis de l'activation plaquettaire, nous avons utilisé du PPP préparé selon une méthode tendant à conserver le moins de phospholipides procoagulants possibles. Cette quantité, de l'ordre de 0,06 μ M d'équivalents phosphatidylsérine, est très insuffisante pour la génération de thrombine.

La nature des surfaces cellulaires apportées dans le système [7] influe également sur la génération de thrombine. Plusieurs spécimens plasmatiques peuvent être étudiés en thrombinographie, le PRP, le PRP ayant subi un cycle de congélation à -80°C et le PPP en présence de surfaces phospholipidiques. L'utilisation de PRP et de PRP ayant subi un cycle de congélation à -80°C permet d'apporter des surfaces plaquettaires. Nous avons vérifié par microscopie électronique que la préparation du PRP n'induisait pas de modifications morphologiques majeures des plaquettes. Au contraire en PRP ayant subi un cycle de congélation à -80°C , des modifications irréversibles des plaquettes dont l'exposition des phospholipides anioniques sont induites. Des études en microscopie électronique ont permis de montrer que les plaquettes étaient encore sous forme de cellules et non de débris plaquettaires. Contrairement au PRP, en PRP ayant subi un cycle de congélation à -80°C , les phospholipides procoagulants sont présents dès le début de la réaction. Cela se traduit sur le thrombinogramme par un raccourcissement de la phase d'initiation de génération de thrombine ainsi que par une augmentation de la concentration maximale en thrombine et de l'ETP [7]. Néanmoins, il est à noter que ce spécimen apporte des phospholipides propres à chaque donneur ce qui permet de prendre en compte la variabilité inter-individuelle des surfaces cellulaires plaquettaires. Il permet de réaliser des études multicentriques avec une analyse centralisée. Sur 40 patients aPL étudiés au laboratoire, les résultats obtenus en PRP et en PRP ayant subi un cycle de congélation, sont les mêmes. Il a ainsi été montré chez des donneurs sains ainsi que chez des patients une variation de la capacité des plaquettes à exposer les phospholipides pro-coagulants [82, 403]. L'utilisation de PPP 13000 g nécessite l'apport de phospholipides anioniques dans le système pour étudier la génération de thrombine. Des VP ou des MVP peuvent être ajoutées comme support à la génération de thrombine. Une comparaison de l'effet procoagulant entre les plaquettes et les MVP a montré que les plaquettes activées et les MVP sont capables de supporter les réactions de la coagulation de façon similaire [404]. Les VP, bien que ce soit des surfaces synthétiques,

présentent l'avantage de pouvoir modifier le rapport molaire en phosphatidylcholine, phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine utilisé. Nos expériences réalisées en présence de préparations de VP variant par leur composition en phosphatidylcholine, phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine ont montré une augmentation de la génération de thrombine (ETP_0) avec l'augmentation de la concentration en phosphatidylsérine. Ces données sont en accord avec celles de la littérature qui montre une influence de la phosphatidylsérine sur la génération de thrombine [19, 82, 405, 406]. Nos résultats ont montré que comparée aux MVP, la conversion de prothrombine en thrombine n'est pas statistiquement différente de celles observées pour des VP composées de phosphatidylcholine/phosphatidylsérine/phosphatidyléthanolamine dans un rapport 60/20/20 et 60/30/20 mole%. Ces données sont en accord avec la composition supposée optimale qui a été définie pour les VP pour une étude en thrombinographie à savoir des VP composées de phosphatidylcholine/phosphatidylsérine/phosphatidyléthanolamine dans un rapport 60/20/20 mole% [6] et utilisée à la concentration finale de 4 μ M [6, 330, 407]. Néanmoins, en présence d'une faible concentration en facteur tissulaire et comparées à ces VP, l'addition de MVP en thrombinographie montre une génération de thrombine plus importante. Cette différence entre les MVP et les surfaces synthétiques peut s'expliquer par la différence de composition des surfaces. La présence de protéines membranaires liant les facteurs de coagulation au niveau des MVP peuvent favoriser la génération de thrombine. Cette différence sur la génération de thrombine peut également être expliquée par la capacité des MVP à permettre l'activation du FXI par la thrombine [408]. Cette activation induit une boucle de rétroaction positive pour la génération de thrombine et n'a pas lieu en présence de surfaces phospholipidiques synthétiques [408].

La nature et la quantité des surfaces phospholipidiques influencent également le système de la PCa [100, 314]. Nous avons montré que la composition en phospholipides influence le fonctionnement de la PCa [7]. Une moindre sensibilité à la PCa est observée avec le PRP et le PRP ayant subi un cycle de congélation à -80°C comparé au PPP. Ces résultats sont en accord avec l'effet inhibiteur des plaquettes sur le système de la PCa [399, 409]. En PRP, des molécules jouant un rôle inhibiteur sont sécrétées au moment de l'activation des plaquettes. Il est très vraisemblable qu'elles sont libérées à proximité des surfaces membranaires et peuvent agir plus rapidement. En PRP ayant subi un cycle de congélation à -80°C , les molécules inhibitrices sont libérées lors du cycle de congélation et sont donc diluées dans le plasma. Ces molécules sont alors moins efficaces pour neutraliser la PCa. En présence de PPP 13000 g,

ces inhibiteurs de la PCa contenus dans les plaquettes sont éliminés lors de la préparation et ne peuvent interférer avec la PCa. L'inclusion d'une étape d'activation des plaquettes lors de la préparation du PPP 13000 g, par un ionophore calcique par exemple, permet de conserver ces molécules. Néanmoins cette préparation présente l'inconvénient d'induire une quantité de phospholipides anioniques supérieure aux autres méthodes de préparation du PPP 13000 g. Cette augmentation est due à l'étape d'activation des plaquettes qui génèrent des résidus plaquettaires de façon plus importante que dans les autres méthodes. Nous avons montré que l'utilisation de MVP comme surface phospholipidique dans le PPP permettait d'étudier la sensibilité à la PCa et d'obtenir un profil proche de celui observé avec du PRP ayant subi un cycle de congélation à -80°C . Au contraire, le suivi de la sensibilité à la PCa en présence de VP quelle que soit leur composition en phosphatidylcholine/phosphatidylsérine /phosphatidyléthanolamine semble peu informatif et pertinent. Une inhibition quasi totale de la génération de thrombine est observée dès les plus faibles concentrations en PCa étudiées [7]. En ajoutant des MVP, nous nous sommes donc placés dans un système qui nous paraît le plus approprié pour l'étude de la sensibilité à la PCa en PPP 13000 g. L'utilisation de VP ou de MVP ne permet en aucun cas de tenir compte de la variabilité inter-individu. Néanmoins, contrairement à l'ajout de VP qui sont des surfaces synthétiques l'addition de MVP permet d'être en présence d'une surface membranaire donc de se rapprocher des conditions physiologiques.

Paradoxalement, les aPL prolongent les temps de coagulation *in vitro* alors qu'ils prédisposent à la thrombose *in vivo*. Nous avons recherché si cet effet anticoagulant existe vraiment avec l'AcMm 28F4 et peut être modulé de manière à déterminer son influence sur le phénotype observé. Les plaquettes présentes dans le PRP peuvent être activées par les complexes aPL/antigène conduisant à une augmentation de l'ETP₀ par une disponibilité plus rapide des phospholipides procoagulants comme cela a été démontré avec ALB6. L'inhibition de 84 % de l'ETP₀ observée en présence de PPP/MVP est beaucoup plus forte que celle obtenue en présence de PRP (23 %). Cela nous conduit à suggérer que l'activation plaquettaire pourrait partiellement diminuer l'inhibition des réactions procoagulantes induite par les anticorps à la surface des plaquettes. Dans le but de valider cette hypothèse, nous avons vérifié que des inhibiteurs de l'activation plaquettaire étaient capables d'inhiber l'effet activateur plaquettaire de l'AcMm 28F4. Cette inhibition se traduit par une diminution de l'ETP₀ jusqu'à la valeur observée en PPP/MVP. Nous avons choisi des inhibiteurs plaquettaires variant par leur mode

d'action de manière à déterminer le mécanisme impliqué. Nous avons obtenu une diminution de l'ETP₀ avec Milrinone en absence et présence de l'AcMm 28F4. Ces résultats ne nous permettent pas de conclure que l'effet observé lors de l'ajout de 28F4 est dû uniquement à l'inhibition des propriétés activatrice de l'AcMm ou bien à un effet direct de l'inhibiteur sur la génération de thrombine. Pour cette raison nous avons étudié le dipyridamole qui n'induit pas de diminution de l'ETP₀ en absence de l'AcMm 28F4. Les résultats obtenus, en présence de l'AcMm 28F4, ont montré une diminution similaire de l'ETP₀ en présence de PPP/MVP et de PRP préincubé avec le dipyridamole. Une diminution de l'effet de l'AcMm 28F4 sur l'activation plaquettaire en présence d'abciximab suggère l'implication de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ connue pour lier le FII [396]. Un rôle du récepteur Fc γ RIIa ne semble pas impliqué puisqu'une absence de modification de l'ETP₀ a été observée lors de l'incubation de l'AcMm en présence de IV-3. La similitude des résultats obtenus pour des donneurs Arg131His et His131His conforte cette conclusion. Ces données sont en accord avec une action prothrombotique indépendante du Fc γ RIIa rapportée pour des complexes anti- $\beta_2\text{GPI}/\beta_2\text{GPI}$ par Jankowski *et al* [347] et permettent de lever l'interrogation sur l'implication du récepteur Fc γ RIIa (**Figure 77**).

Dans les deux spécimens plasmatiques étudiés, le facteur de réduction de l'ETP₀ est faible comparé à l'augmentation de l'IC₅₀-PCa. L'activité anticoagulante de la PCa est donc plus puissamment inhibée que l'activation de la thrombine. L'ajout de thrombomoduline plutôt que de PCa en thrombinographie permet de mieux évaluer la balance *in vivo* entre les effets pro- et anticoagulants des aPL puisqu'elle permet d'étudier la participation complète du système de la PCa. La comparaison de l'effet de l'influence de la PCa et de la thrombomoduline permet de différencier un défaut de conversion de la PC en PCa, d'un défaut d'activité de la PCa. Il a été rapporté que l'utilisation de PCa et de thrombomoduline en thrombinographie permettait de détecter des phénotypes prothrombotiques avec une forte sensibilité [410, 411]. Nos données similaires sur les phénotypes hypercoagulables observées en thrombinographie, en présence de PCa et de thrombomoduline, excluent les anomalies de l'activation de la PC. Ainsi, si les anticorps agissaient au niveau de la conversion de PC en PCa, une absence de résistance aurait été observée en présence des AcMm et de thrombomoduline. L'action des anticorps a donc lieu à un autre niveau. Ces données sont en accord avec celles de Oosting *et al* [412] et Keeling *et al* [232] qui n'ont pas trouvé d'effet démontrable de l'addition d'IgG sur l'activation de la PC. Néanmoins, ces données sont en désaccord avec celles de Cariou *et al* [317] qui ont rapporté une inhibition de l'activation de

la PC par la thrombine en présence d'IgG purifiées de patients et de Toyoshima *et al* [316] qui ont également rapporté une inhibition de l'activation de la PC par les aPL. Ces résultats discordants peuvent s'expliquer par la présence d'anticorps dirigés contre la PC ou d'autres cibles du SAPL dans les IgG purifiées des patients qui induiraient une inhibition de conversion de la PC. Les aPL peuvent interférer avec le système de la PCa en inhibant l'inactivation du FVa par la PCa. Malia *et al* [312] ont montré une dégradation du FVa par la PCa et la protéine S en présence d'IgG purifiées de patients aPL de l'ordre de 14 % *versus* 52 % en présence d'IgG normales. Borrell *et al* [310] ont rapporté un effet inhibiteur de la dégradation du FVa par la PCa pour 8 sur 10 IgG et 13 sur 14 IgM de patients aPL. Ces études réalisées à partir d'IgG totales ne permettent néanmoins pas de déterminer quelle est la contribution des anticorps anti- β_2 GPI et anti-FII dans le phénomène. Des études ultérieures ont été réalisées et l'inhibition de l'inactivation du FVa catalysée par la PCa a été rapportée à la fois pour des anticorps anti- β_2 GPI et anti-FII [321, 323, 413, 414]. Field *et al* [414] ont ainsi rapporté une inhibition de l'inactivation du FVa par la PCa en présence de fractions d'IgG de malades contenant des anticorps anti-FII. De même, Galli *et al* [323] ont décrit une inhibition de l'inactivation du FVa par la PCa pour des IgG LA contenant des anticorps anti-FII. Dans une étude ultérieure, ils ont rapporté un effet inhibiteur d'anticorps dirigés contre la β_2 GPI [413]. D'autres études ont décrit une inhibition de l'inactivation du FVa par la PCa en présence d'anticorps anti- β_2 GPI (anticorps polyclonal de lapin [321] et anticorps monoclonal murin [415]) mais seulement en présence de β_2 GPI. L'inactivation du FVa est fortement augmentée en présence de surfaces phospholipidiques anioniques. La phosphatidylsérine est considérée comme essentiel pour la liaison du FII [416] et la phosphatidyléthanolamine comme importante pour le système de la PCa [315]. Nous avons donc étudié l'inactivation du FVa par la PCa en faisant varier la composition en phospholipides anioniques. Nous avons montré une inactivation du FVa variable selon la composition en phospholipides. Nous avons trouvé qu'en présence de protéine S, l'inactivation du FVa était la plus forte en présence de VP composées de phosphatidylcholine/phosphatidylsérine dans un rapport 80/20 mole% et qu'elle était très faible en présence de VP ne contenant pas de phosphatidylsérine. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bakker *et al* [417] qui ont rapporté une accélération de l'inactivation du FVa dépendante de la composition et de la concentration en phospholipides. Ils ont montré un taux d'inactivation optimal du FVa en présence de VP composées de phosphatidylcholine/phosphatidylsérine dans un rapport 80/20 mole% à 10 μ M. Des concentrations supérieures en VP induisent une inhibition de l'inactivation du FVa par la PCa. Notre étude a été réalisée à une concentration de 50 μ M en surfaces phospholipidiques. Bien

que cette concentration ne soit pas optimale, car l'inactivation du FVa n'est plus maximale mais légèrement inhibée, elle permet néanmoins de montrer une différence d'effet entre les différentes préparations de VP ce qui nous intéressait. Nous avons également pu observer une augmentation de l'inactivation du FVa avec la quantité de phosphatidyléthanolamine. Ces données sont en accord avec ceux de Smirnov *et al* [418] qui ont démontré que l'incorporation de phosphatidyléthanolamine dans des vésicules contenant de la phosphatidylsérine augmentait l'inactivation du FVa.

Nous avons déterminé l'influence de la concentration en anticorps sur les effets observés en étudiant une gamme de concentrations en anticorps. Ces concentrations ont été choisies en fonction des valeurs décrites dans la littérature. Nos données montrent que les réactions procoagulantes et anticoagulantes dépendante de la PCa, au niveau des surfaces phospholipidiques peuvent être toutes les deux inhibées par l'AcMm 28F4 de façon concentration dépendante et qu'une concentration minimum en anticorps était nécessaire. Ainsi la dilution de l'AcMm 28F4 est accompagnée d'une disparition de l'effet anticoagulant et d'une diminution de la résistance à la PCa. Ainsi, malgré le fait que les effets soient concentration dépendants, une influence de l'AcMm sur la PCa est conservée pour des concentrations variant d'un facteur cent. L'interférence des complexes anticorps/antigène avec les réactions anticoagulantes est plus forte qu'avec les réactions procoagulantes. L'implication des aPL dans la résistance à la PCa a été antérieurement démontrée dans des systèmes reconstitués en utilisant des IgG purifiées ou du plasma de patients aPL. Cependant l'occupation des surfaces phospholipidiques par les complexes anticorps/antigène peut également gêner l'assemblage des complexes procoagulants. Les complexes des aPL avec leur cible inhibent les complexes ténase et/ou prothrombinase de façon phospholipide dépendante [298]. Il a également été décrit en utilisant un test chromogénique que la génération de thrombine était inhibée par les complexes anticorps/antigène [231, 398]. Cependant la diminution de la concentration en anticorps conduit à une perte de l'effet anticoagulant alors que l'effet procoagulant est conservé. Cela suggère que l'effet prépondérant des anticorps est une interférence avec les réactions anticoagulantes plutôt que procoagulantes. Ces données sont confortées par le fait que nous avons montré que l'anticorps 7F6G gênait l'inhibition de la génération de thrombine par la PCa (augmentation de l'IC₅₀-PCa) sans affecter l'ETP₀. De même, cliniquement tous les aPL non pas un effet anticoagulant alors qu'ils induisent tous à des degrés différents une inhibition de la PCa.

Une implication des constantes cinétiques pourrait expliquer le phénotype observé. Des valeurs d'avidité chevauchantes ont été rapportées pour les complexes aPL/antigène et le FII seul et cela est en faveur d'une diminution de la génération de thrombine par compétition entre les différentes molécules pour les surfaces phospholipidiques. Ainsi, des valeurs de K_D comprises entre 600 et 2300 nM pour le FII seul [238, 295, 419] et des valeurs de l'ordre de 10^{-6} M pour les auto-anticorps ont été décrites [256, 258]. Nous avons donc déterminé par SPR, les constantes cinétiques de liaison du FII et de la PCa sur les différentes surfaces phospholipidiques (VP et MVP). Nos données sont en accord avec celles rapportées, des valeurs de K_D comprises entre 350 et 3180 nM ont été obtenues pour la liaison du FII en fonction de la composition en surface phospholipidique. L'avidité de la prothrombine augmente avec la quantité de phosphatidylsérine et est la plus forte en présence de VP composées de phosphatidylcholine, phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine dans un rapport de 60/20/20 mole%. Lorsque le complexe prothrombinase est assemblé, sa forte avidité pour les phospholipides anioniques (de l'ordre de 10^{-10} M ; [238]) peut déplacer les complexes aPL/antigène fixés. Cela résulte en un encombrement stérique réduit par les complexes aPL/antigène et conduit à l'activation du FII en thrombine. De manière générale, ce mécanisme est en faveur de l'effet anticoagulant des aPL.

Au contraire, la faible avidité de la PC pour les surfaces phospholipidiques prévient sa liaison en présence des complexes aPL/antigène et conduit à une résistance à la PCa. Tait *et al* [238] ont rapporté que l'avidité de la PC pour les phospholipides anioniques est plus faible que celle des facteurs procoagulants (FIX, FV/Va, FX/Xa). Une avidité de la PC pour les phospholipides 100 à 1000 fois plus faible que celle des autres protéines vitamine K dépendante a été décrite [420]. Nos données obtenues par SPR sur la liaison de la PC à différentes surfaces cellulaires ont montré des avidités de 8 à 90 nM en fonction des surfaces phospholipidiques.

Ces différences d'avidité entre les différents acteurs impliqués se traduisent par une compétition pour les phospholipides anioniques en faveur des complexes procoagulants par rapport aux complexes anticorps/antigène et en faveur des complexes anticorps/antigène par rapport aux complexes anticoagulants. La résultante est en faveur d'une inhibition sélective de la voie de la PC qui se traduit par un défaut d'inhibition de la génération de la thrombine en faveur d'un état prothrombotique.

La capacité de liaison des complexes anticorps/antigène au niveau des surfaces phospholipidiques, qui est une mesure indirecte de l'avidité, pourraient expliquer l'effet

hétérogène observé entre les AcMm. Par des expériences réalisées en SPR, nous avons observé une forte liaison des complexes 28F4/FII sur des plaquettes lavées par comparaison aux complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI à la même concentration. Les complexes anti-FII/FII se lie environ trois fois plus que les complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI ce qui est en faveur d'une compétition plus forte de ces complexes avec les réactions de coagulation au niveau des surfaces.

En accord avec les résultats SPR, les données obtenues avec les AcMm montrent que les valeurs d'ETP₀ et d'IC₅₀-APC sont différemment affectées par les 2 AcMm pouvant suggérer des mécanismes d'action différents. Une proposition de ces mécanismes est illustrée sur la **Figure 78**.

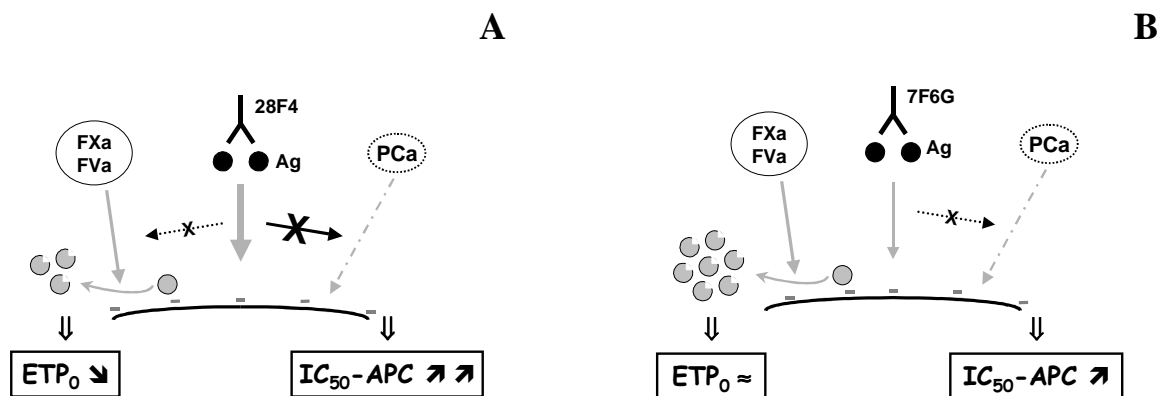


Figure 78 : Proposition de mécanisme par lequel les deux AcMm interfèrent avec l'activité de la thrombine générée.

L'épaisseur des flèches noires rend compte de l'intensité du phénomène induit par les complexes anticorps/antigène sur les complexes pro- et anticoagulants. L'épaisseur des flèches grises rend compte de l'avidité des différents complexes pour les phospholipides.

(A) L'avidité des complexes 28F4/FII pour les surfaces physiologiques est du même ordre de grandeur que celle de la prothrombine seule mais plus faible que celle du complexe prothrombinase et plus forte que celle du système de la PCa. En conséquence, ces complexes entrent en compétition avec la prothrombine pour les sites de liaison aux phospholipides ce qui se traduit par un effet anticoagulant. Cependant même si la génération de thrombine est partiellement inhibée, elle finit par avoir lieu lors de la formation du complexe prothrombinase. Cela se traduit en thrombinographie par une diminution de l'ETP₀. Au contraire, les complexes entrent fortement en compétition avec le système de la PCa induisant

une résistance à la PCa. Cela se traduit en thrombinographie par une augmentation de l'IC₅₀-PCa.

(B) L'avidité des complexes 7F6G/ β_2 GPI pour les surfaces physiologiques est plus faible que celle de la prothrombine et donc du complexe prothrombinase mais plus forte que la PCa. En conséquence, ces complexes n'entrent pas en compétition avec la génération de thrombine et n'induisent donc pas d'effet anticoagulant. Au contraire, ils entrent en compétition avec le système de la PCa. Cela se traduit en thrombinographie par une augmentation de l'IC₅₀-PCa sans modification de l'ETP₀.

Un autre mécanisme d'action des complexes 7F6G/ β_2 GPI est basé sur une spécificité phospholipidique similaire à celle du système de la PCa mais différente de celle nécessaire aux réactions anticoagulantes. Le système anticoagulant de la PCa est inhibé sélectivement et la génération de thrombine est non affectée. Cela se traduit en thrombinographie par une augmentation de l'IC₅₀-PCa et une absence de modification de l'ETP₀. Ce mécanisme est en accord avec les résultats de Smirnov *et al* [311] qui ont conclu que les surfaces cellulaires nécessaires au système anticoagulant de la PC étaient similaires à ceux des anticorps LA mais différents de ceux nécessaires pour les complexes procoagulants. Il a été démontré par Safa *et al* [315] que les anticorps anti- β_2 GPI pouvaient bloquer spécifiquement l'augmentation de l'activité de la PCa dépendante des phospholipides oxydés. Cela serait en accord avec l'association entre les anticorps anti-phosphatidyléthanolamine et la thrombose rapportée par Sanmarco *et al* [421]. Cependant, un mécanisme basé uniquement sur une spécificité similaire de phosphatidyléthanolamine pour la PCa et pour les complexes aPL/antigène est peu probable, puisque dans notre étude, la résistance à la PCa n'est pas restreinte aux anticorps anti- β_2 GPI et que le FII est connu pour interagir avec la phosphatidylsérine [82]. De plus, l'étude des spécificités phospholipidiques pour la conversion du FII en thrombine ainsi que pour l'inactivation du FVa par la PCa ne sont pas en faveur d'une reconnaissance similaire entre les anticorps et le système de la PCa. Ainsi la présence de phosphatidylsérine est importante dans les deux réactions. Les résultats obtenus nous amènent donc à conclure à un rôle des avidités relatives des différents complexes en jeu. A une forte concentration en AcMm 28F4, l'occupation des surfaces phospholipidiques par les complexes 28F4/FII est suffisamment importante pour entrer en compétition avec à la fois les réactions pro- et anticoagulantes tandis qu'à des concentrations 100 fois plus faibles, seule la liaison de la PCa est diminuée comme observé avec les complexes anti- β_2 GPI/ β_2 GPI. Nos résultats sur le double effet de 28F4 seraient en faveur d'un mécanisme de compétition avec les réactions de

coagulation par masquage de la surface des membranes plaquettaires plutôt qu'en faveur de la perturbation de la formation de ces complexes pro- et anticoagulants.

Pour généraliser ces données, une influence de la cible, de sa conformation/orientation et/ou des cinétiques d'interaction anticorps/antigène doit être étudiée de manière à pouvoir déduire si les différences observées sont dépendantes plutôt d'un paramètre ou d'un autre. De plus, les contributions différentes de plusieurs ensembles d'anticorps présents chez les patients nécessitent des clarifications pour établir les liens entre les mécanismes impliqués et la spécificité antigénique ou les interactions cinétiques.

Dans ce but, l'influence de la cible a été prise en compte par l'utilisation d'AcMm dirigés contre les cibles principales des aPL. La région épitopique reconnue par les anticorps peut être également un paramètre expliquant l'effet hétérogène observé entre les anticorps dirigés contre la même cible. Ainsi, les anticorps anti- β_2 GPI dirigés contre le domaine I de la β_2 GPI, et plus principalement au niveau de la région épitopique Gly40-Arg43, sont rapportés comme les plus fortement associés à la thrombose [266, 269, 272]. En utilisant la SPR, nous avons donc affiné la détermination de la spécificité épitopique de nos AcMm anti- β_2 GPI dirigés contre le domaine I. Nous avons ainsi pu identifier six régions épitopiques dont deux chevauchantes sur ce domaine. De plus, nous avons déterminé également par SPR les caractéristiques cinétiques de liaison des AcMm à leur antigène. Nous avons ainsi trouvé des valeurs de constantes cinétiques variant d'un facteur 10 tant pour les constantes d'avidité que pour les constantes d'association et de dissociation entre les douze anticorps dirigés contre la même protéine, la β_2 GPI. Nous avons observé pour deux AcMm (3G11F et 3G11C) reconnaissant la même région épitopique des valeurs de K_D variant d'un facteur 10. Ces données montrent ainsi la grande diversité entre les anticorps. Un rôle prépondérant d'un des paramètres ne peut pas être mis en évidence en thrombinographie avec cette série d'anticorps. Néanmoins, les constantes cinétiques d'interaction anticorps/antigène ainsi que les régions épitopiques reconnues par les anticorps semblent influencer de manière complexe et intriquée le caractère hypercoagulable induit par les anticorps.

7 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, plusieurs mécanismes intimement liés contribuant à l'hypercoagulabilité détectée par thrombinographie dans le cadre des aPL ont été identifiés. Les complexes aPL/antigène interfèrent au niveau des surfaces plaquettaires avec les réactions pro- et anticoagulantes. L'inhibition des réactions anticoagulantes est prépondérante sur l'inhibition des réactions procoagulantes. De plus, les aPL sont également capables d'induire l'étape ultime de l'activation plaquettaire à savoir l'exposition des phospholipides anioniques. Cet effet activateur plaquettaire des complexes aPL/antigène vient moduler le phénotype. Enfin, ces mécanismes interagissent et résultent globalement en une hypercoagulabilité.

L'identification des mécanismes contribuant à l'hypercoagulabilité associée aux aPL a été initiée avec des anticorps monoclonaux murins. La suite de cette étude consiste à vérifier que les auto-anticorps humains induisent le même phénotype que les anticorps monoclonaux murins. Même si la pertinence clinique de l'utilisation des anticorps monoclonaux murins a été validée à chaque étape de l'étude, il existe néanmoins des différences entre les anticorps monoclonaux murins et les auto-anticorps qui peuvent jouer un rôle. Tout d'abord la spécificité d'espèce est différente (murins vs humains). De plus, les auto-anticorps sont polyclonaux alors que les anticorps murins sont monoclonaux. Il existe également une différence au niveau des valeurs d'avidités qui sont plus élevées pour les anticorps monoclonaux murins que pour les auto-anticorps.

Les auto-anticorps humains présentent des spécificités hétérogènes. La coexistence chez les patients de plusieurs sous-groupes d'anticorps soulève la question du caractère pathogène de chacun de ces sous-groupes. L'effet hypercoagulable observé peut ainsi être attribué à un type particulier d'anticorps ou bien à plusieurs sous-groupes ; chacun pouvant agir par un mécanisme différent (activation plaquettaire et/ou résistance à la PCa). L'intérêt serait donc de pouvoir identifier chez les patients un ou plusieurs sous-groupe(s) d'anticorps responsable(s) de l'effet hypercoagulable. Il faudrait également vérifier que les mêmes sous-groupes ont la même pathogénéicité chez différents patients.

Actuellement, la présence d'aPL de types LA, aCL ou encore anti- β_2 GPI chez les patients ne permet pas de conclure à un risque donné. Une étude de l'effet de ces auto-anticorps en thrombinographie permettrait une meilleure classification de ce risque. Pour cela, les auto-anticorps pourront être purifiés pour être ajoutés à du plasma normal en thrombinographie

pour démontrer que les aPL induisent un phénotype hypercoagulable. En parallèle, nous vérifierons que les plasmas déplétés ont perdu leur caractère hypercoagulable en thrombinographie. Pour cela, il convient de séparer les anticorps à partir de plasmas de patients aPL. Une possibilité serait de se baser sur l'influence de la nature phospholipidique pour la formation des complexes anticorps/antigène de manière à adsorber les auto-anticorps sur des surfaces appropriées dans des conditions permettant une association forte pour dépléter les plasmas et une dissociation relativement élevée pour récupérer les anticorps purifiés. Une autre possibilité serait de se baser sur la spécificité épitopique des anticorps de manière à récupérer les auto-anticorps en fonction de la région reconnue par immobilisation de certains domaines de la protéine ou bien encore en utilisant une protéine mutée.

Ces différents travaux sur les mécanismes impliqués dans l'hypercoagulabilité associée aux aPL permettraient d'envisager des stratégies antithrombotiques sélectives et/ou adaptées à chaque individu.

1) Traitements antithrombotiques ciblés

Actuellement le traitement du SAPL se fonde sur l'utilisation étendue des anticoagulants. La thérapie au long cours de warfarine est la prophylaxie la plus efficace pour les thromboses veineuses induites par les anticorps. En dépit de son efficacité, des approches plus sûres sont nécessaires puisque le traitement à haute intensité et prolongé de warfarine comporte des risques significatifs pour de multiples effets secondaires.

La prophylaxie secondaire des thromboses artérielles fait appel à la warfarine seule ou à l'association warfarine + antiplaquettaires, une meilleure connaissance du profil de risque d'un patient individuel pourrait permettre un traitement ajusté à ce risque.

Le futur passe par des médicaments antithrombotiques avec un meilleur profil bénéfice/risque ou une meilleure utilisation des médicaments (clinique d'anticoagulants). La prophylaxie primaire des événements veineux et artériels a fait l'objet de très peu d'essais thérapeutiques. L'essai de prophylaxie primaire des événements thrombotiques par aspirine 80 mg par jour n'a pas montré de supériorité par rapport au placebo [422]. De plus, il est en général admis que les outils actuels connaissent des limites pour caractériser, titrer et surveiller un traitement anticoagulant. Un suivi par thrombinographie du traitement anticoagulant permettrait ainsi une meilleure prise en charge des malades par la détermination d'un phénotype propre à chaque patient. De même l'étude par thrombinographie permettrait également de déterminer

les mécanismes d'action impliqués. Ainsi, la mise en évidence d'une activation plaquettaire et/ou d'une résistance à la PCa permettrait d'adapter les traitements en fonction des patients.

2) Immunomodulation/immunosuppression

Dans le cadre de situations aiguës du type syndrome catastrophique des anti-phospholipides (CAPS), d'autres voies thérapeutiques que les anticoagulants sont utilisées. Les immunosuppresseurs (methylprednisolone® et prednisone® par exemple) ou l'injection intraveineuse d'IgG polyvalentes peuvent être mis en place [423]. Cependant, l'effet de ces thérapeutiques est transitoire et les anticorps réapparaissent en une à trois semaines après l'arrêt du traitement. Le rituximab® qui induit une déplétion lymphocytaire B peut également être utilisé dans le cas de CAPS [423]. C'est un anticorps monoclonal chimérique spécifique pour le CD20 humain (marqueur spécifique des lymphocytes B) dont le fragment Fc a été sélectionné pour sa capacité à fixer le complément. L'effet de ces traitements sur le profil thrombinographique reste à établir.

3) Immunoépuration des anticorps pathogènes

Dans le cas de CAPS, des plasmaphèreses peuvent également être mises en place comme moyen thérapeutique [423]. La plasmaphérèse consiste à remplacer le plasma du patient par une solution permettant de maintenir une pression oncotique équivalente (par exemple avec du plasma frais congelé). Le but du traitement est d'épurer le plasma contenant les auto-anticorps ou les complexes anticorps/antigènes. Néanmoins, cet échange plasmatique présente l'inconvénient d'éliminer la totalité des constituants du plasma.

Une autre possibilité serait d'envisager une déplétion des anticorps pathogènes par un mécanisme d'immunoépuration sélective en utilisant le procédé galénique d'encapsulation. Contrairement à la plasmaphérèse, cette technique permettrait de n'enlever du plasma que les anticorps pathogènes. Le mécanisme consisterait à éliminer ces anticorps par mise en contact du plasma du patient en circulation extracorporelle avec des microparticules poreuses. Pour cela, les antigènes liés au niveau de vésicules phospholipidiques seraient encapsulés. Les antigènes seraient associés au niveau de surfaces phospholipidiques en fonction de leur spécificité phospholipidique de façon à permettre la meilleure liaison possible. Ces hypothèses se fondent sur la description d'une encapsulation de stromas de globules rouges humains dans des microparticules poreuses [424]. Néanmoins, il est à noter que ce système n'est pas neutre pour les réactions de coagulation. La faisabilité et l'innocuité de cette technique sont à étudier.

4) Induction d'une tolérance immunologique

A partir de la spécificité des anticorps, une autre possibilité serait d'inhiber la génération de ces anticorps en rendant les cellules tolérantes aux antigènes reconnus par les anticorps pathogènes. Des études dans ce sens ont été réalisées avec la β_2 GPI par Cockerill *et al* [425]. Des bioconjugués contenant le domaine I de la protéine ont été construits (LJP 1082) pour étudier la possibilité de développement de cellules B tolérantes. Des résultats préliminaires d'une étude clinique en phase I/II avec LJP 1082 indiquent que le bioconjugué a été bien toléré et peut justifier son développement ultérieur dans le but de réduire les événements thrombotiques chez les patients [426]. Néanmoins si cette approche pour la β_2 GPI semble pertinente elle semble néanmoins insuffisante comme seule thérapie car les résultats montrent une diminution des anticorps mais pas leur disparition totale [425]. Il serait intéressant d'optimiser cette technique en utilisant comme antigène dans le bioconjugué des régions épitopiques spécifiques sur le domaine I. De même, l'étude de bioconjugués contenant de la prothrombine ou bien encore un fragment de la prothrombine pourrait être étudié.

8 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Arnout J, Vermeylen J. Current status and implications of autoimmune antiphospholipid antibodies in relation to thrombotic disease. *J Thromb Haemost*, 2003, 1, 931-42.
2. Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krilis SA. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood*, 2007, 109, 422-30.
3. Roubey RA. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis rheum*, 1996, 39, 1444-54.
4. Arnout J, Vermeylen J. Current status and implications of autoimmune antiphospholipid antibodies in relation to thrombotic disease. *J Thromb Haemost*, 2003, 1, 931-942.
5. Simmelink MJA, Derksen RHWM, Arnout J, De Groot PG. β 2-glycoprotein I- and prothrombin-dependent lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost*, 2003, 1, 740-747.
6. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Beguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003, 33, 4-15.
7. Membre A, Wahl D, Lecompte T, Regnault V. Test de génération de thrombine La thrombinographie: Méthodologie. *Revue francophone des laboratoires*, 2007, 393, 37-43.
8. Regnault V, Beguin S, Wahl D, de Maistre E, Coenraad Hemker H, Lecompte T. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost*, 2003, 89, 208-12.
9. Lecompte T, Wahl D, Perret-Guillaume C, Hemker HC, Lacolley P, Regnault V. Hypercoagulability resulting from opposite effects of lupus anticoagulants is associated strongly with thrombotic risk. *Haematologica*, 2007, 92, 714-715.
10. Boneu B, Cazenave JP. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. 2^e ed. Reims: Boehringer Ingelheim France; 1997.
11. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 736, 57-66.
12. Perret B, Chap HJ, Douste-Blazy L. Asymmetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane of human platelets. A determination using purified phospholipases and a rapid method for membrane isolation. *Biochim Biophys Acta*, 1979, 556, 434-46.
13. Skeaff CM, Holub BJ. Altered phospholipid composition of plasma membranes from thrombin-stimulated human platelets. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 834, 164-71.
14. Marcus AJ, Ullman HL, Safier LB. Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *J Lipid Res*, 1969, 10, 108-14.
15. Smeets EF, Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RF. Contribution of different phospholipid classes to the prothrombin converting capacity of sonicated lipid vesicles. *Thromb Res*, 1996, 81, 419-26.

16. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*, 2002, 88, 186-93.
17. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1439, 317-30.
18. Solum NO. Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19, 2841-6.
19. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure. *Blood Rev*, 1991, 5, 146-54.
20. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev*, 1993, 7, 52-62.
21. Camire RM, Pollak ES, Kaushansky K, Tracy PB. Secretable human platelet-derived factor V originates from the plasma pool. *Blood*, 1998, 92, 3035-41.
22. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res*, 1999, 95, 1-18.
23. White JG. The dense bodies of human platelets: inherent electron opacity of the serotonin storage particles. *Blood*, 1969, 33, 598-606.
24. Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annu Rev Med*, 1979, 30, 119-34.
25. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res*, 2004, 114, 447-53.
26. Holmsen H. Signal transducing mechanisms in platelets. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 1991, 15, 147-52.
27. Sadler JE. von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 1991, 266, 22777-80.
28. Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell*, 1986, 46, 185-90.
29. Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor. *Faseb J*, 1993, 7, 308-16.
30. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29, 91-105.
31. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35, 1170-4.
32. Blockmans D, Deckmyn H, Vermynen J. Platelet activation. *Blood Rev*, 1995, 9, 143-56.
33. Bacon-Baguley T, Ogilvie ML, Gartner TK, Walz DA. Thrombospondin binding to specific sequences within the A alpha- and B beta-chains of fibrinogen. *J Biol Chem*, 1990, 265, 2317-23.

34. Tuszynski GP, Srivastava S, Switalska HI, Holt JC, Cierniewski CS, Niewiarowski S. The interaction of human platelet thrombospondin with fibrinogen. Thrombospondin purification and specificity of interaction. *J Biol Chem*, 1985, 260, 12240-5.
35. Bonnefoy A, Hantgan R, Legrand C, Frojmovic MM. A model of platelet aggregation involving multiple interactions of thrombospondin-1, fibrinogen, and GPIIb/IIIa receptor. *J Biol Chem*, 2001, 276, 5605-12.
36. Dahlback B, Villoutreix BO. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost*, 2003, 1, 1525-34.
37. Kroll MH, Schafer AI. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood*, 1989, 74, 1181-95.
38. Meadows TA, Bhatt DL. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res*, 2007, 100, 1261-75.
39. Born G, Patrono C. Antiplatelet drugs. *Br J Pharmacol*, 2006, 147 Suppl 1, S241-51.
40. McNicol A, Israels SJ. Platelets and anti-platelet therapy. *J Pharmacol Sci*, 2003, 93, 381-96.
41. Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet*, 1999, 353, 227-31.
42. Anderson CL. Human IgG Fc receptors. *Clin Immunol Immunopathol*, 1989, 53, S63-71.
43. Anderson CL, Abraham GN. Characterization of the Fc receptor for IgG on a human macrophage cell line, U937. *J Immunol*, 1980, 125, 2735-41.
44. Fries LF, Hall RP, Lawley TJ, Crabtree GR, Frank MM. Monocyte receptors for the Fc portion of IgG studies with monomeric human IgG1: normal in vitro expression of Fc gamma receptors in HLA-B8/Drw3 subjects with defective Fc gamma-mediated in vivo clearance. *J Immunol*, 1982, 129, 1041-9.
45. Kurlander RJ, Batker J. The binding of human immunoglobulin G1 monomer and small, covalently cross-linked polymers of immunoglobulin G1 to human peripheral blood monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest*, 1982, 69, 1-8.
46. Jones DH, Looney RJ, Anderson CL. Two distinct classes of IgG Fc receptors on a human monocyte line (U937) defined by differences in binding of murine IgG subclasses at low ionic strength. *J Immunol*, 1985, 135, 3348-53.
47. Looney RJ, Abraham GN, Anderson CL. Human monocytes and U937 cells bear two distinct Fc receptors for IgG. *J Immunol*, 1986, 136, 1641-7.
48. Vaughn M, Taylor M, Mohanakumar T. Characterization of human IgG Fc receptors. *J Immunol*, 1985, 135, 4059-65.
49. Cassel DL, Keller MA, Surrey S, Schwartz E, Schreiber AD, Rappaport EF, McKenzie SE. Differential expression of Fc gamma RIIA, Fc gamma RIIB and Fc gamma RIIC in hematopoietic cells: analysis of transcripts. *Mol Immunol*, 1993, 30, 451-60.

50. Bachelot C, Saffroy R, Gandrille S, Aiach M, Rendu F. Role of Fc gamma RIIA gene polymorphism in human platelet activation by monoclonal antibodies. *Thromb Haemost*, 1995, 74, 1557-63.
51. Brandt JT, Isenhardt CE, Osborne JM, Ahmed A, Anderson CL. On the role of platelet Fc gamma RIIa phenotype in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost*, 1995, 74, 1564-72.
52. Denomme GA, Warkentin TE, Horsewood P, Sheppard JA, Warner MN, Kelton JG. Activation of platelets by sera containing IgG1 heparin-dependent antibodies: an explanation for the predominance of the Fc gamma RIIa "low responder" (his131) gene in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Lab Clin Med*, 1997, 130, 278-84.
53. Horsewood P, Hayward CP, Warkentin TE, Kelton JG. Investigation of the mechanisms of monoclonal antibody-induced platelet activation. *Blood*, 1991, 78, 1019-26.
54. Slupsky JR, Cawley JC, Griffith LS, Shaw AR, Zuzel M. Role of Fc gamma RII in platelet activation by monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1992, 148, 3189-94.
55. Rendu F, Boucheix C, Lebreton M, Bourdeau N, Benoit P, Maclouf J, Soria C, Levy-Toledano S. Mechanisms of the mAb ALB6(CD9) induced human platelet activation: comparison with thrombin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 146, 1397-404.
56. Worthington RE, Carroll RC, Boucheix C. Platelet activation by CD9 monoclonal antibodies is mediated by the Fc gamma II receptor. *Br J Haematol*, 1990, 74, 216-22.
57. Cauwenberghs N, Schlamadinger A, Vauterin S, Cooper S, Descheemaeker G, Tornai I, Deckmyn H. Fc-receptor dependent platelet aggregation induced by monoclonal antibodies against platelet glycoprotein Ib or von Willebrand factor. *Thromb Haemost*, 2001, 85, 679-85.
58. Morel MC, Lecompte T, Champeix P, Favier R, Potevin F, Samama M, Salmon C, Kaplan C. PL2-49, a monoclonal antibody against glycoprotein IIb which is a platelet activator. *Br J Haematol*, 1989, 71, 57-63.
59. Bachelot C, Rendu F, Boucheix C, Hogg N, Levy-Toledano S. Activation of platelets induced by mAb P256 specific for glycoprotein IIb-IIIa. Possible evidence for a role for IIb-IIIa in membrane signal transduction. *Eur J Biochem*, 1990, 190, 177-83.
60. Rubinstein E, Kouns WC, Jennings LK, Boucheix C, Carroll RC. Interaction of two GPIIb/IIIa monoclonal antibodies with platelet Fc receptor (Fc gamma RII). *Br J Haematol*, 1991, 78, 80-6.
61. Anderson GP, van de Winkel JG, Anderson CL. Anti-GPIIb/IIIa (CD41) monoclonal antibody-induced platelet activation requires Fc receptor-dependent cell-cell interaction. *Br J Haematol*, 1991, 79, 75-83.
62. Aiken ML, Ginsberg MH, Byers-Ward V, Plow EF. Effects of OKM5, a monoclonal antibody to glycoprotein IV, on platelet aggregation and thrombospondin surface expression. *Blood*, 1990, 76, 2501-9.
63. Boucheix C, Soria C, Mirshahi M, Soria J, Perrot JY, Fournier N, Billard M, Rosenfeld C. Characteristics of platelet aggregation induced by the monoclonal antibody ALB6 (acute

lymphoblastic leukemia antigen p 24). Inhibition of aggregation by ALB6Fab. *FEBS Lett*, 1983, 161, 289-95.

64. Amiral J, Marfaing-Koka A, Wolf M, Alessi MC, Tardy B, Boyer-Neumann C, Vissac AM, Fressinaud E, Poncz M, Meyer D. Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. *Blood*, 1996, 88, 410-6.

65. Amiral J, Wolf M, Fischer A, Boyer-Neumann C, Vissac A, Meyer D. Pathogenicity of IgA and/or IgM antibodies to heparin-PF4 complexes in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 1996, 92, 954-9.

66. Fitzgerald DJ, Catella F, Roy L, FitzGerald GA. Marked platelet activation in vivo after intravenous streptokinase in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 1988, 77, 142-50.

67. Vaughan DE, Van Houtte E, Declerck PJ, Collen D. Streptokinase-induced platelet aggregation. Prevalence and mechanism. *Circulation*, 1991, 84, 84-91.

68. Amiral J, Bridey F, Wolf M, Boyer-Neumann C, Fressinaud E, Vissac AM, Peynaud-Debayle E, Dreyfus M, Meyer D. Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin-induced thrombocytopenia: a study of 44 cases. *Thromb Haemost*, 1995, 73, 21-8.

69. Pouplard C, Amiral J, Borg JY, Vissac AM, Delahousse B, Gruel Y. Differences in specificity of heparin-dependent antibodies developed in heparin-induced thrombocytopenia and consequences on cross-reactivity with danaparoid sodium. *Br J Haematol*, 1997, 99, 273-80.

70. Regnault V, de Maistre E, Carteaux JP, Gruel Y, Nguyen P, Tardy B, Lecompte T. Platelet activation induced by human antibodies to interleukin-8. *Blood*, 2003, 101, 1419-21.

71. Regnault V, Helft G, Wahl D, Czitrom D, Vuilleminot A, Papouin G, Roda L, Danchin N, Lecompte T. Antistreptokinase platelet-activating antibodies are common and heterogeneous. *J Thromb Haemost*, 2003, 1, 1055-61.

72. Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: frequency and pathogenesis. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2006, 35, 37-45.

73. Warkentin TE, Chong BH, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: towards consensus. *Thromb Haemost*, 1998, 79, 1-7.

74. Newman PM, Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia: new evidence for the dynamic binding of purified anti-PF4-heparin antibodies to platelets and the resultant platelet activation. *Blood*, 2000, 96, 182-7.

75. Capitanio AM, Niewiarowski S, Rucinski B, Tuszynski GP, Cierniewski CS, Herschok D, Kordecki E. Interaction of platelet factor 4 with human platelets. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 839, 161-73.

76. Rybak ME, Gimbrone MA, Jr., Davies PF, Handin RI. Interaction of platelet factor four with cultured vascular endothelial cells. *Blood*, 1989, 73, 1534-9.

77. Visentin GP, Ford SE, Scott JP, Aster RH. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest*, 1994, 93, 81-8.
78. Lebrazi J, Helft G, Abdelouahed M, Elalamy I, Mirshahi M, Samama MM, Lecompte T. Human anti-streptokinase antibodies induce platelet aggregation in an Fc receptor (CD32) dependent manner. *Thromb Haemost*, 1995, 74, 938-42.
79. McRedmond JP, Harriott P, Walker B, Fitzgerald DJ. Streptokinase-induced platelet activation involves antistreptokinase antibodies and cleavage of protease-activated receptor-1. *Blood*, 2000, 95, 1301-8.
80. Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)*, 2002, 67, 3-12.
81. Bezeaud A, Guillin MC. Physiologie de la coagulation. Paris: Elsevier SAS; 2001.
82. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22, 1381-9.
83. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood*, 1993, 81, 734-44.
84. Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood*, 2005, 105, 2764-70.
85. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96, 2311-5.
86. Osterud B. The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin Hematol*, 2001, 38, 2-5.
87. Komiyama Y, Pedersen AH, Kisiel W. Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochemistry*, 1990, 29, 9418-25.
88. Nakagaki T, Foster DC, Berkner KL, Kisiel W. Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII. *Biochemistry*, 1991, 30, 10819-24.
89. Lawson JH, Mann KG. Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation. *J Biol Chem*, 1991, 266, 11317-27.
90. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23, 17-25.
91. Bauer KA, Rosenberg RD. Role of antithrombin III as a regulator of in vivo coagulation. *Semin Hematol*, 1991, 28, 10-8.
92. Miletich JP, Jackson CM, Majerus PW. Properties of the factor Xa binding site on human platelets. *J Biol Chem*, 1978, 253, 6908-16.

93. Nesheim ME. A simple rate law that describes the kinetics of the heparin-catalyzed reaction between antithrombin III and thrombin. *J Biol Chem*, 1983, 258, 14708-17.
94. Beeler D, Rosenberg R, Jordan R. Fractionation of low molecular weight heparin species and their interaction with antithrombin. *J Biol Chem*, 1979, 254, 2902-13.
95. Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, Peterson TE, Broze GJ, Jr., Simari RD. Expression of tissue factor pathway inhibitor in vascular smooth muscle cells and its regulation by growth factors. *Circ Res*, 1998, 83, 1264-70.
96. Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol*, 2006, 208, 327-39.
97. Novotny WF, Brown SG, Miletich JP, Rader DJ, Broze GJ, Jr. Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood*, 1991, 78, 387-93.
98. Baugh RJ, Broze GJ, Jr., Krishnaswamy S. Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem*, 1998, 273, 4378-86.
99. Broze GJ, Jr., Girard TJ, Novotny WF. Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry*, 1990, 29, 7539-46.
100. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*, 2003, 124, 26S-32S.
101. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem*, 1989, 264, 4743-6.
102. Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin. *J Thromb Haemost*, 2003, 1, 1515-24.
103. Dahlback B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett*, 2005, 579, 3310-6.
104. Ye J, Liu LW, Esmon CT, Johnson AE. The fifth and sixth growth factor-like domains of thrombomodulin bind to the anion-binding exosite of thrombin and alter its specificity. *J Biol Chem*, 1992, 267, 11023-8.
105. Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem*, 1982, 257, 7944-7.
106. Esmon NL, Carroll RC, Esmon CT. Thrombomodulin blocks the ability of thrombin to activate platelets. *J Biol Chem*, 1983, 258, 12238-42.
107. Perera L, Foley C, Darden TA, Stafford D, Mather T, Esmon CT, Pedersen LG. Modeling zymogen protein C. *Biophys J*, 2000, 79, 2925-43.
108. Esmon CT, Gu JM, Xu J, Qu D, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica*, 1999, 84, 363-8.
109. Dahlback B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25, 1311-20.

110. Esmon CT. Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor. *Crit Care Med*, 2004, 32, S298-301.
111. Taylor FB, Jr., Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood*, 2001, 97, 1685-8.
112. Liaw PC, Mather T, Oganessian N, Ferrell GL, Esmon CT. Identification of the protein C/activated protein C binding sites on the endothelial cell protein C receptor. Implications for a novel mode of ligand recognition by a major histocompatibility complex class 1-type receptor. *J Biol Chem*, 2001, 276, 8364-70.
113. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood*, 2004, 103, 1192-201.
114. Giri TK, Villoutreix BO, Wallqvist A, Dahlback B, de Frutos PG. Topological studies of the amino terminal modules of vitamin K-dependent protein S using monoclonal antibody epitope mapping and molecular modeling. *Thromb Haemost*, 1998, 80, 798-804.
115. Stenberg Y, Drakenberg T, Dahlback B, Stenflo J. Characterization of recombinant epidermal growth factor (EGF)-like modules from vitamin-K-dependent protein S expressed in *Spodoptera* cells--the cofactor activity depends on the N-terminal EGF module in human protein S. *Eur J Biochem*, 1998, 251, 558-64.
116. Villoutreix BO, Teleman O, Dahlback B. A theoretical model for the Gla-TSR-EGF-1 region of the anticoagulant cofactor protein S: from biostructural pathology to species-specific cofactor activity. *J Comput Aided Mol Des*, 1997, 11, 293-304.
117. Mille-Baker B, Rezende SM, Simmonds RE, Mason PJ, Lane DA, Laffan MA. Deletion or replacement of the second EGF-like domain of protein S results in loss of APC cofactor activity. *Blood*, 2003, 101, 1416-8.
118. Borgel D, Gaussem P, Garbay C, Bachelot-Loza C, Kaabache T, Liu WQ, Brohard-Bohn B, Le Bonniec B, Aiach M, Gandrille S. Implication of protein S thrombin-sensitive region with membrane binding via conformational changes in the gamma-carboxyglutamic acid-rich domain. *Biochem J*, 2001, 360, 499-506.
119. Lu D, Xie RL, Rydzewski A, Long GL. The effect of N-linked glycosylation on molecular weight, thrombin cleavage, and functional activity of human protein S. *Thromb Haemost*, 1997, 77, 1156-63.
120. Morboeuf O, Borgel D, Gaussem P, Vincenot A, Pittet JL, Aiach M, Gandrille S. Characterization of cleaved plasma protein S with a monoclonal antibody-based assay. *Thromb Haemost*, 2000, 84, 604-10.
121. Long GL, Lu D, Xie RL, Kalafatis M. Human protein S cleavage and inactivation by coagulation factor Xa. *J Biol Chem*, 1998, 273, 11521-6.
122. Mitchell CA, Hau L, Salem HH. Control of thrombin mediated cleavage of protein S. *Thromb Haemost*, 1986, 56, 151-4.
123. Walker FJ. Regulation of vitamin K-dependent protein S. Inactivation by thrombin. *J Biol Chem*, 1984, 259, 10335-9.

124. Saller F, Kaabache T, Aiach M, Gandrille S, Borgel D. The protein S thrombin-sensitive region modulates phospholipid binding and the gamma-carboxyglutamic acid-rich (Gla) domain conformation in a non-specific manner. *J Thromb Haemost*, 2006, 4, 704-6.
125. Hackeng TM, van 't Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J Biol Chem*, 1994, 269, 21051-8.
126. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem*, 1993, 268, 2872-7.
127. Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH. Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91, 2728-32.
128. Koppelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ, Bouma BN. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood*, 1995, 86, 1062-71.
129. van Wijnen M, Stam JG, van't Veer C, Meijers JC, Reitsma PH, Bertina RM, Bouma BN. The interaction of protein S with the phospholipid surface is essential for the activated protein C-independent activity of protein S. *Thromb Haemost*, 1996, 76, 397-403.
130. Norstrom EA, Tran S, Steen M, Dahlback B. Effects of factor Xa and protein S on the individual activated protein C-mediated cleavages of coagulation factor Va. *J Biol Chem*, 2006, 281, 31486-94.
131. Solymoss S, Tucker MM, Tracy PB. Kinetics of inactivation of membrane-bound factor Va by activated protein C. Protein S modulates factor Xa protection. *J Biol Chem*, 1988, 263, 14884-90.
132. Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas*, 2004, 47, 305-14.
133. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood*, 2003, 101, 20-30.
134. Bukys MA, Orban T, Kim PY, Beck DO, Nesheim ME, Kalafatis M. The structural integrity of anion binding exosite I of thrombin is required and sufficient for timely cleavage and activation of factor V and factor VIII. *J Biol Chem*, 2006, 281, 18569-80.
135. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem*, 1994, 269, 31869-80.
136. Nicolaes GA, Tans G, Thomassen MC, Hemker HC, Pabinger I, Varadi K, Schwarz HP, Rosing J. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem*, 1995, 270, 21158-66.
137. Rosing J, Hoekema L, Nicolaes GA, Thomassen MC, Hemker HC, Varadi K, Schwarz HP, Tans G. Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem*, 1995, 270, 27852-8.

138. Norstrom EA, Steen M, Tran S, Dahlback B. Importance of protein S and phospholipid for activated protein C-mediated cleavages in factor Va. *J Biol Chem*, 2003, 278, 24904-11.
139. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*, 1998, 92, 3983-96.
140. Fay PJ, Smudzin TM, Walker FJ. Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *J Biol Chem*, 1991, 266, 20139-45.
141. Fulcher CA, Gardiner JE, Griffin JH, Zimmerman TS. Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V. *Blood*, 1984, 63, 486-9.
142. Bertina RM, Cupers R, van Wijngaarden A. Factor IXa protects activated factor VIII against inactivation by activated protein C. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 125, 177-83.
143. Regan LM, Lamphear BJ, Huggins CF, Walker FJ, Fay PJ. Factor IXa protects factor VIIIa from activated protein C. Factor IXa inhibits activated protein C-catalyzed cleavage of factor VIIIa at Arg562. *J Biol Chem*, 1994, 269, 9445-52.
144. O'Brien DP, Johnson D, Byfield P, Tuddenham EG. Inactivation of factor VIII by factor IXa. *Biochemistry*, 1992, 31, 2805-12.
145. Lamphear BJ, Fay PJ. Proteolytic interactions of factor IXa with human factor VIII and factor VIIIa. *Blood*, 1992, 80, 3120-6.
146. Pike RN, Buckle AM, le Bonniec BF, Church FC. Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *Febs J*, 2005, 272, 4842-51.
147. Espana F, Vicente V, Tabernero D, Scharrer I, Griffin JH. Determination of plasma protein C inhibitor and of two activated protein C-inhibitor complexes in normals and in patients with intravascular coagulation and thrombotic disease. *Thromb Res*, 1990, 59, 593-608.
148. Prendes MJ, Bielek E, Zechmeister-Machhart M, Vanyek-Zavadil E, Carroll VA, Breuss J, Binder BR, Geiger M. Synthesis and ultrastructural localization of protein C inhibitor in human platelets and megakaryocytes. *Blood*, 1999, 94, 1300-12.
149. Nishioka J, Ning M, Hayashi T, Suzuki K. Protein C inhibitor secreted from activated platelets efficiently inhibits activated protein C on phosphatidylethanolamine of platelet membrane and microvesicles. *J Biol Chem*, 1998, 273, 11281-7.
150. Cooper ST, Whinna HC, Jackson TP, Boyd JM, Church FC. Intermolecular interactions between protein C inhibitor and coagulation proteases. *Biochemistry*, 1995, 34, 12991-7.
151. Huntington JA, Kjellberg M, Stenflo J. Crystal structure of protein C inhibitor provides insights into hormone binding and heparin activation. *Structure*, 2003, 11, 205-15.

152. Laurell M, Christensson A, Abrahamsson PA, Stenflo J, Lilja H. Protein C inhibitor in human body fluids. Seminal plasma is rich in inhibitor antigen deriving from cells throughout the male reproductive system. *J Clin Invest*, 1992, 89, 1094-101.
153. Beguin S, Lindhout T, Hemker HC. The effect of trace amounts of tissue factor on thrombin generation in platelet rich plasma, its inhibition by heparin. *Thromb Haemost*, 1989, 61, 25-9.
154. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*, 2002, 100, 148-52.
155. Lecompte T, Wahl D, Regnault V. Thrombinographie. *Hématologie*, 2006, 12, 115-127.
156. Regnault V, De Maistre E, Geschier C, Briquel ME, André E, Stoltz JF, Lecompte T. A new fast one-step immunopreparation for activated protein C. *Thromb Haemost*, 1995, 13, 1365.
157. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Beguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*, 2006, 96, 553-61.
158. Bossuyt PM, Lijmer JG, Mol BW. Randomised comparisons of medical tests: sometimes invalid, not always efficient. *Lancet*, 2000, 356, 1844-7.
159. Magid E. Minimal requirements for test evaluation. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1997, 227, 90-4.
160. Beltran-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia*, 2005, 11, 326-34.
161. Dargaud Y, Beguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, Hemker HC, Negrier C. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost*, 2005, 93, 475-80.
162. Dargaud Y, Lienhart A, Meunier S, Hequet O, Chavanne H, Chamouard V, Marin S, Negrier C. Major surgery in a severe haemophilia A patient with high titre inhibitor: use of the thrombin generation test in the therapeutic decision. *Haemophilia*, 2005, 11, 552-8.
163. Siegemund T, Petros S, Siegemund A, Scholz U, Engelmann L. Thrombin generation in severe haemophilia A and B: the endogenous thrombin potential in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost*, 2003, 90, 781-6.
164. Varadi K, Turecek PL, Schwarz HP. Thrombin generation assay and other universal tests for monitoring haemophilia therapy. *Haemophilia*, 2004, 10 Suppl 2, 17-21.
165. Al Dieri R, Peyvandi F, Santagostino E, Giansily M, Mannucci PM, Schved JF, Beguin S, Hemker HC. The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding. *Thromb Haemost*, 2002, 88, 576-82.
166. Giansily-Blaizot M, Al Dieri R, Schved JF. Thrombin generation measurement in factor VII-depleted plasmas compared to inherited factor VII-deficient plasmas. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003, 33, 36-42.

167. Beguin S, Keularts I, Al Dieri R, Bellucci S, Caen J, Hemker HC. Fibrin polymerization is crucial for thrombin generation in platelet-rich plasma in a VWF-GPIIb-dependent process, defective in Bernard-Soulier syndrome. *J Thromb Haemost*, 2004, 2, 170-6.
168. Reverter JC, Beguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker HC, Collier BS. Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and "clinical restenosis". *J Clin Invest*, 1996, 98, 863-74.
169. Brummel-Ziedins KE, Vossen CY, Butenas S, Mann KG, Rosendaal FR. Thrombin generation profiles in deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2005, 3, 2497-505.
170. Hezard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Nguyen P. Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clin Chem*, 2006, 52, 665-70.
171. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *Jama*, 2006, 296, 397-402.
172. Simioni P, Castoldi E, Lunghi B, Tormene D, Rosing J, Bernardi F. An underestimated combination of opposites resulting in enhanced thrombotic tendency. *Blood*, 2005, 106, 2363-5.
173. Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Guillonnet S, Kirzin JM, Aiach M, Ochat N, Scarabin PY. Impact of progestagens on activated protein C (APC) resistance among users of oral contraceptives. *J Thromb Haemost*, 2004, 2, 1594-600.
174. Rosing J, Tans G, Nicolaes GA, Thomassen MC, van Oerle R, van der Ploeg PM, Heijnen P, Hamulyak K, Hemker HC. Oral contraceptives and venous thrombosis: different sensitivities to activated protein C in women using second- and third-generation oral contraceptives. *Br J Haematol*, 1997, 97, 233-8.
175. Rotteveel RC, Roozendaal KJ, Eijssman L, Hemker HC. The influence of oral contraceptives on the time-integral of thrombin generation (thrombin potential). *Thromb Haemost*, 1993, 70, 959-62.
176. Cimenti C, Koestenberger M, Leschnik B, Haidl H, Muntean W. The respective and combined anticoagulant effects of recombinant human activated protein C, melagatran and heparins using CAT. *Thromb Res*, 2007, 119, 361-7.
177. Kessels H, Beguin S, Andree H, Hemker HC. Measurement of thrombin generation in whole blood--the effect of heparin and aspirin. *Thromb Haemost*, 1994, 72, 78-83.
178. Petros S, Siegemund T, Siegemund A, Engelmann L. The effect of different anticoagulants on thrombin generation. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2006, 17, 131-7.
179. Altman R, Scazzioia A, De Lourdes Herrera M, Gonzalez C. Recombinant factor VIIa reverses the inhibitory effect of aspirin or aspirin plus clopidogrel on in vitro thrombin generation. *J Thromb Haemost*, 2006, 4, 2022-7.

180. Beguin S, Kumar R, Keularts I, Seligsohn U, Collier BS, Hemker HC. Fibrin-dependent platelet procoagulant activity requires GPIb receptors and von Willebrand factor. *Blood*, 1999, 93, 564-70.
181. Butenas S, Cawthorn KM, van't Veer C, DiLorenzo ME, Lock JB, Mann KG. Antiplatelet agents in tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*, 2001, 97, 2314-22.
182. Cone J, Wang S, Tandon N, Fong M, Sun B, Sakurai K, Yoshitake M, Kambayashi J, Liu Y. Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on intracellular cAMP levels and cellular function in platelets and cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999, 34, 497-504.
183. Furman MI, Krueger LA, Frelinger AL, 3rd, Barnard MR, Mascelli MA, Nakada MT, Michelson AD. GPIIb-IIIa antagonist-induced reduction in platelet surface factor V/Va binding and phosphatidylserine expression in whole blood. *Thromb Haemost*, 2000, 84, 492-8.
184. Marwali MR, Hu CP, Mohandas B, Dandapat A, Deonikar P, Chen J, Cawich I, Sawamura T, Kavdia M, Mehta JL. Modulation of ADP-Induced Platelet Activation by Aspirin and Pravastatin: Role of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1, Nitric Oxide, Oxidative Stress, and Inside-Out Integrin Signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322, 1324-32.
185. Keularts IM, Beguin S, de Zwaan C, Hemker HC. Treatment with a GPIIb/IIIa antagonist inhibits thrombin generation in platelet rich plasma from patients. *Thromb Haemost*, 1998, 80, 370-1.
186. Vanschoonbeek K, Feijge MA, Van Kampen RJ, Kenis H, Hemker HC, Giesen PL, Heemskerk JW. Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: subject-dependent variation in thrombogram characteristics. *J Thromb Haemost*, 2004, 2, 476-84.
187. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 1983, 2, 1211-4.
188. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, de Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*, 2006, 4, 295-306.
189. Wahl D, Saadi L, Perret-Guillaume C, Membre A, Frederic M, Devignes J, Blum A, Thiebaugeorges O, Regnault V, Lecompte T. Syndrome des antiphospholipides. Classification actuelle et indications thérapeutiques. *Revue medecine therapeutique*, 2007, 13, 111-121.
190. Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Futsukaichi Y, Yamanishi H, Machii T, Iwatani Y, Kanakura Y. Association between the prevalence of antibodies to beta(2)-glycoprotein I, prothrombin, protein C, protein S, and annexin V in patients with systemic lupus erythematosus and thrombotic and thrombocytopenic complications. *Clin Chem*, 2001, 47, 1008-15.
191. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis rheum*, 1999, 42, 1309-11.

192. Cavazzana A, Ruffatti A, Tonello M, Bortolati M, De Moerloose P, Reber G. An analysis of experimental conditions influencing the anti-beta2-glycoprotein I ELISA assay results. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1109, 484-92.
193. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, de Moerloose P, Boffa MC. Variability of anti-beta2 glycoprotein I antibodies measurement by commercial assays. *Thromb Haemost*, 2005, 94, 665-72.
194. Oosting JD, Derksen RH, Bobbink IW, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood*, 1993, 81, 2618-25.
195. Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thromb Haemost*, 1996, 75, 721-4.
196. Hurtado V, Montes R, Gris JC, Bertolaccini ML, Alonso A, Martinez-Gonzalez MA, Khamashta MA, Fukudome K, Lane DA, Hermida J. Autoantibodies against EPCR are found in antiphospholipid syndrome and are a risk factor for fetal death. *Blood*, 2004, 104, 1369-74.
197. van Hylckama Vlieg A, Montes R, Rosendaal FR, Hermida J. Autoantibodies against endothelial protein C receptor and the risk of a first deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2007, 5, 1449-54.
198. Adams MJ, Donohoe S, Mackie IJ, Machin SJ. Anti-tissue factor pathway inhibitor activity in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol*, 2001, 114, 375-9.
199. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Broze GJ. High titers of autoantibodies to tissue factor pathway inhibitor are associated with the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*, 2003, 1, 718-24.
200. Wolberg AS, Roubey RA. Mechanisms of autoantibody-induced monocyte tissue factor expression. *Thromb Res*, 2004, 114, 391-6.
201. Cesarman-Maus G, Rios-Luna NP, Deora AB, Huang B, Villa R, Cravioto Mdel C, Alarcon-Segovia D, Sanchez-Guerrero J, Hajjar KA. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. *Blood*, 2006, 107, 4375-82.
202. Yang CD, Hwang KK, Yan W, Gallagher K, FitzGerald J, Grossman JM, Hahn BH, Chen PP. Identification of anti-plasmin antibodies in the antiphospholipid syndrome that inhibit degradation of fibrin. *J Immunol*, 2004, 172, 5765-73.
203. Chen XX, Gu YY, Li SJ, Qian J, Hwang KK, Chen PP, Chen SL, Yang CD. Some plasmin-induced antibodies bind to cardiolipin, display lupus anticoagulant activity and induce fetal loss in mice. *J Immunol*, 2007, 178, 5351-6.
204. Cugno M, Cabibbe M, Galli M, Meroni PL, Caccia S, Russo R, Bottasso B, Mannucci PM. Antibodies to tissue-type plasminogen activator (tPA) in patients with antiphospholipid syndrome: evidence of interaction between the antibodies and the catalytic domain of tPA in 2 patients. *Blood*, 2004, 103, 2121-6.

205. Arvieux J, Pernod G, Regnault V, Darnige L, Garin J. Some anticardiolipin antibodies recognize a combination of phospholipids with thrombin-modified antithrombin, complement C4b-binding protein, and lipopolysaccharide binding protein. *Blood*, 1999, 93, 4248-55.
206. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*, 1990, 335, 1544-7.
207. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87, 4120-4.
208. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*, 1990, 336, 177-8.
209. Schultze HE, Heide K, Haupt H. Uber ein bisher unbekanntes niedermolekulars beta-2 Clobulin des Humanserums. *Naturwissenschaften*, 1961, 48, 719-724.
210. Polz E, Kostner GM. The binding of beta 2-glycoprotein-I to human serum lipoproteins: distribution among density fractions. *FEBS Lett*, 1979, 102, 183-6.
211. Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma beta 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81, 3640-4.
212. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ, Derksen RH, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J*, 1999, 18, 5166-74.
213. Hunt J, Krilis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol*, 1994, 152, 653-9.
214. Sheng Y, Sali A, Herzog H, Lahnstein J, Krilis SA. Site-directed mutagenesis of recombinant human beta 2-glycoprotein I identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipid binding and anti-cardiolipin antibody activity. *J Immunol*, 1996, 157, 3744-51.
215. Horbach DA, van Oort E, Derksen RH, de Groot PG. The contribution of anti-prothrombin-antibodies to lupus anticoagulant activity--discrimination between functional and non-functional anti-prothrombin-antibodies. *Thromb Haemost*, 1998, 79, 790-5.
216. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R. Crystal structure of human beta2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J*, 1999, 18, 6228-39.
217. Hunt JE, Simpson RJ, Krilis SA. Identification of a region of beta 2-glycoprotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90, 2141-5.
218. Ohkura N, Hagihara Y, Yoshimura T, Goto Y, Kato H. Plasmin can reduce the function of human beta2 glycoprotein I by cleaving domain V into a nicked form. *Blood*, 1998, 91, 4173-9.

219. Guerin J, Sheng Y, Reddel S, Iverson GM, Chapman MG, Krilis SA. Heparin inhibits the binding of beta 2-glycoprotein I to phospholipids and promotes the plasmin-mediated inactivation of this blood protein. Elucidation of the consequences of the two biological events in patients with the anti-phospholipid syndrome. *J Biol Chem*, 2002, 277, 2644-9.
220. Matsuura E, Inagaki J, Kasahara H, Yamamoto D, Atsumi T, Kobayashi K, Kaihara K, Zhao D, Ichikawa K, Tsutsumi A, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Proteolytic cleavage of beta(2)-glycoprotein I: reduction of antigenicity and the structural relationship. *Int Immunol*, 2000, 12, 1183-92.
221. Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Matsuura E, Kobayashi K, Inagaki J, Kato H, Tanaka H, Yamakado M, Akino M, Saitou H, Amasaki Y, Jodo S, Amengual O, Koike T. Nicked beta2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood*, 2004, 103, 3766-72.
222. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Thromb Haemost*, 1985, 54, 397-401.
223. Schousboe I. beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood*, 1985, 66, 1086-91.
224. Shi W, Chong BH, Chesterman CN. Beta 2-glycoprotein I is a requirement for anticardiolipin antibodies binding to activated platelets: differences with lupus anticoagulants. *Blood*, 1993, 81, 1255-62.
225. Nimpf J, Bevers EM, Bomans PH, Till U, Wurm H, Kostner GM, Zwaal RF. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 884, 142-9.
226. Schousboe I, Rasmussen MS. Synchronized inhibition of the phospholipid mediated autoactivation of factor XII in plasma by beta 2-glycoprotein I and anti-beta 2-glycoprotein I. *Thromb Haemost*, 1995, 73, 798-804.
227. Shi T, Iverson GM, Qi JC, Cockerill KA, Linnik MD, Konecny P, Krilis SA. Beta 2-Glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: loss of inhibition by clipped beta 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101, 3939-44.
228. Shi T, Giannakopoulos B, Iverson GM, Cockerill KA, Linnik MD, Krilis SA. Domain V of beta2-glycoprotein I binds factor XI/XIa and is cleaved at Lys317-Thr318. *J Biol Chem*, 2005, 280, 907-12.
229. Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA. Beta 2 glycoprotein I--function in health and disease. *Thromb Res*, 2004, 114, 335-46.
230. Bancsi LF, van der Linden IK, Bertina RM. Beta 2-glycoprotein I deficiency and the risk of thrombosis. *Thromb Haemost*, 1992, 67, 649-53.
231. Sheng Y, Reddel SW, Herzog H, Wang YX, Brighton T, France MP, Robertson SA, Krilis SA. Impaired thrombin generation in beta 2-glycoprotein I null mice. *J Biol Chem*, 2001, 276, 13817-21.

232. Keeling DM, Wilson AJ, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Role of beta 2-glycoprotein I and anti-phospholipid antibodies in activation of protein C in vitro. *J Clin Pathol*, 1993, 46, 908-11.
233. Mori T, Takeya H, Nishioka J, Gabazza EC, Suzuki K. beta 2-Glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protein C on the phospholipid surface. *Thromb Haemost*, 1996, 75, 49-55.
234. Wurm H. beta 2-Glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles. *Int J Biochem*, 1984, 16, 511-5.
235. Polz E, Wurm H, Kostner GM. Investigations on beta 2-glycoprotein-I in the rat: isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions. *Int J Biochem*, 1980, 11, 265-70.
236. Schousboe I, Rasmussen MS. The effect of beta 2-glycoprotein I on the dextran sulfate and sulfatide activation of the contact system (Hageman factor system) in the blood coagulation. *Int J Biochem*, 1988, 20, 787-92.
237. Simmelink MJ, Derksen RH, Arnout J, De Groot PG. A simple method to discriminate between beta2-glycoprotein I- and prothrombin-dependent lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost*, 2003, 1, 740-7.
238. Tait JF, Gibson D, Fujikawa K. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J Biol Chem*, 1989, 264, 7944-9.
239. Willems GM, Janssen MP, Pelsers MM, Comfurius P, Galli M, Zwaal RF, Bevers EM. Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody-beta 2-glycoprotein I complexes to lipid membranes. *Biochem*, 1996, 35, 13833-42.
240. Harper MF, Hayes PM, Lentz BR, Roubey RA. Characterization of beta2-glycoprotein I binding to phospholipid membranes. *Thromb Haemost*, 1998, 80, 610-4.
241. Brighton TA, Dai YP, Hogg PJ, Chesterman CN. Microheterogeneity of beta-2 glycoprotein I: implications for binding to anionic phospholipids. *Biochem J*, 1999, 340 (Pt 1), 59-67.
242. Long M, Thiagarajan P, Shapiro SS. Quantitative measurement of binding of beta2-glycoprotein 1 and IgG antiphospholipid antibodies to human platelets. *Blood*, 1995, 86, 550A.
243. Schousboe I. Binding of beta 2-glycoprotein I to platelets: effect of adenylate cyclase activity. *Thromb Res*, 1980, 19, 225-37.
244. Bevers EM, Janssen MP, Comfurius P, Balasubramanian K, Schroit AJ, Zwaal RF, Willems GM. Quantitative determination of the binding of beta2-glycoprotein I and prothrombin to phosphatidylserine-exposing blood platelets. *Biochem J*, 2005, 386, 271-9.
245. Vallar L, Regnault V, Latger-Cannard V, Lecompte T. Beta2-glycoprotein I binding to platelet microparticle membrane specifically reduces immunoreactivity of glycoproteins IIb/IIIa. *Thromb Haemost*, 2001, 85, 314-9.

246. Cutsforth GA, Whitaker RN, Hermans J, Lentz BR. A new model to describe extrinsic protein binding to phospholipid membranes of varying composition: application to human coagulation proteins. *Biochemistry*, 1989, 28, 7453-61.
247. Koike H, Okuda D, Morita T. Mutations in autolytic loop-2 and at Asp554 of human prothrombin that enhance protein C activation by meizothrombin. *J Biol Chem*, 2003, 278, 15015-22.
248. Kop JM, Cuypers PA, Lindhout T, Hemker HC, Hermens WT. The adsorption of prothrombin to phospholipid monolayers quantitated by ellipsometry. *J Biol Chem*, 1984, 259, 13993-8.
249. Willems GM, Janssen MP, Comfurius P, Galli M, Zwaal RF, Bevers EM. Kinetics of prothrombin-mediated binding of lupus anticoagulant antibodies to phosphatidylserine-containing phospholipid membranes: an ellipsometric study. *Biochemistry*, 2002, 41, 14357-63.
250. Wikstrom A, Deinum J. Probing the interaction of coagulation factors with phospholipid vesicle surfaces by surface plasma resonance. *Anal Biochem*, 2007, 362, 98-107.
251. Scandura JM, Ahmad SS, Walsh PN. A binding site expressed on the surface of activated human platelets is shared by factor X and prothrombin. *Biochemistry*, 1996, 35, 8890-902.
252. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus*, 1992, 1, 75-81.
253. McNally T, Purdy G, Mackie IJ, Machin SJ, Isenberg DA. The use of an anti-beta 2-glycoprotein-I assay for discrimination between anticardiolipin antibodies associated with infection and increased risk of thrombosis. *Br J Haematol*, 1995, 91, 471-3.
254. Jones JV, James H, Tan MH, Mansour M. Antiphospholipid antibodies require beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H) as cofactor. *J Rheumatol*, 1992, 19, 1397-402.
255. Roubey RA, Pratt CW, Buyon JP, Winfield JB. Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon beta 2-glycoprotein I. *J Clin Invest*, 1992, 90, 1100-4.
256. Roubey RA, Eisenberg RA, Harper MF, Winfield JB. "Anticardiolipin" autoantibodies recognize beta 2-glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of Ag density and bivalent binding. *J Immunol*, 1995, 154, 954-60.
257. Sheng Y, Kandiah DA, Krilis SA. Anti-beta 2-glycoprotein I autoantibodies from patients with the "antiphospholipid" syndrome bind to beta 2-glycoprotein I with low affinity: dimerization of beta 2-glycoprotein I induces a significant increase in anti-beta 2-glycoprotein I antibody affinity. *J Immunol*, 1998, 161, 2038-43.
258. Tincani A, Spatola L, Prati E, Allegri F, Ferremi P, Cattaneo R, Meroni P, Balestrieri G. The anti-beta2-glycoprotein I activity in human anti-phospholipid syndrome sera is due to monoreactive low-affinity autoantibodies directed to epitopes located on native beta2-glycoprotein I and preserved during species' evolution. *J Immunol*, 1996, 157, 5732-8.

259. de Laat B, Derksen RH, van Lummel M, Pennings MT, de Groot PG. Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood*, 2006, 107, 1916-24.
260. Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T, Matsuura E, Hughes GR. beta 2-Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*, 1994, 37, 1453-61.
261. Kuwana M, Matsuura E, Kobayashi K, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y, Kawakami Y. Binding of beta 2-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. *Blood*, 2005, 105, 1552-7.
262. Martinuzzo ME, Forastiero RR, Carreras LO. Anti beta 2 glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. *Br J Haematol*, 1995, 89, 397-402.
263. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med*, 1994, 179, 457-62.
264. Pengo V, Biasiolo A, Fior MG. Autoimmune antiphospholipid antibodies are directed against a cryptic epitope expressed when beta 2-glycoprotein I is bound to a suitable surface. *Thromb Haemost*, 1995, 73, 29-34.
265. George J, Gilburd B, Hojnik M, Levy Y, Langevitz P, Matsuura E, Koike T, Shoenfeld Y. Target recognition of beta2-glycoprotein I (beta2GPI)-dependent anticardiolipin antibodies: evidence for involvement of the fourth domain of beta2GPI in antibody binding. *J Immunol*, 1998, 160, 3917-23.
266. Iverson GM, Reddel S, Victoria EJ, Cockerill KA, Wang YX, Marti-Renom MA, Sali A, Marquis DM, Krilis SA, Linnik MD. Use of single point mutations in domain I of beta 2-glycoprotein I to determine fine antigenic specificity of antiphospholipid autoantibodies. *J Immunol*, 2002, 169, 7097-103.
267. Iverson GM, Victoria EJ, Marquis DM. Anti-beta2 glycoprotein I (beta2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta2GPI. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95, 15542-6.
268. McNeeley PA, Dlott JS, Furie RA, Jack RM, Ortel TL, Triplett DA, Victoria EJ, Linnik MD. Beta2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies preferentially bind the amino terminal domain of beta2-glycoprotein I. *Thromb Haemost*, 2001, 86, 590-5.
269. Reddel SW, Wang YX, Sheng YH, Krilis SA. Epitope studies with anti-beta 2-glycoprotein I antibodies from autoantibody and immunized sources. *J Autoimmun*, 2000, 15, 91-6.
270. Yang CD, Chen SL, Shen N, Qi M, Xu F. Detection of anti-recombinant beta 2-glycoprotein 1 and anti-recombinant beta 2-glycoprotein 1 fifth-domain antibodies in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*, 1998, 18, 5-10.
271. Ioannou Y, Pericleous C, Giles I, Latchman DS, Isenberg DA, Rahman A. Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. *Arthritis Rheum*, 2007, 56, 280-90.

272. de Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood*, 2005, 105, 1540-5.
273. Igarashi M, Matsuura E, Igarashi Y, Nagae H, Ichikawa K, Triplett DA, Koike T. Human beta2-glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using mutants expressed by a baculovirus system. *Blood*, 1996, 87, 3262-70.
274. Koike T, Ichikawa K, Atsumi T, Kasahara H, Matsuura E. Beta 2-glycoprotein I-anti-beta 2-glycoprotein I interaction. *J Autoimmun*, 2000, 15, 97-100.
275. Lin WS, Chen PC, Yang CD, Cho E, Hahn BH, Grossman J, Hwang KK, Chen PP. Some antiphospholipid antibodies recognize conformational epitopes shared by beta2-glycoprotein I and the homologous catalytic domains of several serine proteases. *Arthritis Rheum*, 2007, 56, 1638-47.
276. Arvieux J, Renaudineau Y, Mane I, Perraut R, Krilis SA, Youinou P. Distinguishing features of anti-beta2 glycoprotein I antibodies between patients with leprosy and the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*, 2002, 87, 599-605.
277. Bozic B, Cucnik S, Kveder T, Rozman B. Avidity of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies. *Autoimmun Rev*, 2005, 4, 303-8.
278. Regnault V, De Maistre E, Wahl D, Lecompte T. Monovalent binding of autoantibodies to beta2-glycoprotein I, detected using surface plasmon resonance at low antigen density. *Br J Haematol*, 2000, 109, 187-94.
279. Cucnik S, Kveder T, Krizaj I, Rozman B, Bozic B. High avidity anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63, 1478-82.
280. de Laat B, Derksen RH, de Groot PG. High-avidity anti-beta glycoprotein I antibodies highly correlate with thrombosis in contrast to low-avidity anti-beta glycoprotein I antibodies. *J Thromb Haemost*, 2006, 4, 1619-21.
281. Arvieux J, Regnault V, Hachulla E, Darnige L, Roussel B, Bensa JC. Heterogeneity and immunochemical properties of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies. *Thromb Haemost*, 1998, 80, 393-8.
282. Sanmarco M, Bardin N, Blank M, Pascal V, Christine Alessi M, Dignat-George F, Shoenfeld Y, Harle JR. Heterogeneity of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. A factor of variability in test results. *Thromb Haemost*, 2005, 93, 80-7.
283. Takeya H, Mori T, Gabazza EC, Kuroda K, Deguchi H, Matsuura E, Ichikawa K, Koike T, Suzuki K. Anti-beta2-glycoprotein I (beta2GPI) monoclonal antibodies with lupus anticoagulant-like activity enhance the beta2GPI binding to phospholipids. *J Clin Invest*, 1997, 99, 2260-8.
284. Arnout J, Wittevrongel C, Vanrusselt M, Hoylaerts M, Vermeylen J. Beta-2-glycoprotein I dependent lupus anticoagulants form stable bivalent antibody beta-2-glycoprotein I complexes on phospholipid surfaces. *Thromb Haemost*, 1998, 79, 79-86.

285. Pengo V, Biasiolo A, Rampazzo P, Brocco T. dRVVT is more sensitive than KCT or TTI for detecting lupus anticoagulant activity of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies. *Thromb Haemost*, 1999, 81, 256-8.
286. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost*, 1991, 66, 629-32.
287. Oosting JD, Derksen RH, Entjes HT, Bouma BN, de Groot PG. Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of beta 2-glycoprotein I. *Thromb Haemost*, 1992, 67, 499-502.
288. Permpikul P, Rao LV, Rapaport SI. Functional and binding studies of the roles of prothrombin and beta 2-glycoprotein I in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood*, 1994, 83, 2878-92.
289. Arnout J. Antiphospholipid syndrome: diagnostic aspects of lupus anticoagulants. *Thromb Haemost*, 2001, 86, 83-91.
290. Fleck RA, Rapaport SI, Rao LV. Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood*, 1988, 72, 512-9.
291. Rao LV, Hoang AD, Rapaport SI. Differences in the interactions of lupus anticoagulant IgG with human prothrombin and bovine prothrombin. *Thromb Haemost*, 1995, 73, 668-74.
292. Wu JR, Lentz BR. Phospholipid-specific conformational changes in human prothrombin upon binding to procoagulant acidic lipid membranes. *Thromb Haemost*, 1994, 71, 596-604.
293. Akimoto T, Akama T, Kono I, Sumida T. Relationship between clinical features and binding domains of anti-prothrombin autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 1999, 8, 761-6.
294. Puurunen M, Manttari M, Manninen V, Palosuo T, Vaarala O. Antibodies to prothrombin crossreact with plasminogen in patients developing myocardial infarction. *Br J Haematol*, 1998, 100, 374-9.
295. Rao LV, Hoang AD, Rapaport SI. Mechanism and effects of the binding of lupus anticoagulant IgG and prothrombin to surface phospholipid. *Blood*, 1996, 88, 4173-82.
296. Field SL, Hogg PJ, Daly EB, Dai YP, Murray B, Owens D, Chesterman CN. Lupus anticoagulants form immune complexes with prothrombin and phospholipid that can augment thrombin production in flow. *Blood*, 1999, 94, 3421-31.
297. Field SL, Chesterman CN, Dai YP, Hogg PJ. Lupus antibody bivalency is required to enhance prothrombin binding to phospholipid. *J Immunol*, 2001, 166, 6118-25.
298. Simmelink MJ, Horbach DA, Derksen RH, Meijers JC, Bevers EM, Willems GM, De Groot PG. Complexes of anti-prothrombin antibodies and prothrombin cause lupus anticoagulant activity by competing with the binding of clotting factors for catalytic phospholipid surfaces. *Br J Haematol*, 2001, 113, 621-9.

299. Wahl DG, Guillemain F, de Maistre E, Perret C, Lecompte T, Thibaut G. Risk for venous thrombosis related to antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus--a meta-analysis. *Lupus*, 1997, 6, 467-73.
300. Dunoyer-Geindre S, Kwak BR, Pelli G, Roth I, Satta N, Fish RJ, Reber G, Mach F, Kruithof EK, de Moerloose P. Immunization of LDL receptor-deficient mice with beta2-glycoprotein 1 or human serum albumin induces a more inflammatory phenotype in atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*, 2007, 97, 129-38.
301. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Ventura D, Sarzi Puttini PC, Atzeni F, Lonati L, Parati G, Tincani A, Mari D, Tedesco F. Inflammatory response and the endothelium. *Thromb Res*, 2004, 114, 329-34.
302. Gharavi AE, Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Harris EN. Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus-derived peptide cause thrombosis and activation of endothelial cells in vivo. *Arthritis Rheum*, 2002, 46, 545-52.
303. Raschi E, Testoni C, Bosisio D, Borghi MO, Koike T, Mantovani A, Meroni PL. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood*, 2003, 101, 3495-500.
304. Kandiah DA, Krilis SA. Heterogeneity of lupus anticoagulant (LA) antibodies: LA activity in dilute Russell's Viper Venom Time and dilute Kaolin Clotting Time detect different populations of antibodies in patients with the "antiphospholipid" syndrome. *Thromb Haemost*, 1998, 80, 250-7.
305. Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*, 1997, 77, 486-91.
306. Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM. Anticoagulant activity of beta 2-glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost*, 1992, 68, 297-300.
307. Aznar J, Villa P, Espana F, Estelles A, Grancha S, Falco C. Activated protein C resistance phenotype in patients with antiphospholipid antibodies. *J Lab Clin Med*, 1997, 130, 202-8.
308. Ehrenforth S, Radtke KP, Scharrer I. Acquired activated protein C-resistance in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost*, 1995, 74, 797-8.
309. Male C, Mitchell L, Julian J, Vegh P, Joshua P, Adams M, David M, Andrew ME. Acquired activated protein C resistance is associated with lupus anticoagulants and thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Blood*, 2001, 97, 844-9.
310. Borrell M, Sala N, de Castellarnau C, Lopez S, Gari M, Fontcuberta J. Immunoglobulin fractions isolated from patients with antiphospholipid antibodies prevent the inactivation of factor Va by activated protein C on human endothelial cells. *Thromb Haemost*, 1992, 68, 268-72.

311. Smirnov MD, Triplett DT, Comp PC, Esmon NL, Esmon CT. On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest*, 1995, 95, 309-16.
312. Malia RG, Kitchen S, Greaves M, Preston FE. Inhibition of activated protein C and its cofactor protein S by antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol*, 1990, 76, 101-7.
313. Gardiner C, Cohen H, Jenkins A, Machin SJ, Mackie IJ. Detection of acquired resistance to activated protein C associated with antiphospholipid antibodies using a novel clotting assay. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2006, 17, 477-83.
314. Safa O, Hensley K, Smirnov MD, Esmon CT, Esmon NL. Lipid oxidation enhances the function of activated protein C. *J Biol Chem*, 2001, 276, 1829-36.
315. Safa O, Esmon CT, Esmon NL. Inhibition of APC anticoagulant activity on oxidized phospholipid by anti- β 2-glycoprotein I monoclonal antibodies. *Blood*, 2005, 106, 1629-35.
316. Toyoshima K, Makino T, Ozawa N, Umeuchi M, Nozawa S. Effect of anticardiolipin antibody in patients with recurrent fetal loss on thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Clin Lab Anal*, 1993, 7, 57-9.
317. Cariou R, Tobelem G, Bellucci S, Soria J, Soria C, Maclouf J, Caen J. Effect of lupus anticoagulant on antithrombotic properties of endothelial cells--inhibition of thrombomodulin-dependent protein C activation. *Thromb Haemost*, 1988, 60, 54-8.
318. Atsumi T, Khamashta MA, Amengual O, Donohoe S, Mackie I, Ichikawa K, Koike T, Hughes GR. Binding of anticardiolipin antibodies to protein C via β 2-glycoprotein I (β 2-GPI): a possible mechanism in the inhibitory effect of antiphospholipid antibodies on the protein C system. *Clin Exp Immunol*, 1998, 112, 325-33.
319. Martinuzzo M, Forastiero R, Adamczuk Y, Cerrato G, Carreras LO. Activated protein C resistance in patients with anti- β 2 glycoprotein I antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1996, 7, 702-4.
320. Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Kawasaki T, Machii T, Kitani T, Iwatani Y, Kanakura Y. Acquired activated protein C resistance is associated with the co-existence of anti-prothrombin antibodies and lupus anticoagulant activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol*, 2002, 118, 577-83.
321. Ieko M, Ichikawa K, Triplett DA, Matsuura E, Atsumi T, Sawada K, Koike T. β 2-glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis rheum*, 1999, 42, 167-74.
322. Atsumi T, Khamashta MA, Ames PR, Ichikawa K, Koike T, Hughes GR. Effect of β 2 glycoprotein I and human monoclonal anticardiolipin antibody on the protein S/C4b-binding protein system. *Lupus*, 1997, 6, 358-64.
323. Galli M, Willems GM, Rosing J, Janssen RM, Govers-Riemslog JW, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM. Anti-prothrombin IgG from patients with anti-phospholipid antibodies inhibits the inactivation of factor Va by activated protein C. *Br J Haematol*, 2005, 129, 240-7.

324. Izumi T, Pound ML, Su Z, Iverson GM, Ortel TL. Anti-beta(2)-glycoprotein I antibody-mediated inhibition of activated protein C requires binding of beta(2)-glycoprotein I to phospholipids. *Thromb Haemost*, 2002, 88, 620-6.
325. Potzsch B, Kawamura H, Preissner KT, Schmidt M, Seelig C, Muller-Berghaus G. Acquired protein C dysfunction but not decreased activity of thrombomodulin is a possible marker of thrombophilia in patients with lupus anticoagulant. *J Lab Clin Med*, 1995, 125, 56-65.
326. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*, 1998, 79, 276-81.
327. Reverter JC, Tassies D, Font J, Khamashta MA, Ichikawa K, Cervera R, Escolar G, Hughes GR, Ingelmo M, Ordinas A. Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum*, 1998, 41, 1420-7.
328. Zhou H, Wolberg AS, Roubey RA. Characterization of monocyte tissue factor activity induced by IgG antiphospholipid antibodies and inhibition by dilazep. *Blood*, 2004, 104, 2353-8.
329. Goldsmith GH, Pierangeli SS, Branch DW, Gharavi AE, Harris EN. Inhibition of prothrombin activation by antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein 1. *Br J Haematol*, 1994, 87, 548-54.
330. Liestol S, Sandset PM, Jacobsen EM, Mowinckel MC, Wisloff F. Decreased anticoagulant response to tissue factor pathway inhibitor type 1 in plasmas from patients with lupus anticoagulants. *Br J Haematol*, 2007, 136, 131-7.
331. Salemink I, Blezer R, Willems GM, Galli M, Bevers E, Lindhout T. Antibodies to beta2-glycoprotein I associated with antiphospholipid syndrome suppress the inhibitory activity of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost*, 2000, 84, 653-6.
332. Lean SY, Ellery P, Ivey L, Thom J, Oostryck R, Leahy M, Baker R, Adams M. The effects of tissue factor pathway inhibitor and anti-beta-2-glycoprotein-I IgG on thrombin generation. *Haematologica*, 2006, 91, 1360-6.
333. Sheng Y, Hanly JG, Reddel SW, Kouts S, Guerin J, Koike T, Ichikawa K, Sturgess A, Krilis SA. Detection of 'antiphospholipid' antibodies: a single chromogenic assay of thrombin generation sensitively detects lupus anticoagulants, anticardiolipin antibodies, plus antibodies binding beta(2)-glycoprotein I and prothrombin. *Clin Exp Immunol*, 2001, 124, 502-8.
334. Rahgozar S, Yang Q, Giannakopoulos B, Yan X, Miyakis S, Krilis SA. Beta2-glycoprotein I binds thrombin via exosite I and exosite II: anti-beta2-glycoprotein I antibodies potentiate the inhibitory effect of beta2-glycoprotein I on thrombin-mediated factor XIa generation. *Arthritis Rheum*, 2007, 56, 605-13.
335. Rand JH, Wu XX. Antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a new mechanism for thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*, 1999, 82, 649-55.

336. Rand JH, Wu XX, Lapinski R, van Heerde WL, Reutelingsperger CP, Chen PP, Ortel TL. Detection of antibody-mediated reduction of annexin A5 anticoagulant activity in plasmas of patients with the antiphospholipid syndrome. *Blood*, 2004, 104, 2783-90.
337. Brachvogel B, Dikschas J, Moch H, Welzel H, von der Mark K, Hofmann C, Poschl E. Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol*, 2003, 23, 2907-13.
338. Lutters BC, Derksen RH, Tekelenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, de Groot PG. Dimers of beta 2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2'. *J Biol Chem*, 2003, 278, 33831-8.
339. Shi T, Giannakopoulos B, Yan X, Yu P, Berndt MC, Andrews RK, Rivera J, Iverson GM, Cockerill KA, Linnik MD, Krilis SA. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies in complex with beta2-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V. *Arthritis Rheum*, 2006, 54, 2558-67.
340. Campbell AL, Pierangeli SS, Wellhausen S, Harris EN. Comparison of the effects of anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome and with syphilis on platelet activation and aggregation. *Thromb Haemost*, 1995, 73, 529-34.
341. Pierangeli SS, Vega-Ostertag M, Harris EN. Intracellular signaling triggered by antiphospholipid antibodies in platelets and endothelial cells: a pathway to targeted therapies. *Thromb Res*, 2004, 114, 467-76.
342. Robbins DL, Leung S, Miller-Blair DJ, Ziboh V. Effect of anticardiolipin/beta2-glycoprotein I complexes on production of thromboxane A2 by platelets from patients with the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*, 1998, 25, 51-6.
343. Arvieux J, Roussel B, Pouzol P, Colomb MG. Platelet activating properties of murine monoclonal antibodies to beta 2-glycoprotein I. *Thromb Haemost*, 1993, 70, 336-41.
344. Ford I, Urbaniak S, Greaves M. IgG from patients with antiphospholipid syndrome binds to platelets without induction of platelet activation. *Br J Haematol*, 1998, 102, 841-9.
345. Warner MN, Pavord S, Moore JC, Warkentin TE, Hayward CP, Kelton JG. Serum-induced platelet procoagulant activity: an assay for the characterization of prothrombotic disorders. *J Lab Clin Med*, 1999, 133, 129-33.
346. Lutters BC, Meijers JC, Derksen RH, Arnout J, de Groot PG. Dimers of beta 2-glycoprotein I mimic the in vitro effects of beta 2-glycoprotein I-anti-beta 2-glycoprotein I antibody complexes. *J Biol Chem*, 2001, 276, 3060-7.
347. Jankowski M, Vreys I, Wittevrongel C, Boon D, Vermylen J, Hoylaerts MF, Arnout J. Thrombogenicity of beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood*, 2003, 101, 157-62.
348. Bohgaki M, Atsumi T, Yamashita Y, Yasuda S, Sakai Y, Furusaki A, Bohgaki T, Amengual O, Amasaki Y, Koike T. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-beta2Glycoprotein I antibodies. *Int Immunol*, 2004, 16, 1633-41.
349. Del Papa N, Sheng YH, Raschi E, Kandiah DA, Tincani A, Khamashta MA, Atsumi T, Hughes GR, Ichikawa K, Koike T, Balestrieri G, Krilis SA, Meroni PL. Human beta 2-

glycoprotein I binds to endothelial cells through a cluster of lysine residues that are critical for anionic phospholipid binding and offers epitopes for anti-beta 2-glycoprotein I antibodies. *J Immunol*, 1998, 160, 5572-8.

350. Riddell DR, Vinogradov DV, Stannard AK, Chadwick N, Owen JS. Identification and characterization of LRP8 (apoER2) in human blood platelets. *J Lipid Res*, 1999, 40, 1925-30.

351. de Groot PG, van Lummel M, Pennings M, Urbanus R, Bas de Laat H, Lenting PJ, Derksen RH. Beta2-glycoprotein I and LDL-receptor family members. *Thromb Res*, 2004, 114, 455-9.

352. van Lummel M, Pennings MT, Derksen RH, Urbanus RT, Lutters BC, Kaldenhoven N, de Groot PG. The binding site in {beta}2-glycoprotein I for ApoER2' on platelets is located in domain V. *J Biol Chem*, 2005, 280, 36729-36.

353. Pennings MT, Derksen RH, van Lummel M, Adelmeijer J, VanHoorelbeke K, Urbanus RT, Lisman T, de Groot PG. Platelet adhesion to dimeric beta-glycoprotein I under conditions of flow is mediated by at least two receptors: glycoprotein Ialpha and apolipoprotein E receptor 2'. *J Thromb Haemost*, 2007, 5, 369-77.

354. Raschi E, Testoni C, Borghi MO, Fineschi S, Meroni PL. Endothelium activation in the anti-phospholipid syndrome. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57, 282-6.

355. Meroni PL, Raschi E, Testoni C, Tincani A, Balestrieri G, Molteni R, Khamashta MA, Tremoli E, Camera M. Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype. *Arthritis Rheum*, 2001, 44, 2870-8.

356. Satta N, Dunoyer-Geindre S, Reber G, Fish RJ, Boehlen F, Kruihof EK, de Moerloose P. The role of TLR2 in the inflammatory activation of mouse fibroblasts by human antiphospholipid antibodies. *Blood*, 2007, 109, 1507-14.

357. Pierangeli SS, Vega-Ostertag ME, Raschi E, Liu X, Romay-Penabad Z, De Micheli V, Galli M, Moia M, Tincani A, Borghi MO, Nguyen-Oghalai T, Meroni PL. Toll-like receptor and antiphospholipid mediated thrombosis: in vivo studies. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66, 1327-33.

358. Dunoyer-Geindre S, de Moerloose P, Galve-de Rochemonteix B, Reber G, Kruihof EK. NFkappaB is an essential intermediate in the activation of endothelial cells by anti-beta(2)-glycoprotein 1 antibodies. *Thromb Haemost*, 2002, 88, 851-7.

359. Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, Ferrara D, Harris EN, Pierangeli SS. Involvement of p38 MAPK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum*, 2005, 52, 1545-54.

360. Simoncini S, Sapet C, Camoin-Jau L, Bardin N, Harle JR, Sampol J, Dignat-George F, Anfosso F. Role of reactive oxygen species and p38 MAPK in the induction of the pro-adhesive endothelial state mediated by IgG from patients with anti-phospholipid syndrome. *Int Immunol*, 2005, 17, 489-500.

361. Moestrup SK, Schousboe I, Jacobsen C, Lehestre JR, Christensen EI, Willnow TE. beta2-glycoprotein-I (apolipoprotein H) and beta2-glycoprotein-I-phospholipid complex harbor a recognition site for the endocytic receptor megalin. *J Clin Invest*, 1998, 102, 902-9.

362. Pennings MT, van Lummel M, Derksen RH, Urbanus RT, Romijn RA, Lenting PJ, de Groot PG. Interaction of beta2-glycoprotein I with members of the low density lipoprotein receptor family. *J Thromb Haemost*, 2006, 4, 1680-90.
363. Zhang J, McCrae KR. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood*, 2005, 105, 1964-9.
364. Ma K, Simantov R, Zhang JC, Silverstein R, Hajjar KA, McCrae KR. High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *J Biol Chem*, 2000, 275, 15541-8.
365. Wagenvoord RJ, Hendrix HH, Kai H, Hemker HC. A chromogenic test to determine the procoagulant phospholipids in platelet-rich plasma and whole blood. *Thromb Haemost*, 1994, 72, 582-7.
366. Owens J, Lewis RM, Cantor A, Furie BC, Furie B. Monoclonal antibodies against human abnormal (des-gamma-carboxy)prothrombin specific for the calcium-free conformer of prothrombin. *J Biol Chem*, 1984, 259, 13800-5.
367. Lewis RM, Furie BC, Furie B. Conformation-specific monoclonal antibodies directed against the calcium-stabilized structure of human prothrombin. *Biochem*, 1983, 22, 948-54.
368. Arvieux J, Pouzol P, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG. Lupus-like anticoagulant properties of murine monoclonal antibodies to beta 2-glycoprotein I. *Br J Haematol*, 1992, 81, 568-73.
369. Jennings I, Mackie I, Arnout J, Preston FE. Lupus anticoagulant testing using plasma spiked with monoclonal antibodies: performance in the UK NEQAS proficiency testing programme. *J Thromb Haemost*, 2004, 2, 2178-84.
370. Arvieux J, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG. Measurement of anti-phospholipid antibodies by ELISA using beta 2-glycoprotein I as an antigen. *J Immunol Methods*, 1991, 143, 223-9.
371. Mustard JF, Perry DW, Ardlie NG, Packham MA. Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *Br J Haematol*, 1972, 22, 193-204.
372. 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.
373. Cazenave JP, Hemmendinger S, Beretz A, Sutter-Bay A, Launay J. [Platelet aggregation: a tool for clinical investigation and pharmacological study. Methodology]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 1983, 41, 167-79.
374. Reber G, Arvieux J, Comby E, Degenne D, de Moerloose P, Sanmarco M, Potron G. Multicenter evaluation of nine commercial kits for the quantitation of anticardiolipin antibodies. The Working Group on Methodologies in Haemostasis from the GEHT (Groupe d'Etudes sur l'Hemostase et la Thrombose). *Thromb Haemost*, 1995, 73, 444-52.
375. Reber G, Schousboe I, Tincani A, Sanmarco M, Kveder T, de Moerloose P, Boffa MC, Arvieux J. Inter-laboratory variability of anti-beta2-glycoprotein I measurement. A

collaborative study in the frame of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies Standardization Group. *Thromb Haemost*, 2002, 88, 66-73.

376. Regnault V, Beguin S, Lecompte T. Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003, 33, 23-9.

377. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90, 1004-8.

378. Taylor FB, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood*, 2001, 97, 1685-1688.

379. Karlsson R, Katsamba PS, Nordin H, Pol E, Myszka DG. Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal Biochem*, 2006, 349, 136-47.

380. Brighton TA, Hogg PJ, Dai YP, Murray BH, Chong BH, Chesterman CN. Beta 2-glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. *Br J Haematol*, 1996, 93, 185-94.

381. Pfueller SL, Weber S, Luscher EF. Studies of the mechanism of the human platelet release reaction induced by immunologic stimuli. III. Relationship between the binding of soluble IgG aggregates to the Fc receptor and cell response in the presence and absence of plasma. *J Immunol*, 1977, 118, 514-24.

382. Vega-Ostertag M, Harris EN, Pierangeli SS. Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheum*, 2004, 50, 2911-9.

383. Bounameaux C, Boehlen F, Membre A, Genne D, Pouplard C, Regnault V, de Moerloose P. Heparin-induced thrombocytopenia associated with interleukin-8-dependent platelet activation in a patient with antiphospholipid syndrome. *Eur J Haematol*, 2007, 79, 550-3.

384. Daiss JL, Scalice ER. Epitope Mapping on BIAcore: Theoretical and Practical Considerations. *Methods: a companion to methods in enzymology*, 1994, 6, 143.

385. Membre A, Wahl D, Latger-Cannard V, Max JP, Lecompte T, Lacolley P, Regnault V. Platelet activation reinforces the procoagulant phenotype induced by murine monoclonal anti-phospholipid antibodies. *Haematologica*, 2008 (In press).

386. Galli M, Borrelli G, Jacobsen EM, Marfisi RM, Finazzi G, Marchioli R, Wisloff F, Marziali S, Morboeuf O, Barbui T. Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WAPS (warfarin in the antiphospholipid syndrome) study. *Blood*, 2007, 110, 1178-83.

387. Martinuzzo ME, Maclouf J, Carreras LO, Levy-Toledano S. Antiphospholipid antibodies enhance thrombin-induced platelet activation and thromboxane formation. *Thromb Haemost*, 1993, 70, 667-71.

388. Holmsen H, Day HJ. Biochemistry and physiology of blood platelets. *Ann Clin Lab Sci*, 1971, 1, 38-47.

389. Galli M, Grassi A, Barbui T. Platelet-derived microvesicles in patients with anti-phospholipid antibodies. *Thromb Haemost*, 1993, 69, 541.
390. Nagahama M, Nomura S, Kanazawa S, Ozaki Y, Kagawa H, Fukuhara S. Significance of anti-oxidized LDL antibody and monocyte-derived microparticles in anti-phospholipid antibody syndrome. *Autoimmunity*, 2003, 36, 125-31.
391. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, Perez C, Saez C, Panes O, Matus V, Mezzano D. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost*, 2006, 95, 94-9.
392. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol*, 2001, 115, 451-9.
393. Osumi K, Ozeki Y, Saito S, Nagamura Y, Ito H, Kimura Y, Ogura H, Nomura S. Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost*, 2001, 85, 326-30.
394. Atsumi T, Caliz R, Amengual O, Khamashta MA, Hughes GR. Fcγ receptor IIA H/R131 polymorphism in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*, 1998, 79, 924-7.
395. Pennings MT, Derksen RH, van Lummel M, Adelmeijer J, Vanhoorelbeke K, Urbanus RT, Lisman T, de Groot PG. Platelet adhesion to dimeric beta2-Glycoprotein-I under conditions of flow is mediated by at least two receptors: glycoprotein Iα and APOER2'. *J Thromb Haemost*, 2006.
396. Stouffer GA, Smyth SS. Effects of thrombin on interactions between beta3-integrins and extracellular matrix in platelets and vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23, 1971-8.
397. Byzova TV, Plow EF. Networking in the hemostatic system. Integrin αIIbβ3 binds prothrombin and influences its activation. *J Biol Chem*, 1997, 272, 27183-8.
398. Hanly JG, Smith SA. Anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies, in vitro thrombin generation, and the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*, 2000, 27, 2152-9.
399. Taube J, McWilliam N, Luddington R, Byrne CD, Baglin T. Activated protein C resistance: effect of platelet activation, platelet-derived microparticles, and atherogenic lipoproteins. *Blood*, 1999, 93, 3792-7.
400. Camire RM, Kalafatis M, Simioni P, Girolami A, Tracy PB. Platelet-derived factor Va/Va Leiden cofactor activities are sustained on the surface of activated platelets despite the presence of activated protein C. *Blood*, 1998, 91, 2818-29.
401. van 't Veer C, Golden NJ, Kalafatis M, Mann KG. Inhibitory mechanism of the protein C pathway on tissue factor-induced thrombin generation. Synergistic effect in combination with tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem*, 1997, 272, 7983-94.

402. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PL, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica*, 2003, 88, 547-54.
403. Vanschoonbeek K, Feijge MA, Keuren JF, Coenraad Hemker H, Lodder JJ, Hamulyak K, van Pampus EC, Heemskerk JW. Thrombin-induced hyperactivity of platelets of young stroke patients: involvement of thrombin receptors in the subject-dependent variability in Ca²⁺ signal generation. *Thromb Haemost*, 2002, 88, 931-7.
404. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, Ataulakhanov FI. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost*, 2007, 97, 425-34.
405. Dachary-Prigent J, Toti F, Satta N, Pasquet JM, Uzan A, Freyssinet JM. Physiopathological significance of catalytic phospholipids in the generation of thrombin. *Semin Thromb Hemost*, 1996, 22, 157-64.
406. Wielders SJ, Ungethum L, Reutelingsperger CP, Bevers EM, Lindhout T. Factor Xa-driven thrombin generation in plasma: dependency on the aminophospholipid density of membranes and inhibition by phospholipid-binding proteins. *Thromb Haemost*, 2007, 98, 1056-62.
407. Dargaud Y, Luddington R, Baglin T. Platelet-dependent thrombography: a method for diagnostic laboratories. *Br J Haematol*, 2006, 134, 323-5.
408. Keuren JF, Magdeleyns EJ, Govers-Riemslog JW, Lindhout T, Curvers J. Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. *Br J Haematol*, 2006, 134, 307-13.
409. Jane SM, Mitchell CA, Hau L, Salem HH. Inhibition of activated protein C by platelets. *J Clin Invest*, 1989, 83, 222-6.
410. Dargaud Y, Trzeciak MC, Bordet JC, Ninet J, Negrier C. Use of calibrated automated thrombinography +/- thrombomodulin to recognise the prothrombotic phenotype. *Thromb Haemost*, 2006, 96, 562-7.
411. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res*, 2004, 114, 539-45.
412. Oosting JD, Derksen RH, Hackeng TM, van Vliet M, Preissner KT, Bouma BN, de Groot PG. In vitro studies of antiphospholipid antibodies and its cofactor, beta 2-glycoprotein I, show negligible effects on endothelial cell mediated protein C activation. *Thromb Haemost*, 1991, 66, 666-71.
413. Galli M, Ruggeri L, Barbui T. Differential effects of anti-beta2-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies on the anticoagulant activity of activated protein C. *Blood*, 1998, 91, 1999-2004.
414. Field SL, Chesterman CN, Hogg PJ. Dependence on prothrombin for inhibition of activated protein C activity by lupus antibodies. *Thromb Haemost*, 2000, 84, 1132-3.

415. Matsuda J, Gotoh M, Gohchi K, Kawasugi K, Tsukamoto M, Saitoh N. Resistance to activated protein C activity of an anti-beta 2-glycoprotein I antibody in the presence of beta 2-glycoprotein I. *Br J Haematol*, 1995, 90, 204-6.
416. Butenas S, van't Veer C, Mann KG. "Normal" thrombin generation. *Blood*, 1999, 94, 2169-78.
417. Bakker HM, Tans G, Janssen-Claessen T, Thomassen MC, Hemker HC, Griffin JH, Rosing J. The effect of phospholipids, calcium ions and protein S on rate constants of human factor Va inactivation by activated human protein C. *Eur J Biochem*, 1992, 208, 171-8.
418. Smirnov MD, Esmon CT. Phosphatidylethanolamine incorporation into vesicles selectively enhances factor Va inactivation by activated protein C. *J Biol Chem*, 1994, 269, 816-9.
419. Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*, 1990, 76, 1-16.
420. McDonald JF, Shah AM, Schwalbe RA, Kisiel W, Dahlback B, Nelsestuen GL. Comparison of naturally occurring vitamin K-dependent proteins: correlation of amino acid sequences and membrane binding properties suggests a membrane contact site. *Biochem*, 1997, 36, 5120-7.
421. Sanmarco M, Gayet S, Alessi MC, Audrain M, de Maistre E, Gris JC, de Groot PG, Hachulla E, Harle JR, Sie P, Boffa MC. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*, 2007, 97, 949-54.
422. Erkan D, Harrison MJ, Levy R, Peterson M, Petri M, Sammaritano L, Unalp-Arida A, Vilela V, Yazici Y, Lockshin MD. Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals. *Arthritis Rheum*, 2007, 56, 2382-91.
423. Asherson RA, Espinosa G, Menahem S, Yin H, Bucciarelli S, Bosch X, Cervera R. Relapsing Catastrophic Antiphospholipid Syndrome: Report of Three Cases. *Semin Arthritis Rheum*, 2007.
424. Ubrich N, Rivat C, Vigneron C, Maincent P. Microporous microparticles designed as stable immunoadsorbents. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 58, 581-6.
425. Cockerill KA, Smith E, Jones DS, Branks MJ, Hayag M, Victoria EJ, Linnik MD, Campbell MA. In vivo characterization of bioconjugate B cell toleragens with specificity for autoantibodies in antiphospholipid syndrome. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3, 1667-75.
426. Cockerill KA, Iverson GM, Jones DS, Linnik MD. Therapeutic potential of toleragens in the management of antiphospholipid syndrome. *BioDrugs*, 2004, 18, 297-305.

ANNEXES

**LISTE
DES
FIGURES**

<i>Figure 1 : Caractéristiques ultrastructurales d'une plaquette.</i>	2
<i>Figure 2 : Schéma de la membrane plaquettaire.</i>	3
<i>Figure 3 : Répartition asymétrique des phospholipides au niveau de la membrane plaquettaire.</i>	4
<i>Figure 4 : Structure schématique d'un vaisseau [10].</i>	9
<i>Figure 5 : Etapes de l'activation plaquettaire.</i>	10
<i>Figure 6 : Plaquettes non activées et plaquettes formant des pseudopodes (flèches) en microscopie électronique à balayage.</i>	11
<i>Figure 7 : Structure schématique du complexe GpIIbIIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) au repos (A et B) et activé (B).</i>	12
<i>Figure 8 : (A) et (B) Structure schématique du fibrinogène et site de clivage par la thrombine.</i>	13
<i>Figure 9 : Mécanisme d'agrégation plaquettaire.</i>	14
<i>Figure 10 : Métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes et rôle d'inhibiteurs plaquettaires.</i>	15
<i>Figure 11 : Métabolisme de la sécrétion plaquettaire lors de la liaison d'agonistes activateurs à fortes concentrations sur leurs récepteurs plaquettaires.</i>	16
<i>Figure 12 : Représentation schématique du « flip-flop » membranaire conduisant à l'expression de phospholipides anioniques et procoagulants à la surface plaquettaire.</i>	17
<i>Figure 13 : Inhibiteurs de l'activation plaquettaire.</i>	18
<i>Figure 14 : (A) Carboxylation des protéines vitamine K dépendantes. (B) Complexes formés de protéines vitamine K dépendantes se liant aux phospholipides anioniques.</i>	25
<i>Figure 15 : Structures schématiques des facteurs vitamine K dépendants. En haut : FII, en bas : FVII, FIX et FX.</i>	25
<i>Figure 16 : Cascade de la coagulation.</i>	27
<i>Figure 17 : Phase d'initiation de la coagulation.</i>	28
<i>Figure 18 : Phase d'amplification et de propagation de la coagulation.</i>	29
<i>Figure 19 : Polymérisation de la fibrine.</i>	29
<i>Figure 20 : Représentation schématique de la protéine C, protéine S, la thrombomoduline (TM) et l'EPCR [101].</i>	31
<i>Figure 21 : Représentation en 3D du complexe thrombine-TM-PC-EPCR.</i>	33
<i>Figure 22 : Structure de la protéine S et ses sites de liaison avec la C₄BP et la protéine C activée [103].</i>	34
<i>Figure 23 : Régulation de la coagulation par le système de la protéine C.</i>	35

<i>Figure 24 : Représentation schématique (A) de la structure du FV et de ses sites de clivage par la thrombine (B) de l'inactivation protéolytique du FVa par la PCa.</i>	<i>36</i>
<i>Figure 25 : Représentation schématique (A) de la structure du FVIII et de ses sites de clivage par la thrombine (B) de l'inactivation protéolytique du FVIIIa par la PCa.</i>	<i>37</i>
<i>Figure 26 : Thrombinogramme typique obtenu en présence d'un plasma riche en plaquettes.</i>	<i>40</i>
<i>Figure 27 : Paramètres du thrombinogramme.</i>	<i>42</i>
<i>Figure 28 : Détermination de la concentration en PCa induisant une réduction de 50 % de l'ETP : IC₅₀-PCa [7].</i>	<i>42</i>
<i>Figure 29 : Exemples de thrombinogrammes de patients.</i>	<i>43</i>
<i>Figure 30 : Représentations structurales de la β_2GPI.</i>	<i>48</i>
<i>Figure 31 : Interférence de la β_2GPI avec la voie endogène de la coagulation et du système de la fibrinolyse.</i>	<i>49</i>
<i>Figure 32 : Représentation schématique du FII et de ses produits d'activation</i>	<i>51</i>
<i>Figure 33 : Comparaison de l'affinité pour les membranes phospholipidiques de la β_2GPI, du FII et de facteurs de la coagulation.</i>	<i>52</i>
<i>Figure 34 : Mécanisme proposé par lequel les aPL anti-β_2GPI sont LA [1].</i>	<i>58</i>
<i>Figure 35 : Mécanisme d'action des complexes anti-β_2GPI/β_2GPI se liant au récepteur ApoER2'</i>	<i>63</i>
<i>Figure 36 : Mécanisme d'action des complexes anti-β_2GPI/β_2GPI se liant à la sous-unité GPIbα du récepteur GPIb/IX/V plaquettaire [2].</i>	<i>63</i>
<i>Figure 37 : Protocole pour la mesure de l'activité procoagulante des phospholipides.</i>	<i>78</i>
<i>Figure 38 : Méthodes de préparation de spécimens plasmatiques : PRP et PRPcd.</i>	<i>80</i>
<i>Figure 39 : Méthodes de préparation de PPP 13000 g.</i>	<i>82</i>
<i>Figure 40 : Protocole pour une étude en thrombinographie.</i>	<i>84</i>
<i>Figure 41 : Paramètres thrombinographiques : ETP et IC₅₀-PCa.</i>	<i>85</i>
<i>Figure 42 : Spécimens plasmatiques étudiés en thrombinographie.</i>	<i>94</i>
<i>Figure 43 : Influence de l'addition de PCa en thrombinographie.</i>	<i>95</i>
<i>Figure 44 : Influence de l'addition de TM en thrombinographie.</i>	<i>96</i>
<i>Figure 45 : Plaquettes en PRP observées en microscopie électronique à balayage.</i>	<i>96</i>
<i>Figure 46 : Microvésicules plaquettaires observées en microscopie électronique à balayage.</i>	<i>97</i>
<i>Figure 47 : Influence de la présence de VP à différentes concentrations ajoutées à du PPP 13000 g en thrombinographie.</i>	<i>100</i>

<i>Figure 48 : Capacité des VP à servir de surface phospholipidique pour la coagulation du PPP 13000 g en absence et présence de PCa par comparaison au PRPcd.</i>	101
<i>Figure 49 : Influence de la présence de MVP à différentes concentrations ajoutées à du PPP 13000 g en thrombinographie.</i>	102
<i>Figure 50 : Capacité des MVP à servir de surface phospholipidique pour la coagulation du PPP 13000 g en absence et présence de PCa par comparaison au PRPcd.</i>	103
<i>Figure 51 : Influence du spécimen plasmatique sur l'effet activateur plaquettaire d'ALB6.</i>	103
<i>Figure 52 : Influence du polymorphisme du FcγRIIa sur l'effet activateur plaquettaire d'ALB6.</i>	104
<i>Figure 53 : Influence d'une activation plaquettaire sur la sensibilité à la PCa.</i>	105
<i>Figure 54 : Effet d'auto-anticorps aPL sur l'activité de la thrombine générée en absence (A) et en présence de PCa à 13,9 nM (B).</i>	106
<i>Figure 55 : Sensibilité à la PCa en présence d'auto-anticorps humains.</i>	107
<i>Figure 56 : Effet d'IgGm en thrombinographie.</i>	108
<i>Figure 57 : Sensibilité à la PCa en présence d'AcMm dirigés contre le FII et la β₂GPI.</i>	109
<i>Figure 58 : Liaison des AcMm et de leur antigène sur des plaquettes lavées humaines immobilisées sur un biocapteur LI.</i>	111
<i>Figure 59 : Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) induite par les antigènes seuls et les AcMm, seuls ou en présence de leur antigène.</i>	112
<i>Figure 60 : Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) en fonction des donneurs.</i>	113
<i>Figure 61 : Comparaison de l'effet activateur plaquettaire d'AcMm avec des auto-anticorps humains.</i>	117
<i>Figure 62 : Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) induite par des anticorps anti-IL8 contenus dans le sérum de la patiente n°5 en présence d'IL8 ± héparine.</i>	118
<i>Figure 63 : Influence de l'interférence des AcMm avec les réactions pro- et anticoagulantes.</i>	120
<i>Figure 64 : Influence de la composition en phospholipides sur l'interférence avec les réactions pro et anti-coagulantes.</i>	121
<i>Figure 65 : Influence de l'effet activateur plaquettaire des AcMm sur l'activité de la thrombine générée.</i>	123
<i>Figure 66 : Influence de la composition en phospholipides sur le thrombinogramme.</i>	130

<i>Figure 67 : Sensibilité de l'ETP à la PCa en présence de différentes surfaces phospholipidiques ajoutées à du PPP 13000 g de deux donneurs (A) et (B).</i>	132
<i>Figure 68 : Cinétiques de liaison du FII à différentes surfaces phospholipidiques.</i>	134
<i>Figure 69 : Comparaison de la liaison du FII à différentes surfaces phospholipidiques immobilisées sur un biocapteur LI.</i>	135
<i>Figure 70 : Cinétiques de liaison de la PCa à différentes surfaces phospholipidiques.</i>	136
<i>Figure 71 . Comparaison de la liaison de la PCa à différentes surfaces phospholipidiques immobilisées sur un biocapteurLI.</i>	136
<i>Figure 72 : Effet de la composition en phospholipides sur la génération de thrombine.</i> ..	139
<i>Figure 73 : Inactivation du FVa par la PCa en absence ou présence de PS et en présence de surface phospholipidique.</i>	141
<i>Figure 74 : Effet de la composition en surface phospholipidique sur l'inactivation du FVa par la PCa en présence de protéine S.</i>	142
<i>Figure 75 : Carte épitopique des AcMm anti-β_2GPI dirigés contre le domaine I de la β_2GPI.</i>	147
<i>Figure 76 : Cinétiques d'interaction entre l'AcMm 28F4 et le FII sur un biocapteur CM5.</i>	148
<i>Figure 77 : Proposition de mécanismes pour expliquer l'effet activateur plaquettaire par les aPL.</i>	155
<i>Figure 78 : Proposition de mécanisme par lequel les deux AcMm interfèrent avec l'activité de la thrombine générée.</i>	164

**LISTE
DES
TABLEAUX**

<i>Tableau I : Composition en phospholipides de la membrane plaquettaire.....</i>	<i>4</i>
<i>Tableau II : Composition en phospholipides exposés à la surface de la membrane plaquettaire lors de l'activation de plaquettes lavées par différents agonistes.</i>	<i>5</i>
<i>Tableau III : Principales glycoprotéines plaquettaires transmembranaires.</i>	<i>6</i>
<i>Tableau IV : Principales substances contenues dans les granules intraplaquettaires.....</i>	<i>7</i>
<i>Tableau V : Les protéines plasmatiques de la coagulation et leurs principaux inhibiteurs. 24</i>	
<i>Tableau VI : Activation des zymogènes en fonction de la présence ou non de constituants des complexes de la coagulation.</i>	<i>26</i>
<i>Tableau VII : Anticorps détectés dans les tests aPL conventionnels [3].</i>	<i>45</i>
<i>Tableau VIII : Critères de classification révisés du syndrome des anti-phospholipides (critères de Sydney) [189].</i>	<i>46</i>
<i>Tableau IX : Avidité de la β_2GPI pour les phospholipides.</i>	<i>50</i>
<i>Tableau X : Mécanismes possibles pour expliquer l'hypercoagulabilité associée au syndrome des anti-phospholipides.</i>	<i>56</i>
<i>Tableau XI : Caractéristiques des AcMm.</i>	<i>69</i>
<i>Tableau XII : Dosage du FT.....</i>	<i>93</i>
<i>Tableau XIII : Mesure de la quantité de phospholipides procoagulants présents dans le PPP 13000 g en fonction du protocole de préparation.</i>	<i>98</i>
<i>Tableau XIV : Mesure de la quantité de phospholipides procoagulants apportés par les différents spécimens plasmatiques.....</i>	<i>99</i>
<i>Tableau XV : Influence des AcMm en thrombinographie sur un autre volontaire sain. ..</i>	<i>110</i>
<i>Tableau XVI : Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) en fonction de la concentration en plaquettes.</i>	<i>114</i>
<i>Tableau XVII : Comparaison de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) induite par les AcMm en présence de PRP.</i>	<i>115</i>
<i>Tableau XVIII : Caractéristiques des patients.....</i>	<i>116</i>
<i>Tableau XIX : Influence de la concentration en AcMm sur l'activité de la thrombine générée.</i>	<i>124</i>
<i>Tableau XX : Effet de la concentration de différents inhibiteurs plaquettaires sur l'activité de la thrombine générée.</i>	<i>127</i>
<i>Tableau XXI : Effet de différents inhibiteurs plaquettaires sur l'activité de la thrombine générée.</i>	<i>128</i>
<i>Tableau XXII : Influence de la composition en phospholipides sur les paramètres thrombinographique.....</i>	<i>131</i>

<i>Tableau XXIII : Constantes cinétiques d'interaction (k_{on}, k_{off} et K_D) du FII et de la PCa avec différentes surfaces cellulaires immobilisées sur un biocapteur L1.</i>	<i>137</i>
<i>Tableau XXIV : Interaction de la β_2GPI avec les AcMm – ratios molaires des interactions par paires d'AcMm.</i>	<i>145</i>
<i>Tableau XXV : Interaction de la β_2GPI avec les AcMm – pourcentage de fixation du deuxième anticorps après fixation du premier sur la β_2GPI immobilisée sur un biocapteur CM5.</i>	<i>146</i>
<i>Tableau XXVI : Caractéristiques cinétiques de liaison des AcMm à leur cible immobilisée par couplage covalent.</i>	<i>150</i>

ARTICLES
ET
COMMUNICATIONS

Articles

Membre A, Wahl D, Latger-Cannard V, Max JP, Lecompte T, Lacolley P, Regnault V : Platelet activation reinforces the procoagulant phenotype induced by murine monoclonal anti-phospholipid antibodies. *Haematologica*, 2007

Bounameaux C, Boehlen F, Membre A, Genne D, Pouplard C, Regnault V, de Moerloose P. Heparin-induced thrombocytopenia associated with interleukin-8-dependent platelet activation in a patient with antiphospholipid syndrome. *Eur J Haematol*, 2007, 79, 550-553.

Membre A, Wahl D, Lecompte T, Regnault V. Test de génération de thrombine La thrombinographie : méthodologie. *Revue francophone des laboratoires*. 2007 ; 393 : 37-43

Wahl D, Saadi L, Perret-Guillaume C, Membre A, Frederic M, Devignes J, Blum A, Thiebaugeorges O, Regnault V, Lecompte, T. Syndrome des antiphospholipides. Classification actuelle et indications thérapeutiques. *Revue médecine thérapeutique*. 2007 ; 13 : 111-121

Communications

à des congrès nationaux et internationaux

Membré A, Wahl D, Max JP, Lacolley P, Regnault V. Platelet activation reinforces the procoagulant phenotype induced by murine monoclonal anti-phospholipid antibodies. XXI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Geneve, 6-12 juillet 2007. *In : J Thromb Haemost, 2007, 5, suppl 2, P-T-429*

Membré A, Trossaert M, Max JP, Brunette A, Kis A, Lecompte T, Regnault V. Influence of phospholipid surface and concentration in thrombography. XXI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Geneve, 6-12 juillet 2007. *In : J Thromb Haemost, 2007, 5, suppl 2, P-W-020*

Kearney-Schwartz A, Benetos A, Membré A, Lecompte T, Max JP, Labat C, Thornton S, Lacolley P, Regnault V. Age-dependent increased arterial stiffness is associated with composite changes in pro- and anti-coagulant reactions in subclinical atherosclerosis. XXI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Geneve, 6-12 juillet 2007. *In : J Thromb Haemost, 2007, 5, suppl 2, P-M-384*

Membré A, Regnault V, Max JP, Wahl D, Lecompte T. Murine monoclonal antibodies to phospholipid binding proteins interfere with protein C system on platelet surface. 11th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Sydney, 14-18 novembre 2004. *In : Thromb Res, 2004, 114, 664-665.*

Regnault V, Béguin S, Wahl D, de Maistre E, Membré A, Hemker HC, Lecompte T. Increased thrombin potential due to acquired activated protein C resistance in patients with lupus anticoagulants. XIX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, 12-18 juillet 2003. *In : J Thromb Haemost, 2003, suppl, P1536*

Membre A, Bounameaux C, Pouplard C, Boehlen F, Regnault V, de Moerloose P. Thrombopénie induite par l'héparine associée à une activation plaquettaire IL8-dépendante chez un patient atteint du syndrome des anti-phospholipides. Réunion du Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT) de la Société Française d'Hématologie, Lille, 18-19 octobre 2007.

Kearney-Schwartz A, Membré A, Benetos A, Lecompte T, Thornton S, Lacolley P, Regnault V. L'augmentation de la rigidité artérielle avec l'age est associée à des changements complexes des réactions pro- et anti-coagulantes dans l'athérosclérose précoce Réunion du Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT) de la Société Française d'Hématologie, Paris, 5-6 octobre 2006.

Wahl D, Regnault V, Béguin S, de Maistre E, Membré A, Perret-Guillaume C, Kaminsky P, Hemker HC, Lecompte T. Increased thrombin potential due to acquired activated protein C resistance: a possible mechanism for venous thromboembolism in patients with lupus anticoagulants. Vascular Medicine 2003, Toulouse, 8-10 octobre 2003.

Regnault V, Membré A, Béguin S, Wahl D, de Maistre E, Hemker HC, Lecompte T. Etude par thrombinographie de la résistance à la protéine C activée chez des malades ayant des anticorps dits antiphospholipides. Réunion du Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT) de la Société Française d'Hématologie, Paris, 9-10 octobre 2002.

Résumé

L'objectif était d'identifier le ou le(s) mécanismes contribuant à l'hypercoagulabilité associée aux anticorps anti-phospholipides. L'activation plaquettaire induite par les anticorps ainsi que l'interférence des complexes anticorps/antigène avec les réactions dépendantes des phospholipides ont été étudiées. Des anticorps monoclonaux murins dirigés contre la β_2 -glycoprotéine I et la prothrombine ont été utilisés comme modèle des anticorps anti-phospholipides. Les résultats obtenus montrent que ces anticorps ont un effet anticoagulant qui se traduit par une diminution de la génération de thrombine et un effet procoagulant qui se traduit par une inhibition de l'activité de la protéine C activée. Ces anomalies surviennent indépendamment de l'activation plaquettaire. La résultante globale est une hypercoagulabilité. Une activation plaquettaire, suffisamment intense, augmente la quantité de phospholipides procoagulants et neutralise partiellement l'effet anticoagulant des anticorps anti-phospholipides. Ainsi, l'activation plaquettaire contribue à renforcer l'hypercoagulabilité due à la résistance à la protéine C activée. Les complexes anticorps/antigène interfèrent avec les complexes pro- et anticoagulants au niveau des surfaces plaquettaires. Les avidités respectives de chacun des partenaires étudiés pour les surfaces phospholipidiques participent aux mécanismes conduisant à l'hypercoagulabilité associée aux anticorps anti-phospholipides.

Mots clés : anticorps anti-phospholipides, génération de thrombine, résistance à la protéine C activée, activation plaquettaire, anticorps monoclonaux murins

Summary

The objective was to identify the mechanisms which contribute to the hypercoagulability associated with anti-phospholipid antibodies. Antibody-mediated platelet activation and interference of antibodies with phospholipid-dependent reactions were investigated. Murine monoclonal antibodies directed against β_2 -glycoprotein I and prothrombin were used as model of anti-phospholipid antibodies. An anticoagulant effect, evidenced by impairment of thrombin generation and a procoagulant effect, by inhibition of activated protein C activity were shown. These phenomena occurs independently of platelet activation. The overall result was hypercoagulability. When immune-mediated platelet activation is sufficiently intense, it increases the amount of procoagulant phospholipids and antagonizes partially the anticoagulant effect of anti-phospholipid antibodies. Thus platelet activation contributes to reinforce the hypercoagulability due to activated protein C resistance. The antibody/antigen complexes interfere with pro- and anticoagulant complexes to the platelet surfaces. The avidity of each studied partners for the phospholipid surfaces take part in the mechanisms leading to hypercoagulability associated with antiphospholipid antibodies.

Keywords : anti-phospholipid antibody, thrombin generation, activated protein C resistance, platelet activation, murine monoclonal antibodies

Nom : **Mademoiselle MEMBRE**

Prénom : **Aurélie**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : **BIOLOGIE CELLULAIRE ET NUTRITION**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°

Nancy, le *24 avril 2008*

Le Président de l'Université



Jean-Pierre FINANCE