

**UNIVERSITE SORBONNE PARIS CITE**

UNIVERSITE PARIS DIDEROT

ECOLE DOCTORALE

HEMATOLOGIE ONCOGENESE ET BIOTHERAPIES (HOB)

Unité de recherche Inserm U1148

**DOCTORAT**

Pathologie cardiovasculaire

**Intérêt de la vectorisation du t-PA au thrombus.**

**Exemple du Fucoïdan aminé**

**Radouane GHEBOULI**

Thèse dirigée par le Dr Jean-Baptiste MICHEL

Soutenue le : 20 Décembre 2016

**JURY**

Pr. PLOTKINE Michel

Président du jury

Pr. SUSEN Sophie

Rapporteur

Dr. OURY Cécile

Rapporteur

Dr. PARCQ Jérôme

Examineur

Dr. MICHEL Jean-Baptiste

Directeur de thèse



## Remerciements

Au terme de cette thèse, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont participé à ce travail, de près ou de loin, qui m'ont aidé et qui m'ont soutenu tout au long :

- **Jean-Baptiste Michel** pour m'avoir fait confiance dès notre premier entretien et pour m'avoir confié ce projet de recherche passionnant. Je te remercie pour ton encadrement, pour ton suivi assidu et l'habileté avec laquelle tu as su me guider.
- **Stéphane Loyau**, pour ses précieux conseils et son aide capitale tout au long du travail.
- **Didier Letourneur** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.
- Mes deux rapporteurs, **Pr Sophie Susen** et **Dr Cécile Oury** pour avoir accepté d'examiner mon manuscrit
- **Dr Jérôme Parcq** et au **Pr Michel Plotkine** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.
- **Frédéric Chaubet**, **Murielle Maire** et **Pierre Saboural**, responsables de l'élaboration du Fucoïdan et sans qui ce projet n'aurait pu aboutir.
- **Benoît Ho Ti Noé** pour m'avoir transmis son savoir-faire
- **Liliane Louedec** « la maman bienveillante », **Asma** « la grande sœur » et **Moddy** pour votre constante présence et pour votre sympathie.
- **Christine**, **Véronique A**, **Catherine**, **Marie Paul**, **Marie Sylvie**, **Sonia**, **Hadidja**, **Marie Christine**, **Martine**, **Mathilde**, **Véronique O**, **Yacine** et **Benjamin**, pour avoir toujours été disponible en cas de questions.
- Mes frérots du « BUREAU DES LEGENDES » avec qui j'ai passé les meilleurs moments au labo: **Alexy**, **Ziad**, **le commissaire Mansour**, **Nuzzo**, **Thang** et **Harry**. Les frérots je ne vous oublierai jamais.

- Mes collègues de laboratoire qui par le temps sont devenus des amis : **Kamel, Varouna, Adrian, Angel, Nico, karen, Chabha, Devy, Sophie, Lamia, Clément, Audrey, Sandrine, Kristel, Marie Anne, Francesco, Kevin, Leila, Soumaya et Agath**, pour avoir su détendre l'atmosphère même dans les moments les plus difficiles.

- Mes camarades de campus langue : **Nabil, Eva, Bab's, Ali, Roxane, Yften, Djamel, Minh Than**, et **Andrea**, pour toutes les après-midi passés en votre agréable compagnie.

- Mes amis : **Amina, Sarah, Mylène, Alexandre, Rita, Sylvain, Po, Nathalie, Aline, Emilie, Olivier, Jean, Myriam, Nicolas** et **Audrey**, pour tous les bons moments partagés.

- **Féloussi** (qui se reconnaîtra) pour toute l'affection et l'amour dont tu m'as témoigné.

- Mon cousin **Saad** qui a toujours été présent. Les mots me manquent pour t'exprimer ma gratitude.

- Mes parents (**Norah** et **Abdel Hamid**) pour leur amour, leur soutien inconditionnel et pour avoir su m'inculquer les valeurs nécessaires pour affronter les défis de la vie et atteindre mes objectifs.

- Mes frères et sœurs : **Adel, Fouad, Houda, Samira, Hiba**, et **Seif** qui ont su me revigorer dans les moments difficiles. Je vous aime.

# SOMMAIRE

<b>Figures</b> .....	8
<b>Tables</b> .....	9
<b>Abréviations</b> .....	9
<b>Avant-propos</b> .....	11
<b>RESUME</b> .....	12
<b>PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	13
CHAPITRE I : L'Hémostase.....	14
I. Les plaquettes sanguines .....	15
1. Généralités.....	15
2. Structure des plaquettes.....	16
A. La membrane plasmique .....	16
B. Le cytosquelette .....	17
C. Les organites et granules .....	18
3. Plaquettes sanguines et lésion vasculaire : rôle de l'hémostase.....	20
A. Adhérence plaquettes - paroi vasculaire .....	20
a. Structure de la paroi vasculaire .....	20
b. Adhérence plaquettes - vWF .....	22
i. Le vWF.....	22
ii. La GPIb $\alpha$ .....	23
c. Adhérences stables : plaquettes – collagène.....	25
i. Le collagène .....	25
ii. La GPVI .....	25
iii. L'intégrine $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (GPIaIIa) .....	27
d. Adhérence aux autres structures sous-endothéliales .....	27
B. Activation et sécrétion plaquettaire.....	28
a. Changement de forme des plaquettes .....	28
b. Sécrétion et recrutement.....	28
i. La voie des récepteurs purinergique (P2Y).....	28
ii. La voie du thromboxanes A <sub>2</sub> (TxA <sub>2</sub> ).....	29
iii. Activation des plaquettes par la thrombine (FIIa).....	30
C. Agrégation plaquettaire .....	31
a. $\alpha$ IIb $\beta$ 3 .....	31
b. Le Fibrinogène (Fg) .....	32
4. Activité pro-coagulante des plaquettes .....	33
II. Activation de la coagulation, trapping des globules rouges et consolidation du thrombus.....	34
1. Le facteur tissulaire (FT).....	34
2. Régulation de la coagulation .....	35
Chapitre II : La Fibrinolyse.....	37
I. Les acteurs de la fibrinolyse.....	38
1. Plasminogène-plasmine .....	38
2. Les activateurs physiologiques du plasminogène .....	40
A. L'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) .....	40
B. Le système pro-urokinase (pro u-PA)/urokinase (u-PA) .....	43

C. u-PAR.....	43
3. Les inhibiteurs de la fibrinolyse.....	45
A. Les inhibiteurs des activateurs du plasminogène.....	45
a. PAI-1 .....	45
b. PAI-2 .....	46
c. La protéase nexine-1 (PN-1).....	46
d. La neuroserpine .....	47
B. Les inhibiteurs de la plasmine.....	47
a. L'α2-antiplasmine .....	47
b. L'α2 macroglobuline.....	48
c. Le TAFI ( <i>Thrombin-Activatable Fibrinolyses Inhibitor</i> ) .....	48
d. HRGP ( <i>histidin rich glycoprotéine</i> ).....	48
Chapitre III : Complications thrombotiques.....	49
I. La thrombolyse thérapeutique.....	51
II. Les Utilisations cliniques actuelles du rt-PA .....	52
1. Accident vasculaire cérébrale ischémique .....	53
A. Traitement des AVC ischémiques .....	54
B. Limites de la thrombolyse IV par le rt-PA.....	54
2. Infarctus du myocarde (IDM) .....	55
A. Traitement de l'IDM .....	56
B. Limites de la thrombolyse IV par le rt-PA.....	56
3. Embolie pulmonaire (EP).....	56
A. Traitement de l'EP .....	57
B. Limites de la thrombolyse IV par le rt-PA.....	57
Chapitre IV : Ciblage moléculaire du thrombus .....	58
I. La P-sélectine : une cible potentielle ?.....	58
1. Structure .....	59
2. Rôle de la P- sélectine dans l'immunité innée, l'athérosclérose et la thrombose .....	60
3. Les ligands de la P-sélectine .....	60
Chapitre V : Le Fucoïdane .....	62
1. Structure et composition.....	62
2. Activités biologiques des Fucoïdanes .....	63
3. Affinité pour la P-sélectine .....	63
Chapitre VI : Modèles de thromboses expérimentales <i>in vivo</i> .....	65
I. Modèles de thromboses expérimentales chez la souris .....	65
1. Lésion mécanique et électrique .....	65
2. Lésion au Chlorure de Fer (FeCl <sub>3</sub> ) .....	65
3. Lésion photochimique .....	67
4. Lésion par exposition laser.....	68
5. Sténose de la veine cave inférieure .....	69
II. Avantages et limites des modèles animaux .....	70
<b>DEUXIEME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX.....</b>	<b>72</b>
<b>TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>115</b>
<b>ANNEXE : BREVET .....</b>	<b>129</b>



## Figures

**Figure 1 :** La triade de Virchow

**Figure 2 :** Schéma et image en microscopie électronique à transmission d'une plaquette sanguine au repos

**Figure 3 :** Changement de morphologie des plaquettes lors de leur activation

**Figure 4 :** Schéma de la paroi vasculaire

**Figure 5 :** Complexe GPIb-IX-V

**Figure 6 :** Complexe GPVI- FcR $\gamma$

**Figure 7 :** Schéma des récepteurs plaquettaires

**Figure 8 :** Structure et activation de l'  $\alpha$ IIb $\beta$ 3

**Figure 9 :** Voies de coagulation et régulation

**Figure 10 :** Schéma de la fibrinolyse

**Figure 11 :** Structure du plasminogène

**Figure 12 :** L'activateur tissulaire du plasminogène

**Figure 13 :** L'urokinase

**Figure 14 :** Recommandation du rt-PA dans la clinique

**Figure 15 :** Accident vasculaire cérébral ischémique

**Figure 16 :** Infarctus du myocarde

**Figure 17 :** Embolie pulmonaire

**Figure 18 :** Structure schématique des sélectines

**Figure 19 :** Structure schématique du PSGL-1, ligand naturel de la P-sélectine

**Figure 20 :** Algue brune de l'espèce *Fucus vesiculosus*

**Figure 21 :** Exemples de structures répétitives de fractions de Fucoïdanes (*Fucus serratus*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus évanescens* C. Ag)

**Figure 22 :** Images TEMP d'un rat présentant une endocardite aortique après injection de Fucoïdane radio-marqué au  $^{99m}\text{Tc}$

**Figure 23 :** Dénudation de l'endothélium par le FeCl $_3$

**Figure 24 :** Cinétique de formation de thrombus induit par le Rose Bengale

**Figure 25 :** Formation d'un thrombus après lésion d'artérioles du crémaster au laser

**Figure 26 :** Sténose de la veine cave inférieure

**Figure 27 :** Modèles et site vasculaire d'intérêt de thrombose chez la souris

## Tables

**Table 1** : Tableau récapitulant les avantages et les limites majeures des modèles de thromboses expérimentales chez la souris

## Abréviations

**$\alpha$ 2-AP** :  $\alpha$ 2-antiplasmine

**ADP** : Adénosine diphosphate

**AVC** : Accident vasculaire cérébral

**CML** : Cellules musculaires lisses

**COX-1** : Cyclooxygénase-1

**COX-2** : Cyclooxygénase-2

**EGF** : Epidermal Growth Factor

**EP** : Embolie pulmonaire

**FcR $\gamma$**  : Chaîne  $\gamma$  des récepteurs Fc

**FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure de Fer

**Fg** : Fibrinogène

**FT** : Facteur tissulaire

**GPVI** : Glycoprotéine VI

**IDM** : Infarctus du myocarde

**IL** : Interleukine

**ITAM** : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

**LRP** : Low-Density Lipoprotein Receptor- Related Protein

**MEC** : Matrice extracellulaire

**MMP** : Matrice metaloprotéase

**NETS** : Neutrophils extracellular traps

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PAI-1** : Plasminogen activator inhibitor -1

**PN-1** : Protéase nexine-1

**PAR** : protease-activated receptors

**pro u-PA** : pro- urokinase plasminogen activator

**PS** : Phosphatidylserines

**PSGL-1** : P-selectin glycoprotein ligand-1

**rt-PA** : Recombinant tissue plasminogen activator

**SCO** : Système canaliculaire ouvert  
**sct-PA** : Single chain tissue plasminogen activator  
**SLe<sup>x</sup>** : Sialyl lewis X  
**TAFI** : Thrombin-activatable fibrinolyses inhibitor  
**tct-PA** : twin chain tissue plasminogen activator  
**TFPI** : Tissue factor pathway inhibitor  
**TM** : Thrombomoduline  
**TNF  $\alpha$** : Tumor necrosis factor  $\alpha$   
**t-PA** : Activateur tissulaire du plasminogène  
**TxA2** : Thromboxane A2  
**TVP** : Thrombose Veineuse Profonde  
**u-PA** : Activateur du plasminogene type urokinase  
**u-PAR** : Récepteur de l'u-PA  
**vWF** : Facteur von Willebrand  
**WP** : Weibel-Palade

## Avant-propos

Les complications thrombotiques vasculaires aiguës représentent la principale cause de mortalité et de morbidité dans le monde.

La thrombolyse intraveineuse (IV) provoquée par l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA) est le traitement médical le plus utilisé pour la recanalisation des vaisseaux occlus permettant la reperfusion des tissus ischémiés. La thrombolyse IV par le rt-PA est indiquée dans les AVC ischémiques (accidents vasculaires cérébraux ischémiques), L'IDM (infarctus du myocarde) et l'EP grave (embolie pulmonaire). Cependant, son utilisation reste limitée, du fait de l'augmentation du risque hémorragique cérébral qui accompagne son administration, de l'étranglement de sa fenêtre thérapeutique, ainsi que sa possible neurotoxicité dans le cas des AVC ischémiques.

Vectoriser le rt-PA au thrombus permettrait d'améliorer son rendement fibrinolytique et de limiter ses effets délétères et serait ainsi intéressant sur le plan thérapeutique. Notre travail s'inscrit dans ce contexte.

Des travaux effectués dans notre laboratoire ont démontré qu'un polysaccharide sulfaté extrait d'algues brunes « le Fucoïdane », mimétique du Sialyl Lewis X (SLe<sup>x</sup>), possédait une affinité de l'ordre du nanomolaire pour la P-sélectine et cible *in vivo* avec une excellente sensibilité les thrombi fibrino-plaquettaires.

Dans notre travail et dans un premier temps, nous avons synthétisé une structure moléculaire bipolaire, associant le Fucoïdane capable de cibler le thrombus et des résidus lysines *via* l'amination de ce dernier, capable de lier le rt-PA. Dans un second temps, nous avons testé cette molécule bipolaire *in vitro* et *in vivo*. Ces essais ont montré les capacités vectrices du rt-PA par le Fucoïdane aminé.

Cette étude a permis de montrer que le Fucoïdane aminé est un bon candidat pour la vectorisation du rt-PA au thrombus, en augmentant son effet.

## RESUME

Les accidents vasculaires cérébraux ischémiques (AVC ischémiques), l'infarctus du myocarde (IDM) et l'embolie pulmonaire (EP) sont la première cause de mortalité et de morbidité dans le monde. Leur prise en charge est limitée à la recanalisation des vaisseaux occlus par le thrombus. La thrombolyse intraveineuse par le rt-PA (l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant) est le seul traitement médicamenteux utilisé dans ces situations d'urgences vasculaires. En dépit de ces bénéfices, cette thérapie s'entrave de plusieurs effets délétères principalement d'un risque d'hémorragie cérébrale. Augmenter le rendement fibrinolytique du rt-PA *via* sa vectorisation au thrombus sans augmenter ses effets délétères serait d'un grand intérêt. Le Fucoïdane, un polysaccharide anionique extrait principalement des algues brunes, ayant une affinité de l'ordre du nanomolaire à la P-sélectine, a démontré un ciblage spécifique du thrombus *in vivo*. Dans notre travail, nous avons développé une molécule bipolaire associant le **Fucoïdane** comme vecteur au thrombus, **aminé** par des lysines en N-terminales pour lier le rt-PA exogène. Le potentiel de vectorisation du t-PA par le Fucoïdane aminé ainsi que la preuve du concept ont été validés par notre travail. Nous avons montré sur des modèles de thrombi *in vitro* une accélération de lyse des thrombi, et *in vivo* une augmentation de l'efficacité thrombolytique du t-PA par injection périphérique.

## **PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## CHAPITRE I : L'Hémostase

La lésion d'un vaisseau provoque l'adhésion des plaquettes au site même de la lésion, suivie de l'activation et de l'agrégation plaquettaire. Ces réactions sont regroupées sous le terme d'hémostase primaire. Le clou plaquettaire ainsi constitué sert de plateforme pour la constitution d'un réseau de fibrine insoluble *via* l'activation de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). La formation de ce caillot est l'aboutissement d'une chaîne de réactions enzymatiques impliquant les facteurs plasmatiques de coagulation, dont l'activation de la thrombine permettant la fibrino-formation par clivage et reappariement du fibrinogène. Les processus gouvernant l'hémostase ont été regroupés dans la triade de Virchow, qui associe la paroi vasculaire, les éléments figurés du sang (principalement les plaquettes) et les forces hémodynamiques en particulier les flux (**Figure 1**).

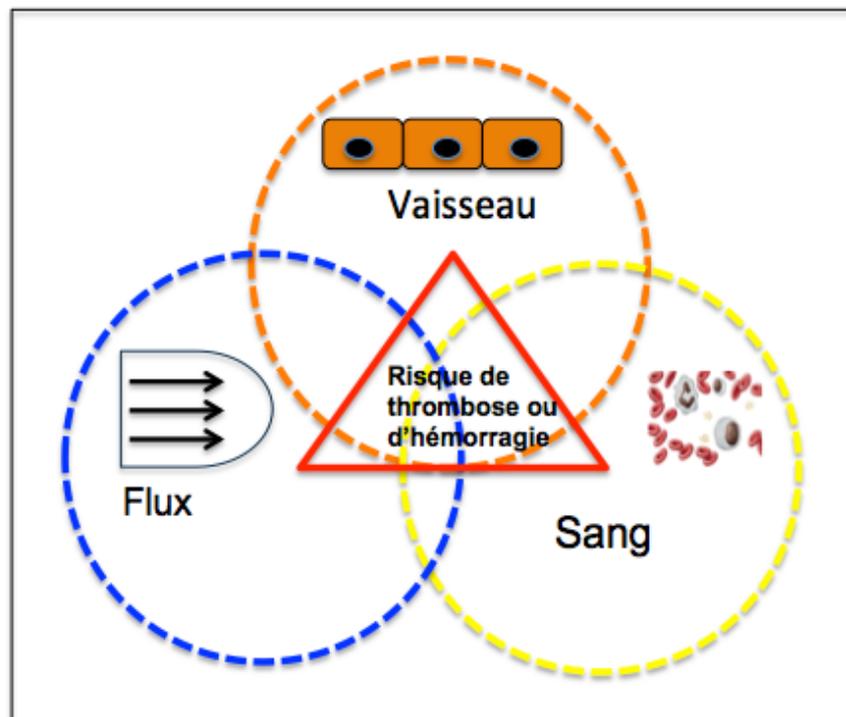


Figure 1 : La triade de Virchow [1]

Une thrombose intravasculaire peut survenir lorsque les interactions physiologiquement réprimées entre les facteurs de l'hémostase primaire et la paroi sont activées.

En particulier la stase sanguine et/ou l'exposition de composants pariétaux tels que le collagène fibrillaire ou des cellules vont provoquer l'activation plaquettaire *in situ*. L'activation plaquettaire s'accompagne de l'exposition à la membrane de nombreux facteurs pro-coagulants et de nombreuses molécules d'adhésion tels que les phosphatidylsérines (PS) et la P-sélectine respectivement.

Une thrombose intravasculaire peut se développer dans la circulation veineuse et donner lieu à une thrombose veineuse profonde, ou dans la circulation artérielle et entraîner une occlusion avec ischémie voire infarctus du tissu en aval. La fragmentation, le détachement et la migration d'une partie du thrombus, appelée « embolie », peuvent provoquer une ischémie tissulaire à distance comme lors d'un accident vasculaire cérébral (AVC).

La compréhension de la physiologie de l'hémostase d'une part et de la physiopathologie vasculaire d'autre part nécessite d'explorer plus avant les plaquettes sanguines.

## **I. Les plaquettes sanguines**

### **1. Généralités**

Les plaquettes sanguines, ou thrombocytes, sont des fragments anucléés cytoplasmiques produits à partir des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Chaque mégacaryocyte donne naissance à environ 1000 à 8000 plaquettes mesurant entre 2 et 4  $\mu\text{m}$ . Les deux tiers circulent dans le sang à l'état non activées, sous forme discoïde, avec une concentration allant de 150 à 400  $\times 10^6/\text{mL}$  chez l'homme. Le tiers restant est séquestré de manière réversible dans la rate. Leur durée de vie varie de 8 à 10 jours, délai après lequel les plaquettes les plus âgées sont principalement phagocytées par les macrophages de la rate et du foie [2, 3].

Chez la souris, la concentration des plaquettes atteint 800 à 1000  $\times 10^6/\text{mL}$  mais leur taille est moindre (environ 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre) [2, 4], tout comme leur durée de vie (4 à 5 jours).

Les plaquettes sanguines sont des acteurs primordiaux de l'hémostase, mais en plus de cette fonction cruciale dans la protection de l'intégrité du vaisseau par l'arrêt des saignements, et leurs implications dans les maladies thromboemboliques, elles sont impliquées dans différents processus physiopathologiques tels que le déclenchement de l'inflammation, la lutte contre les infections microbiennes et la promotion métastatique tumorale [1, 5][5]. La

participation des plaquettes aux réactions inflammatoires est importante en raison de leur potentiel à sécréter de nombreux médiateurs pro-inflammatoires et à interagir avec les leucocytes et les cellules endothéliales [6].

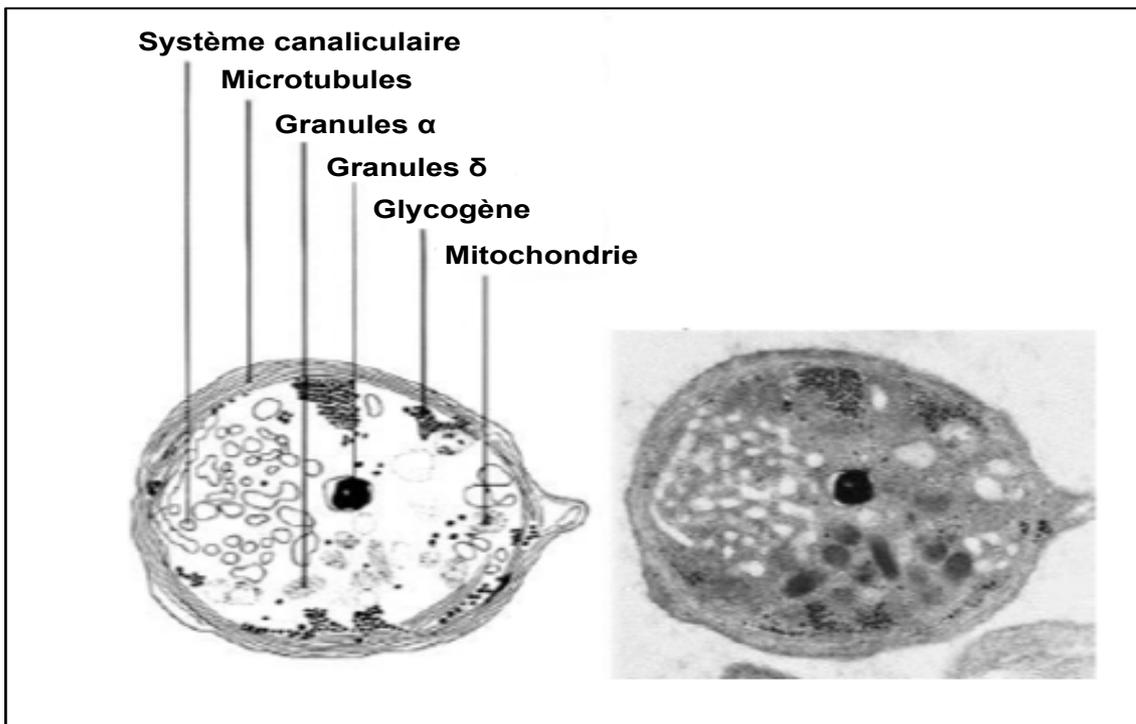
## **2. Structure des plaquettes**

L'ultrastructure et l'organisation particulière des plaquettes, révélée par la microscopie électronique, comporte trois régions : **(A)** la membrane plasmique, **(B)** le cytosquelette et **(C)** différents organites intra-plaquettaires, dont les granules  $\alpha$  et  $\delta$  [7, 8] **(Figure 2)**.

### **A. La membrane plasmique**

La membrane plasmique est composée d'une double couche de phospholipides répartis de façon asymétrique ainsi que de cholestérol, de glycanes et de protéines [9]. Les phospholipides anioniques, notamment les phosphatidylsérines (PS), occupent le feuillet interne de la membrane plaquettaire au repos et sont externalisés lors de l'activation plaquettaire offrant une plateforme pro-coagulante [10]. Ces phospholipides jouent un rôle crucial dans l'activation plaquettaire par la libération d'un métabolite : le thromboxane A2 (TxA2). A noter également la présence de nombreux récepteurs ancrés dans la bicouche lipidique qui vont permettre l'adhésion et/ou l'activation des plaquettes en réponse à divers ligands.

De profondes invaginations caractérisent la membrane plasmique, et forment le système canaliculaire ouvert (SCO). Ce système est impliqué dans les phénomènes d'endocytose d'éléments plasmatiques et d'exocytose du contenu des granules après activation plaquettaire.



**Figure 2 : Schéma et image en microscopie électronique d'une plaquette sanguine au repos**

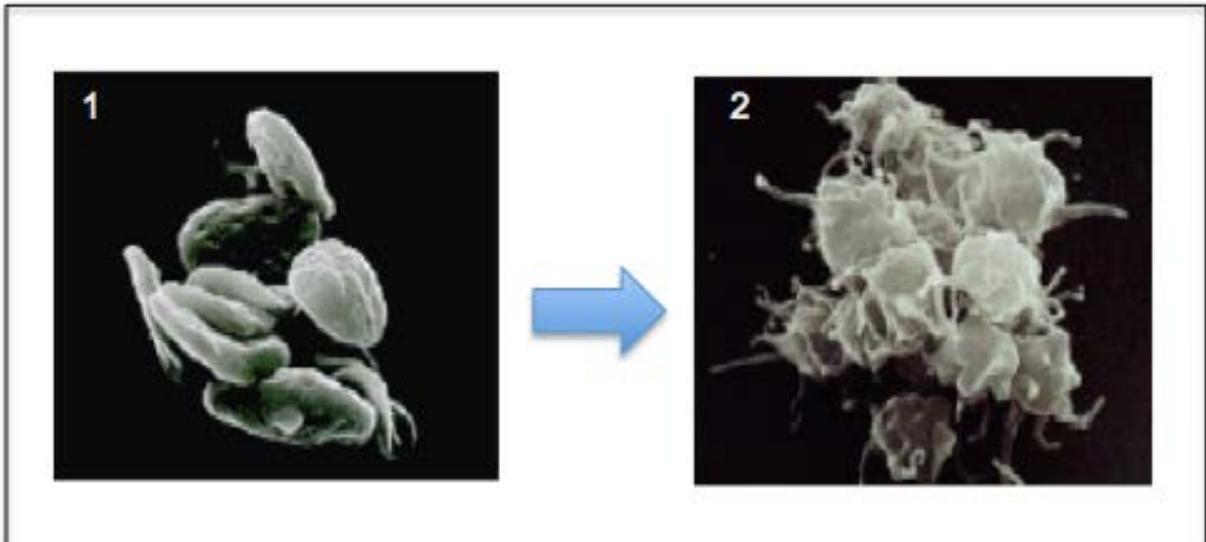
### **B. Le cytosquelette**

Le cytosquelette est constitué d'un anneau périphérique de microtubules et de microfilaments d'actine auxquels se lient plusieurs protéines comme la myosine et la vinculine. Son organisation très régulée détermine la forme discoïde des plaquettes non activées. Après activation, une réorganisation profonde du cytosquelette est à l'origine :

- du passage des plaquettes d'une forme discoïde à une forme sphérique ;
- de l'émission des filopodes et des pseudopodes ;
- d'une concentration de leurs granules ;
- puis de la libération de leurs contenus dans le SCO, ouvert vers le milieu extracellulaire [11]

**(Figure 3).**

Cette modification morphologique permet une augmentation de la surface externe, facilitant les contacts avec le micro-environnement plaquettaire : cellules environnantes et matrice extra



**Figure 3 : Changement de morphologie des plaquettes lors de leur activation**

1. Plaquettes au repos ont une forme discoïde; 2. Plaquettes activées ont une forme sphérique avec émission de filopodes/pseudopodes.

### C. Les organites et granules

Les plaquettes possèdent un système dérivé du réticulum endoplasmique mégacaryocytaire qui permet le stockage et la mobilisation du calcium intracellulaire, c'est le système tubulaire dense. Elles contiennent également quelques mitochondries, des grains de glycogène et de nombreux granules de sécrétion, répartis en : granules  $\alpha$ , granules  $\delta$  (granules denses) et lysosomes (**Figure 2**). Les mitochondries et les grains de glycogène fournissent l'énergie indispensable pour assurer les fonctions plaquettaires.

Les granules  $\alpha$  représentent la majorité des granules intra-plaquettaires. Deux glycoprotéines sont associées à la paroi de leurs membranes : la P-sélectine (CD62P) ou GMP-140, et un pool d'intégrines  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GPIIb/IIIa), qui sont exposées à la surface des plaquettes activées participant à la modification de la composition de la membrane et à l'interaction avec d'autres cellules.

Plusieurs protéines sont stockées dans les granules  $\alpha$ : facteurs de la coagulation (FV, FXI, FXIII), inhibiteurs de la fibrinolyse (PAI-1), glycoprotéines adhésives (fibrinogène, facteur von Willebrand (vWF), fibronectine), facteur plaquettaire 4 (PF 4), facteurs de croissance

(*platelet derived growth factor* ou PDGF, *vascular endothelial growth factor* ou VEGF), albumine ainsi que des immunoglobulines [12].

La dégranulation plaquettaire consiste en la libération de ces différentes protéines dans la circulation sanguine. Ces protéines vont participer à différents processus physiologiques associés à la formation du thrombus [11].

Les granules  $\delta$  (granules denses) sont appelés ainsi en raison de leur aspect en microscopie électronique. Ils sont moins nombreux que les granules  $\alpha$  et contiennent de fortes concentrations de calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ) (2 M), d'ADP (adénosine diphosphate) (650 mM), d'ATP (adénosine-5'-triphosphate) (440 mM), et de sérotonine (65 mM). Leur sécrétion est à l'origine du recrutement des plaquettes circulantes et du renforcement de leur niveau d'activation.

Enfin, les lysosomes, qui contiennent des enzymes : des hydrolases acides, des sérines peptidases, des protéases et des phosphatases acides [12].

### 3. Plaquettes sanguines et lésion vasculaire : rôle de l'hémostase

Lors d'une brèche vasculaire, et dans des conditions physiologiques, le processus de l'hémostase primaire se déclenche pour arrêter le saignement. On schématise plusieurs phases, à savoir :

- (A) Adhérence initiale à la paroi lésée;
- (B) Activation au contact avec la paroi lésée, sécrétion et amplification de l'activation;
- (C) Agrégation des plaquettes entre elles;

#### A. Adhérence plaquettes - paroi vasculaire

Pour mieux comprendre et définir le rôle de la paroi lésée (A), intéressons-nous tout d'abord à la paroi vasculaire.

##### a. Structure de la paroi vasculaire

La paroi vasculaire, schématisée dans **la figure 4**, est composée de 3 tuniques disposées de manière concentrique de la lumière vasculaire vers la périphérie de l'artère : l'intima, la média et l'adventice.

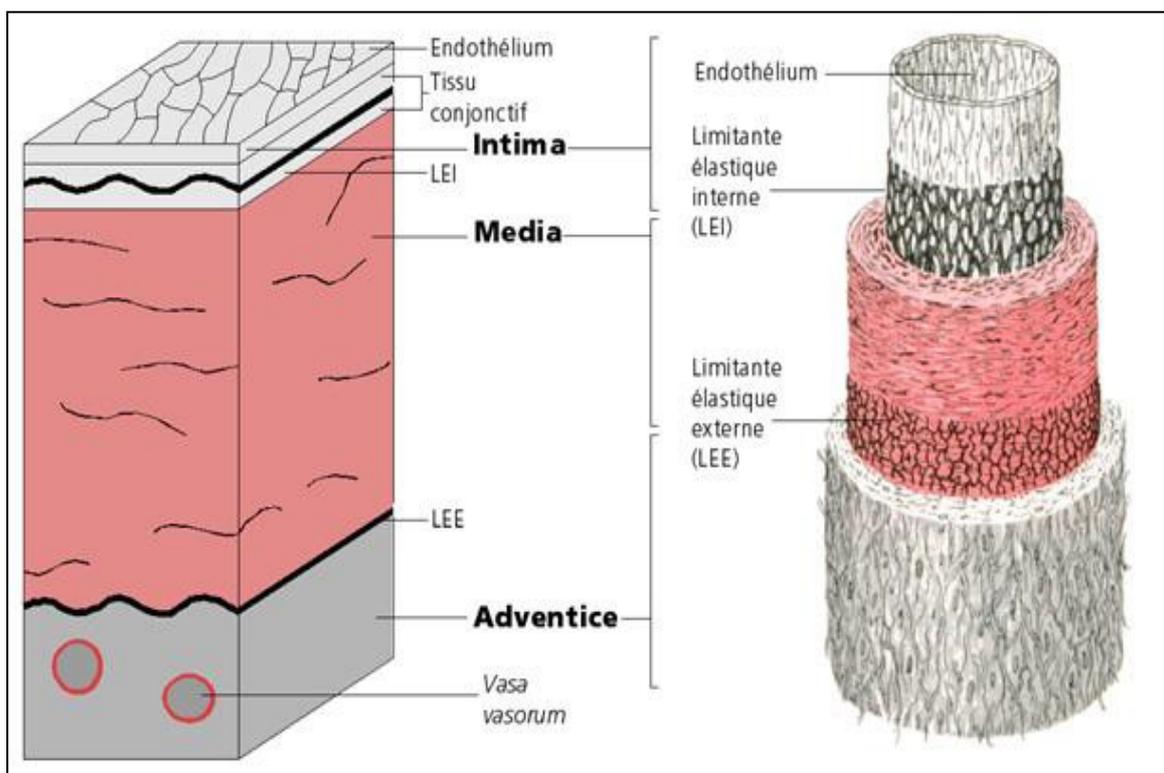


Figure 4 : Schéma de la paroi vasculaire

**L'intima** est la tunique la plus fine et la plus interne de la paroi et est directement en contact avec le sang et le sous-endothélium. Elle est composée : d'une monocouche étanche de cellules endothéliales séparée du sous-endothélium par une membrane basale. Le sous-endothélium comporte des protéines thrombogènes, principalement le collagène fibrillaire. L'endothélium ne constitue pas seulement une barrière séparant physiquement le sang et le sous-endothélium mais il assure également plusieurs fonctions dans la régulation de l'hémostase primaire et de la coagulation ainsi que dans la fibrinolyse [13-15]. Il intervient également dans l'inflammation, dans l'angiogenèse et dans le contrôle du tonus vasculaire.

**La média** est la tunique intermédiaire et la plus épaisse. Elle est constituée de cellules musculaires lisses (CML). Ces cellules sont entourées d'une matrice extracellulaire (MEC) composée de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de mucopolysaccharides. Elles assurent les fonctions vasodilatatrices et vasoconstrictrices du vaisseau. Cette tunique est séparée de l'intima et de l'adventice par des lames d'élastines appelées respectivement limitante élastique interne et limitante élastique externe.

**L'adventice** est la tunique externe. Elle est constituée d'un tissu conjonctif très peu organisé, et d'une enveloppe qui assure l'ancrage de l'artère aux structures voisines. Cette tunique est riche en collagène, en fibres élastiques et comprend des adipocytes et des fibroblastes. Elle est irriguée par des microvaisseaux (*vasa vasorum*) qui ont un rôle nourricier pour l'adventice elle-même et pour la partie externe de la média. Cette tunique intervient aussi dans la vasoconstriction *via* un réseau de nerfs vasomoteurs qui rejoint les fibres musculaires lisses de la média.

En conditions physiologiques, les plaquettes n'adhèrent ni entre elles ni aux cellules endothéliales. Ces dernières forment une interface non thrombogène, séparant le sang de la matrice sous-endothéliale constituée de macromolécules adhésives fortement thrombogènes. La thromborésistance assurée par les cellules endothéliales est induite principalement par la production et la libération du monoxyde d'azote (NO), et de la prostaglandine I2 (PGI2).

Lors d'une lésion vasculaire, le sous-endothélium et ses constituants adhésifs (collagène, facteur von Willebrand (vWF), fibronectine, vitronectine et laminines) sont exposés au sang circulant. Ceci permet aux plaquettes d'adhérer à la paroi vasculaire lésée, et d'induire l'arrêt du saignement et le maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire. L'adhérence plaquettes - sous-endothélium fait intervenir plusieurs récepteurs présents à la surface native des plaquettes ou exposés lors de leur activation. Ces interactions plaquettes - paroi vasculaire sont initiées par l'adhérence des plaquettes au facteur von Willebrand (vWF).

Il est intéressant de noter que les mécanismes responsables des liaisons plaquettes-molécules adhésives sont déterminés en grande partie par les forces de cisaillements du sang au niveau du site de la lésion. Les forces de cisaillements sont définies comme les forces tangentielles résultant du frottement du sang qui coule sur la surface de la paroi des vaisseaux. Elles sont exprimées en unités de force/zones unitaires ( $N/m^2$ ).

## **b. Adhérence plaquettes - vWF [16]**

Dans des conditions de cisaillements élevés observées dans la microcirculation et les artérioles en physiologie, ou en cas d'athérosclérose et/ou sténose vasculaire en pathologie, les plaquettes interagissent avec le vWF contenu dans le sous-endothélium, ou exposé lié au collagène. Cette interaction est assurée par l'intégrine GPIb $\alpha$  située sur la surface des plaquettes non activées [17].

### **i. Le vWF**

Le vWF est une glycoprotéine adhésive multimérique de très large poids moléculaire (entre 500 et 30 000 kDa) formée d'une série d'assemblages de dimères. Chaque sous-unité de vWF comporte des domaines fonctionnels qui lui permettent d'interagir avec les plaquettes (le domaine A1 pour l'interaction avec le GPIb $\alpha$  et le domaine C1 contenant le motif RGD reconnu par l'intégrine  $\alpha$ I**II** $\beta$ 3), ou d'interagir avec la paroi lésée *via* son domaine A3 qui lie

le collagène. Le vWF est synthétisé par les cellules endothéliales où il est stocké dans les corps de Weibel-Palade (WP) et par les mégacaryocytes où il est stocké dans les granules  $\alpha$  et retrouvé logiquement dans les granules  $\alpha$  des plaquettes, d'où il peut être libéré dans la circulation lors de l'activation plaquettaire.

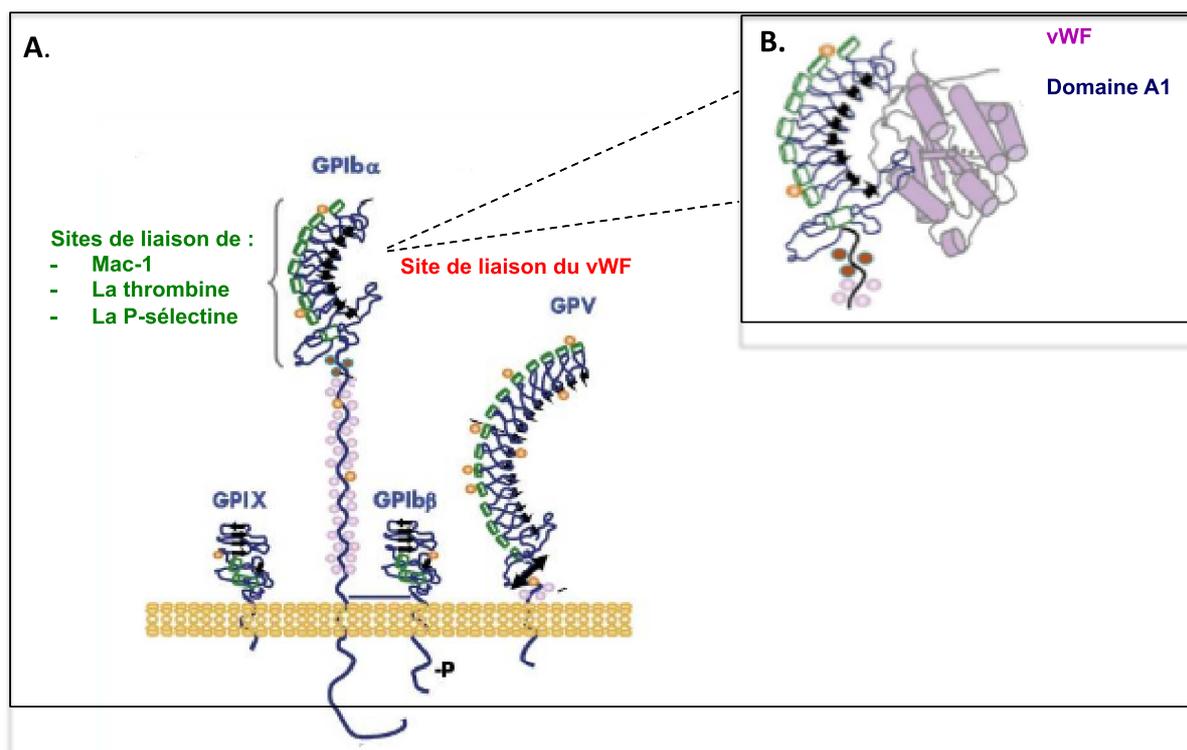
Sous l'action de forces de cisaillements élevées, le vWF démasque son domaine A1 indispensable à son interaction avec la GPIb $\alpha$  et acquiert ainsi une conformation dite activée [18].

Des déficits qualitatifs ou quantitatifs du vWF sont retrouvés dans la maladie dite de Willebrand caractérisée par un syndrome hémorragique pouvant être sévère [19].

Dans des études expérimentales de lésions vasculaires (dénudation endothéliale) induites par le Chlorure de Fer (FeCl<sub>3</sub>), l'adhésion plaquettaire était significativement réduite chez les souris déficientes en vWF (vWF<sup>-/-</sup>) aboutissant à une diminution du risque de thrombose [20, 21].

## ii. La GPIb $\alpha$

La GPIb $\alpha$  (**Figure 5**) est une glycoprotéine transmembranaire présente à la surface des plaquettes non activées à raison de 25 000 copies/plaquette. Elle fait partie du complexe protéique GPIb/IX/V spécifique des plaquettes et composé de : deux sous-unités GPIb $\alpha$  (130 kDa), deux sous-unités GPIb $\beta$  (25 kDa), deux sous-unités GPIX (22 kDa) et une sous-unité GPV (88 kDa) [22]. La GPIb $\alpha$  lie le domaine A1 du vWF, son principal ligand, *via* son extrémité extracellulaire N-terminale.



**Figure 5 : Structure du complexe GPIb-IX-V [23]**

vWF : Facteur von Willebrand, Mac-1 : Macrophage antigen-1

Outre son interaction avec le vWF, la GPIb $\alpha$  peut interagir également avec la thrombine [24]. Il est aussi impliqué dans l'interaction plaquettes-cellules endothéliales activées *via* son site de liaison pour la P-sélectine endothéliale favorisant le recrutement des plaquettes par l'endothélium [25], ainsi que dans l'interaction plaquettes-leucocytes *via* l'intégrine leucocytaire Mac - 1 (Macrophage antigen - 1) [26, 27].

Les patients atteints du syndrome Bernard-Soulier (maladie héréditaire caractérisée par un déficit partiel ou total en GPIb $\alpha$ ) [28] présentent des ménorragies, des épistaxis, des gingivorragies.

L'interaction GPIb $\alpha$  - vWF est rapide mais réversible : elle représente une étape d'initiation qui n'est pas capable de maintenir l'adhérence des plaquettes mais permet un ralentissement des plaquettes et leurs recrutements au site de la brèche vasculaire. Ceci facilitera d'autres interactions stables et fermes avec d'autres récepteurs d'adhérences plaquettaires tels que la GPVI.

### c. Adhérences stables : plaquettes – collagène

Les plaquettes ralenties au site de la brèche vasculaire engagent des interactions fermes avec le collagène *via* ses récepteurs.

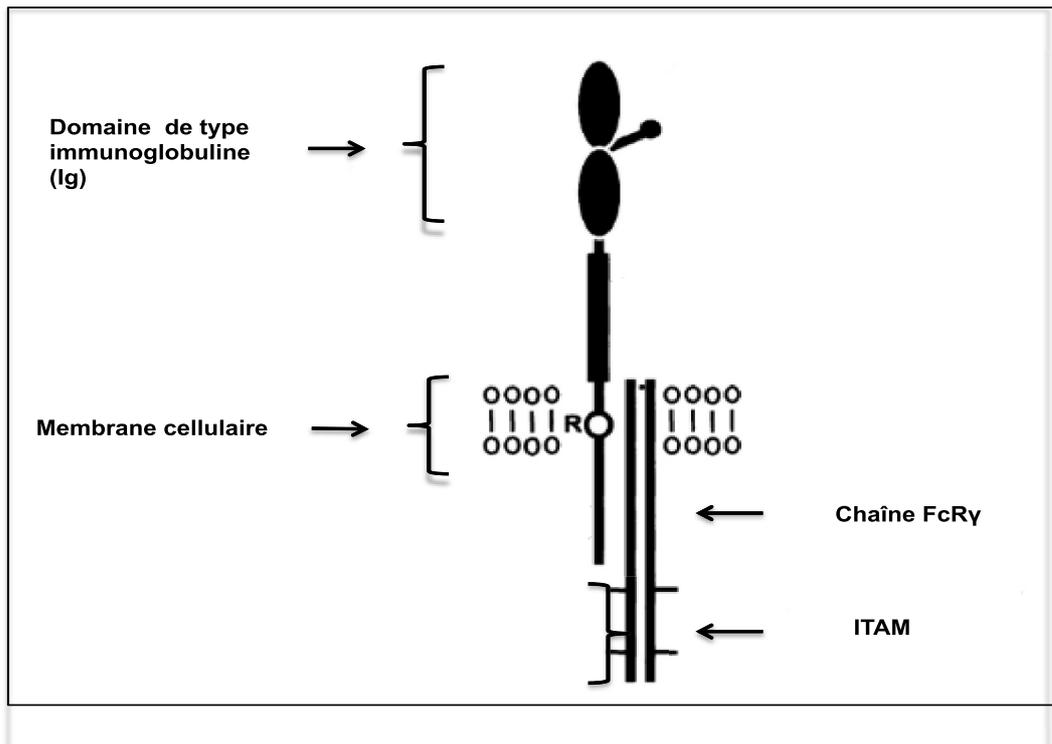
#### i. Le collagène

Le collagène est une protéine adhésive, le plus souvent fibrillaire et d'une masse moléculaire avoisinant les 300 kDa. Secrétés par les cellules des tissus conjonctifs, les collagènes de type I et type III sont les constituants les plus abondants de la MEC des vaisseaux sanguins [29]. Le collagène est considéré comme un agoniste et activateur plaquettaire très puissant et comme le composant de la MEC qui est capable d'induire l'agrégation plaquettaire [30].

Les plaquettes possèdent deux récepteurs qui interagissent avec le collagène et forment des liaisons « plaquettes-collagène » directes, stables et irréversibles. Ces récepteurs sont : la glycoprotéine VI (GPVI) (principal récepteur de l'activation plaquettaire par le collagène [31, 32] et l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (GPIaIIa).

#### ii. La GPVI

La GPVI (**Figure 6**) est une glycoprotéine transmembranaire d'environ 62 kDa qui appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Elle est exprimée spécifiquement dans les cellules de la lignée mégacaryocytaire à raison de 3000 à 5000 copies/plaquette [33-35]. La GPVI est constituée de deux domaines extracellulaires de type Ig (D1 et D2), portant le site d'adhésion au collagène, un domaine transmembranaire et un court domaine intracytoplasmique. Dans la membrane plaquettaire, la GPVI est associée à la FcR $\gamma$  (chaîne  $\gamma$  des récepteurs Fc) qui porte le motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), acteur crucial dans la modulation de l'adhésion plaquettaire au collagène *via* la GPVI [36]. Les récents travaux de Janderot-Perrus *et al.* ont démontré que la GPVI est également un récepteur de la fibrine [37].



**Figure 6 : Complexe GPVI- FcR $\gamma$  [29]**

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

L'activation des plaquettes par le collagène est par ailleurs renforcée par la libération des agonistes d'amplification (ADP et TxA<sub>2</sub>). L'administration d'antagonistes d'un de ces deux derniers médiateurs diminue la réponse des plaquettes au collagène [38-40].

Dans des études effectuées sur des plaquettes déficientes en GPVI ou en FcR $\gamma$ , Nieswandt *et al.* ont démontré l'implication de la GPVI dans l'activation et l'agrégation plaquettaire (changement de forme, sécrétion, activation des intégrines et expositions des phosphatidylserines) [41].

Dans des modèles expérimentaux de thromboses provoquées par le FeCl<sub>3</sub> au niveau de la carotide ou par une stase coronarienne (par ligature) chez la souris déficiente en GPVI (GPVI<sup>-/-</sup>), l'interaction plaquettes-paroi lésée était significativement abaissée [42, 43].

### **iii. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (GPIaIIa)**

L'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (GPIaIIa ou CD49b/CD29) est une glycoprotéine transmembranaire exprimée à la surface des plaquettes à raison de 2000 à 4000 copies/plaquette. Cette expression n'est pas exclusivement plaquettaire, elle est présente aussi dans d'autres cellules telles que les cellules épithéliales [44]. Constituée de deux chaînes, la chaîne  $\alpha 2$  (160 kDa) et la chaîne  $\beta 1$  (110 kDa), chacune possédant un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un court domaine intra-cytoplasmique, l' $\alpha 2\beta 1$  lie le collagène *via* la partie extracellulaire de la chaîne  $\alpha 2$  [45]. La liaison avec le collagène se fait par un passage de la conformation de basse affinité à une conformation activée de haute affinité.

Son implication exacte dans la signalisation est encore discutée en raison de résultats discordants [46, 47]. Contrairement à la GPVI, l'interaction  $\alpha 2\beta 1$ -collagène aurait plus une action de soutien de l'adhérence des plaquettes (synergie avec le GPIb $\alpha$ ) que d'activation plaquettaire [48, 49].

L'interaction des plaquettes au site de la brèche vasculaire avec le vWF et le collagène permet d'engager l'adhérence des plaquettes à d'autres structures sous-endothéliales.

### **d. Adhérence aux autres structures sous-endothéliales**

Les plaquettes peuvent interagir avec d'autres protéines adhésives présentes au niveau du sous-endothélium comme la fibronectine, la laminine et la vitronectine. Ces liaisons se font *via* des récepteurs spécifiques présents à la surface des plaquettes. L'intégrine  $\alpha \nu \beta 3$  lie à la fois la fibronectine et la vitronectine alors que l'intégrine  $\alpha 5\beta 3$  lie spécifiquement la fibronectine et l' $\alpha 6\beta 1$  lie la laminine.

Ces récepteurs ont un rôle significatif dans la modulation de la réponse plaquettaire, comme l'ont démontré Gruner *et al.* et Ruggeri Zm *et al.* [50, 51].

## **B. Activation et sécrétion plaquettaire**

Suite à leur adhésion à la structure sous-endothéliale *in vivo*, ou suite à l'action d'un stimulus externe *in vitro* (ADP, thrombine, collagène, TxA2, sérotonine), les plaquettes s'activent.

Cette activation se manifeste par :

- (a) Un changement morphologique ;
- (b) Une sécrétion des contenus des granules  $\alpha$  et  $\delta$  ;

### **a. Changement de forme des plaquettes**

Le changement de morphologie est une des conséquences de l'activation des plaquettes. De discoïde, les plaquettes deviennent sphériques avec émission de pseudopodes et filopodes. Ces changements résultent d'une réorganisation des protéines contractiles cytosquelettiques et cytoplasmiques (dépolymérisation de la tubuline, phosphorylation et contraction de la myosine). Ces changements s'accompagnent d'une dégranulation et d'une sécrétion des contenus des différents granules plaquettaires.

### **b. Sécrétion et recrutement**

Au cours de la sécrétion, la fusion des membranes des granules  $\alpha$  à la membrane plasmique conduit d'une part à l'exposition membranaire de la P-sélectine, considérée comme un marqueur des plaquettes activées, et d'autre part à l'augmentation du nombre d'intégrines  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 exposées. Les contenus des granules  $\delta$  sécrétés sont essentiellement de l'ADP et du  $Ca^{++}$ , la sécrétion de ce dernier initie la synthèse du TxA2. Ces deux médiateurs agissent sur l'activation plaquettaire avec deux voies différentes.

#### **i. La voie des récepteurs purinergique (P2Y)**

L'ADP, libéré à forte concentration par les granules  $\delta$ , exerce ses effets *via* une fixation aux récepteurs purinergiques P2Y, récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G [52, 53]. Il existe deux récepteurs P2Y à la surface des plaquettes : le P2Y1 et le P2Y12.

Le récepteur P2Y1 est exprimé par les plaquettes à raison de 150 copies/plaquette, ainsi que dans plusieurs tissus, notamment par les CML des vaisseaux sanguins, le tissu nerveux, et le

cœur. La fixation de l'ADP sur le P2Y1 induit une mobilisation du calcium intracellulaire et entraîne une agrégation transitoire et réversible des plaquettes [54].

Le P2Y12 est exprimé essentiellement par les plaquettes à raison de 500 à 800 copies/plaquette, mais est aussi présent dans les CML et certaines cellules gliales. Il est impliqué dans la transmission des signaux intracellulaires permettant d'activer l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (en levant son inhibition) et le développement d'une agrégation plaquettaire stable [55].

Le P2Y12 est la cible de plusieurs antagonistes pharmacologiques tels que le clopidrogel, le ticagrelor et le prasugrel, utilisés comme antiagrégants plaquettaires dans la prévention de la thrombose artérielle chez l'homme.

## **ii. La voie du thromboxanes $A_2$ (Tx $A_2$ )**

L'augmentation de la concentration cytoplasmique en  $\text{Ca}^{++}$  active la phospholipase A2 qui stimule la formation de l'acide arachidonique (AA) à partir des phospholipides membranaires. L'AA devient disponible pour la cyclooxygénase-1 (COX-1) qui le transforme en endopéroxyde, puis en métabolite Tx $A_2$  sous l'action de la thromboxane-synthase [56].

Le Tx $A_2$  est considéré comme un activateur des plaquettes et un puissant vasoconstricteur. Son action est médiée par des récepteurs membranaires spécifiques, les récepteurs TP (récepteurs aux thromboxanes et aux prostanoides), récepteurs couplés aux protéines G [57]. Ils sont présents sur les plaquettes ainsi que dans les poumons, le thymus, la rate et le placenta. Les récepteurs TP existent sous deux isoformes TP $\alpha$  et TP $\beta$  qui diffèrent au niveau de leur domaine C-terminal.

La forme TP $\alpha$  est plus exprimée sur les plaquettes que la forme TP $\beta$ . La fixation du Tx $A_2$  sur les plaquettes induit une signalisation semblable à celle de l'ADP, participant au changement de morphologie, à la sécrétion des granules et à l'agrégation des plaquettes.

Des inhibiteurs de la COX-1 (et de la COX-2) tels que l'aspirine sont utilisés comme antiagrégants plaquettaires dans la prévention des thromboses vasculaires coronaires et cérébrales, en inhibant la synthèse du Tx $A_2$  [56]. Pour rappel, les plaquettes n'ayant pas de noyaux, elles ne peuvent plus produire de COX-1 ou COX-2 une fois inhibées par l'aspirine.

L'ADP et le Tx $A_2$  synthétisé permettent d'une part d'assurer la croissance du thrombus *via* le recrutement d'autres plaquettes circulantes à proximité plaquettes activées, et d'autre part

d'amplifier l'activation plaquettaire et de contribuer à une stabilisation des agrégats plaquettaires *via* l'activation de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (**Figure 7**).

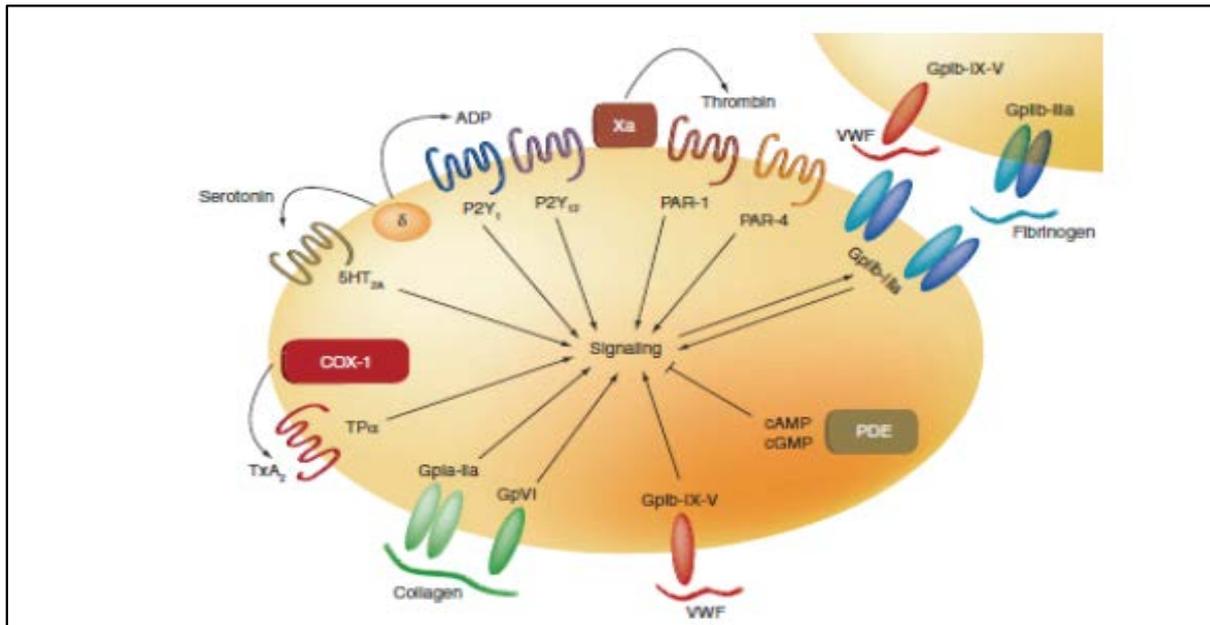
### **iii. Activation des plaquettes par la thrombine (FIIa)**

Une petite proportion de thrombine (FIIa) est produite à partir de la prothrombine circulante (FII) *via* l'activation de la cascade de coagulation au site de la lésion vasculaire et vient renforcer l'activation plaquettaire. La thrombine est une sérine-protéase multifonctionnelle considérée comme l'enzyme clef de la coagulation et comme l'activateur le plus puissant des plaquettes sanguines. Elle exerce ses effets principalement *via* les récepteurs PAR (*protease-activated receptors*) qui sont des récepteurs couplés aux protéines G activables par protéolyse. Les récepteurs PAR sont fortement exprimés par les plaquettes, mais aussi par les cellules endothéliales, les neurones et les monocytes [58]. Les deux récepteurs PAR exprimés sur les plaquettes humaines sont PAR1 et PAR4 [59].

L'activation des plaquettes par la thrombine implique la sécrétion du contenu granulaire et par conséquent l'activation du P2Y<sub>12</sub>.

Les PAR1 ayant une forte affinité pour la thrombine sont activés par de faibles concentrations (de l'ordre de  $0,5 \cdot 10^{-9}$  M), alors que l'activation de PAR4 requiert des concentrations plus importantes (20 à 50 fois plus) [59]. Ce système à deux récepteurs permet de réguler la qualité de la réponse plaquettaire à la stimulation en fonction des conditions locales de génération de thrombine.

Sambrano *et al.* et Hamilton *et al.* ont démontré que les souris déficientes en PAR4 (PAR4<sup>-/-</sup>) étaient protégées d'un risque de thrombose dans un modèle de thrombose provoquée par le FeCl<sub>3</sub> sur des artérioles mésentériques [60, 61].



**Figure 7 : Schéma des récepteurs plaquettaire**

δ : granules denses ; TP : récepteurs du TxA<sub>2</sub> ; TxA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub> ; PAR : récepteurs de la thrombine ; P2Y : récepteurs de l'ADP ; GPVI, GPIIb/IIIa : récepteurs du collagène ; vWF : facteur von Willebrand.

### C. Agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est définie par la capacité des plaquettes à s'agglutiner entre elles pour former un agrégat. Ce phénomène nécessite l'intervention de l'intégrine αIIbβ3 (GPIIb/IIIa ou CD41/61).

#### a. αIIbβ3

L'intégrine αIIbβ3 est le récepteur majoritaire de l'ensemble des récepteurs plaquettaires (40000-80000 copies/plaquette) réparti de façon homogène. Il est présent à la surface des plaquettes et à la surface des granules α. Après activation et dégranulation plaquettaire, les membranes des granules α fusionnent avec la membrane plasmique et augmentent ainsi le nombre d'intégrines exposées à la surface des plaquettes. La sous-unité αIIb est une glycoprotéine de 140 kDa composée de deux chaînes reliées entre elles par des ponts disulfures, alors que la sous-unité β3 (95kDa) est constituée d'une chaîne polypeptidique avec de nombreux ponts disulfures.

Les sous-unités  $\alpha$ IIb et  $\beta$ 3 sont synthétisées à un stade précoce de différenciation mégacaryocytaire. Elles possèdent de longs domaines extracellulaires et de courts domaines transmembranaires et cytoplasmiques. Les extrémités extracellulaires interagissent pour former le site de fixation des ligands. Les domaines cytoplasmiques jouent un rôle régulateur dans l'activation et la signalisation intracellulaire de l' $\alpha$ IIb $\beta$ 3 [62]. L' $\alpha$ IIb $\beta$ 3 joue un rôle clé dans l'agrégation plaquettaire, rôle basé sur sa capacité à modifier sa conformation d'une forme inactive de basse affinité à une forme active de haute affinité pour son principal ligand.

Quand les plaquettes sont au repos, l'intégrine est dans une conformation inactive, sans affinité pour son ligand. Son activation induite par un agoniste soluble tel que l'ADP, la thrombine ou le TxA2, ou suite à l'adhésion plaquettaire aux protéines adhésives (vWF, ou collagène), permet de déclencher la cascade calcium-dépendante nommée « inside - out ».

Cette cascade de signalisation engendre un changement conformationnel de l'intégrine, qui passe rapidement d'une forme repliée où les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont liées par un pont salin, à une forme dépliée. Ce changement fait suite à la fixation de la Taline et la Kindline-3 (protéines du cytosquelette) au niveau du domaine  $\beta$ 3 cytoplasmique de l'intégrine, qui sépare les deux chaînes, permettant enfin à l'intégrine de fixer le fibrinogène (Fg), son principal ligand (**Figure 8**) [63].

#### **b. Le Fibrinogène (Fg)**

Le Fibrinogène, principal ligand de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, est une glycoprotéine hétérodimérique de 340 kDa. Il est synthétisé principalement par le foie et est présent en forte concentration dans le plasma (1,8 à 4 g/L). Il est aussi présent dans les granules  $\alpha$  des plaquettes. Il constitue un véritable « pont » entre les différentes plaquettes activées permettant leur agrégation. Le Fg est par ailleurs le substrat final de la coagulation au cours de laquelle il est converti en fibrine, formant ainsi le thrombus.

L'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 peut fixer d'autres protéines adhésives telles que le vWF, la fibronectine et la vitronectine.

La fixation du fibrinogène sur l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 entraîne le regroupement de ces intégrines sur la membrane et déclenche une cascade de signalisation appelée « outside - in ». Ce processus contribue au contrôle de l'irréversibilité de l'agrégation et de la rétraction du clou plaquettaire.

L'absence ou le dysfonctionnement de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  entraîne de graves manifestations hémorragiques, conséquences de l'absence de l'agrégation plaquettaire et constituant la thrombasthénie de Glanzmann [64].

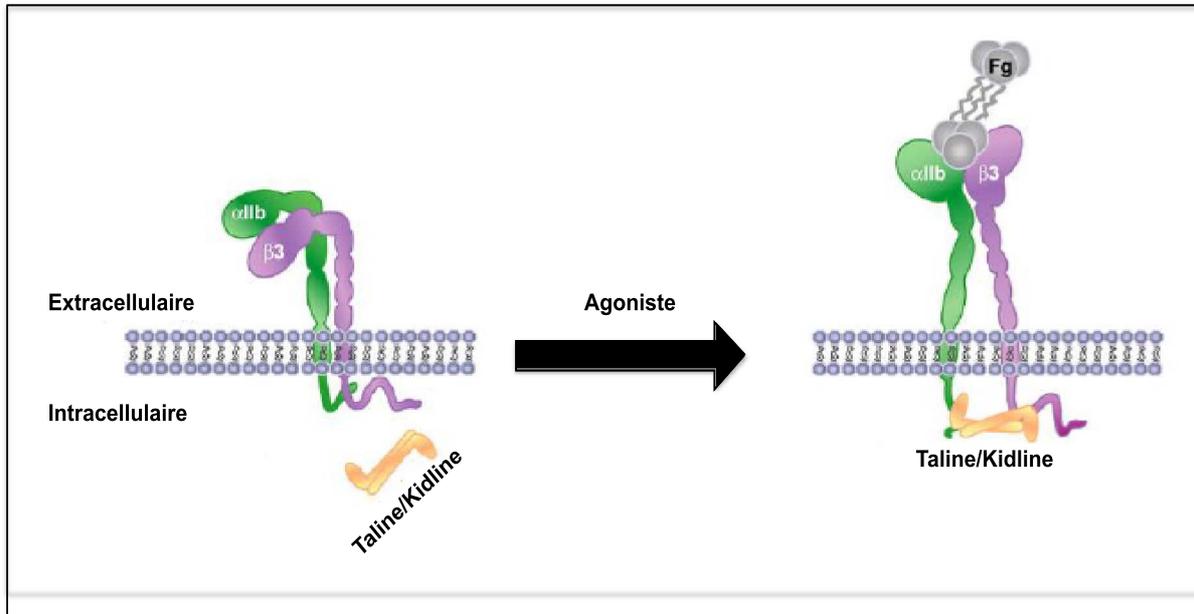


Figure 8 : Structure et activation de l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  [65]

#### 4. Activité pro-coagulante des plaquettes

L'activation des plaquettes entraîne une réorganisation de la répartition des phospholipides membranaires. Les phosphatidylserines (PS) sont alors transloquées à la surface des plaquettes générant une surface anionique. Ceci favorise une concentration des enzymes de coagulation aboutissant à la génération de la thrombine et procurant aux plaquettes une activité pro-coagulante (anciennement appelée «facteur plaquettaire 3»). Les patients touchés par le syndrome de Scott, maladie héréditaire caractérisée par l'incapacité des plaquettes à exposer les PS, souffrent de troubles hémorragiques [66].

## II. Activation de la coagulation, trapping des globules rouges et consolidation du thrombus

Le clou plaquettaire formé au niveau du site de la brèche vasculaire est fragile et va être rapidement consolidé par un réseau de fibrine insoluble sous l'action de la thrombine. La génération de celle-ci est l'aboutissement du déclenchement de la cascade de la coagulation. Cette cascade permet la conversion du fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui constitue l'armature du caillot. La coagulation fait intervenir des protéines plasmatiques qui sont des pro-enzymes de protéase à sérine, synthétisées par le foie. Leur nomenclature utilise un chiffre romain suivi du suffixe « a » lorsqu'elles sont activées. L'élément déclencheur de la coagulation après une lésion vasculaire est le facteur tissulaire (FT).

### 1. Le facteur tissulaire (FT)

Le facteur tissulaire, physiologiquement non circulant, est une glycoprotéine transmembranaire monocaténaire de 42 kDa largement, mais sélectivement distribuée dans les tissus vasculaires. Il est exprimé dans l'adventice par les fibroblastes et dans la média par les CML qui se retrouvent alors exposées en cas de lésion vasculaire profonde [67]. Il peut aussi être exprimé par les cellules endothéliales en cas de stimulation par les cytokines ou par certains lipopolysaccharides bactériens [68], ainsi que par les plaquettes et les monocytes dans certaines conditions pathologiques [67, 69].

Le FT a une très forte affinité pour le facteur VII (FVII) circulant (sous forme de traces). Lors de la lésion vasculaire, le FT se lie au FVII formant le complexe FT-VIIa. Quand le FT est en excès, le complexe FT-VIIa active directement le FX qui à son tour clive la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). Ce complexe peut être rapidement inhibé par l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire : le TFPI «*tissue factor pathway inhibitor*» [70] (Voir partie II.2 ) (**Figure 9**).

Quand le FT est en faible quantité (ou lorsque l'inhibition par le TFPI est dominante), le complexe (FT-FVIIa) active alors le facteur IX en FIXa en présence de son cofacteur le facteur VIIIa, d'ions de  $Ca^{++}$  et de phospholipides. Ceci permettra secondairement l'activation du FX en FXa, qui clivera la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa).

Une seconde voie d'activation de coagulation, appelée « voie endogène », « voie intrinsèque » ou encore « voie de contact », est induite suite au contact du FXII avec une surface ou des substances chargées négativement.

Ce dernier activé va lui-même activer le FXI, qui à son tour active le FIX en IXa. Le FIXa active le FX en Xa, aboutissant à l'activation de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa) (**Figure 9**). Cette voie est activée dans les situations dites « thrombo-inflammatoires » où les neutrophiles activés larguent leur matériel nucléaire : les NETS « *neutrophils extracellular traps* » [71].

La thrombine générée amplifie le processus de coagulation et conduit à la formation de réseau de fibrine qui consolide le thrombus plaquettaire en catalysant son principal substrat : le fibrinogène. La thrombine catalyse les extrémités N-terminales des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du fibrinogène, détachant deux fibrinopeptides A (FPA) et deux fibrinopeptides B (FPB) ainsi que des monomères de fibrines qui se polymérisent. Dans une dernière étape, le polymère de fibrine formé est stabilisé par une transglutaminase, le FXIIIa, qui a été activé préalablement par la thrombine. Ceci se regroupe sous l'appellation de « fibrino-formation ».

Par ailleurs la thrombine, extrêmement puissante, est capable de catalyser sa propre génération en activant les plaquettes et d'auto-amplifier ainsi son action et maintenir l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 sous forme activée.

Pour éviter un excès pathologique de coagulation, plusieurs systèmes endogènes entrent en jeu pour contrôler et réguler cette cascade.

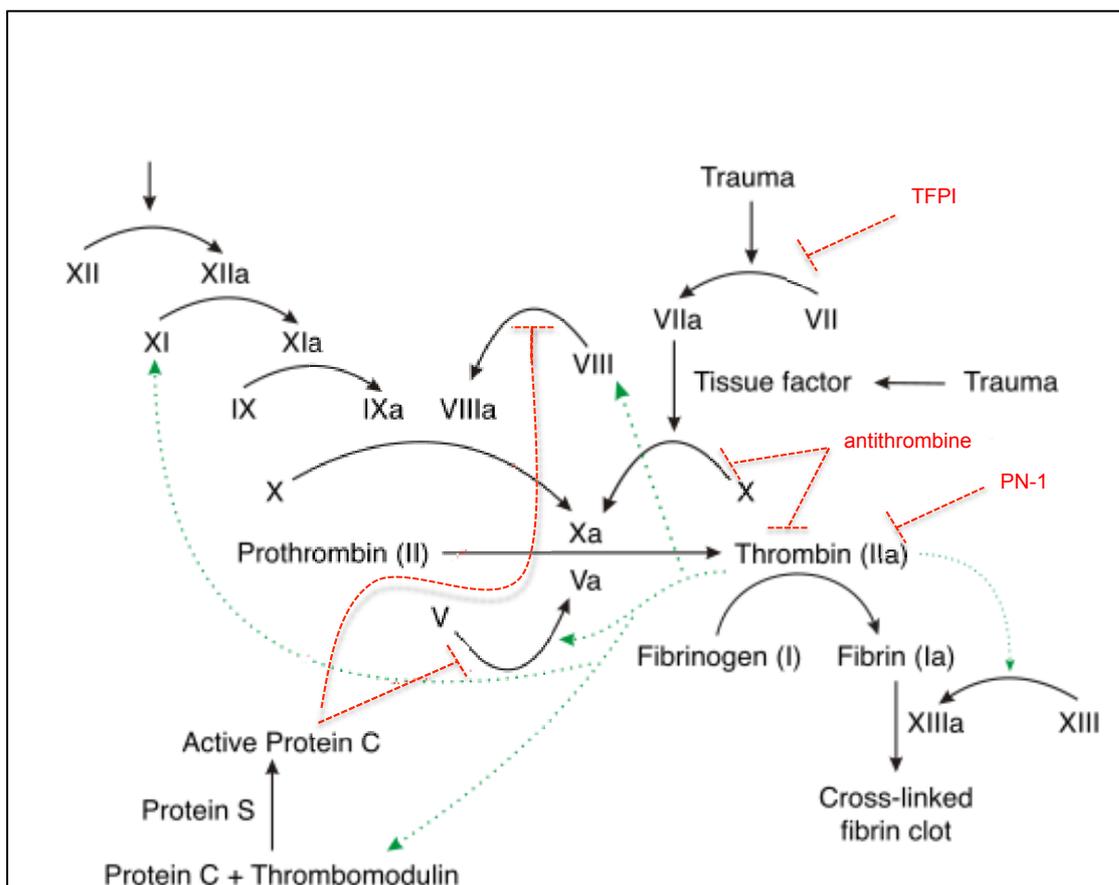
## 2. Régulation de la coagulation

Différents facteurs interviennent pour freiner le processus de coagulation lorsque le caillot n'est plus physiologiquement nécessaire : l'Antithrombine (AT), le TFPI, le système Protéine C-Protéine S et la protéase nexine-1 (PN-1).

- L'antithrombine (anciennement appelée antithrombine III) est une protéine circulante synthétisée par le foie qui inhibe principalement la thrombine, mais aussi les facteurs : FIXa, FXa, FXIa et FXIIa. Son action anti-coagulante est activée par les héparanes sulfates présents sur la paroi vasculaire. Son déficit entraîne des complications thrombotiques sévères et/ou répétées (thromboses veineuses et embolies pulmonaires).
- Le système Protéine C- Protéine S : la protéine C activée régule la coagulation en inactivant par protéolyse les facteurs Va et VIIIa permettant de contrôler la production du facteur Xa et de thrombine. La protéine C (PC) est synthétisée par le foie et circule sous forme inactive. La thrombine se fixe à la thrombomoduline (TM), un récepteur exprimé à la surface des cellules endothéliales. Le complexe thrombine/thrombomoduline active la protéine C.

L'action protéolytique de la protéine C nécessite la présence d'un cofacteur plasmatique : la Protéine S (PS). La synthèse des PC et PS est vitamine K-dépendante. Un déficit de PC engendre un état d'hyper coagulabilité, exposant les patients à un syndrome thromboembolique.

- Le TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) est une glycoprotéine sécrétée par les cellules endothéliales, mais aussi par le foie. Il inhibe l'activation du facteur X après inactivation du complexe FTVIIa/FT.
- PN-1 (protéase nexine-1) (Voir paragraphe II.3.A.c).



**Figure 9 : Voies de coagulation et régulation**

## Chapitre II : La Fibrinolyse

Dans des conditions physiologiques, le caillot formé a pour objectifs la réparation de la lésion vasculaire et la cicatrisation. Cette formation thrombotique doit ainsi avoir une durée de vie limitée et contrôlée. Ce contrôle est opéré par un processus qui s'engage dès le début de la fibrino-formation : la fibrinolyse.

La fibrinolyse (**Figure 10**) est un phénomène physiologique qui aboutit à la dégradation enzymatique du thrombus fibrino-plaquettaire. Ce processus fait intervenir essentiellement mais pas seulement une enzyme protéolytique : la plasmine. La plasmine provient d'un précurseur inactif, le plasminogène, qui est synthétisé par les hépatocytes. Cette protéine possède une grande affinité pour la fibrine sur laquelle elle se lie *via* les résidus lysines C-terminales, qui sont les principaux sites de liaison du plasminogène à la fibrine.

On schématise deux étapes. Dans un premier temps, la transformation du plasminogène en plasmine par les activateurs du plasminogène, suivie dans un second temps par la digestion de la fibrine par la plasmine.

L'activation du plasminogène dépend d'activateurs circulants et d'activateurs synthétisés et sécrétés *in situ* par les plaquettes, l'endothélium et les CML du vaisseau. Les deux principaux activateurs sont : l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), qui lie les résidus cationiques lysines libres de la fibrine formant un complexe ternaire fibrine-t-PA-plasminogène permettant une activation du plasminogène en plasmine, et l'urokinase (u-PA) produite et sécrétée de façon plus spécifique par les leucocytes.

La plasmine protéolyse le polymère fibrineux. Les produits de cette digestion enzymatique portent le nom de produits de dégradation de la fibrine (PDF). Leur dosage plasmatique est un signe indirect de l'action de la plasmine.

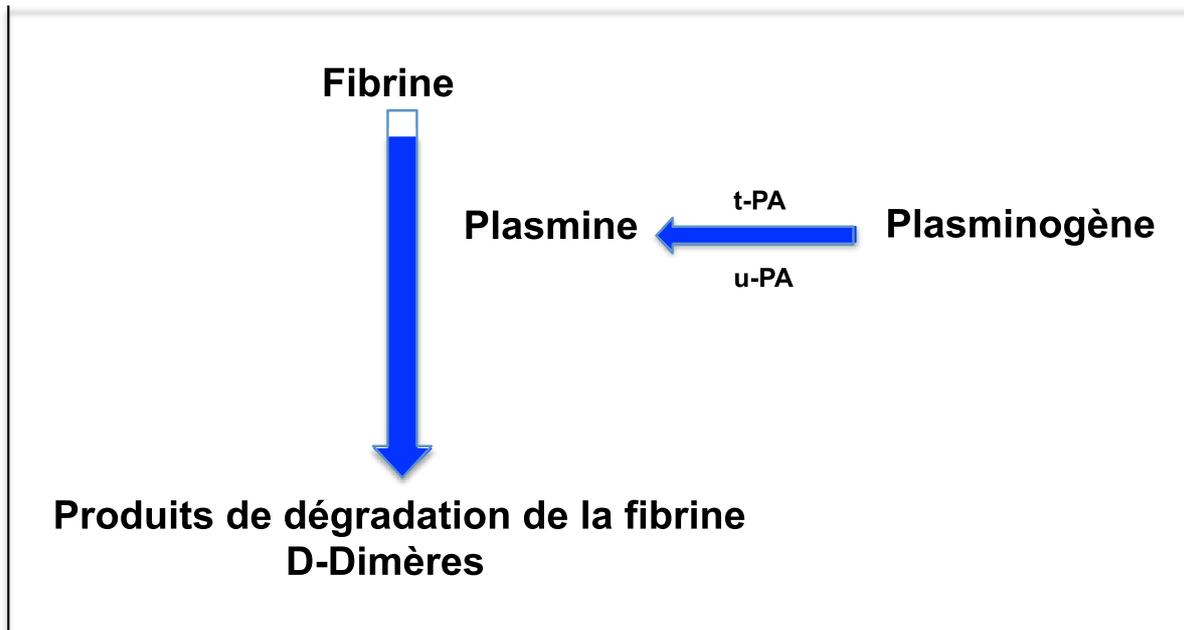


Figure 10 : Schéma de la fibrinolyse

## I. Les acteurs de la fibrinolyse

### 1. Plasminogène-plasmine [72]

Le plasminogène, précurseur inactif de la plasmine, est une glycoprotéine plasmatique monocaténaire de 92 kDa composée de 791 acides aminés et possédant 24 ponts disulfures. Le plasminogène est synthétisé par les hépatocytes, et est présent dans le plasma à une concentration comprise entre 1,5 et 2  $\mu\text{M}$ . Sa demi-vie plasmatique est de 2,5 jours.

La forme native du plasminogène a pour acide aminé N-terminal l'acide glutamique et est ainsi appelée « Glu-plasminogène ». Sous l'action de la plasmine, la région N-terminale est clivée et la forme écourtée est appelée « Lys-plasminogène ».

Cette modification induit un changement de la conformation du plasminogène, qui passe d'une conformation fermée à une conformation ouverte. Le « Lys-plasminogène » a plus d'affinité pour la fibrine, et présente une activation plus facile par ces activateurs, mais sa demi-vie plasmatique est plus courte (environ 20 heures).

Le Glu-plasminogène (**Figure 11**) est composé de sept domaines structuraux liés par des polypeptides de connections : un peptide N-terminal (NTP pour « N-terminal peptide », Glu<sub>1</sub>-Lys<sub>77</sub>), cinq domaines en boucles appelés « kringles » d'environ 80 acides aminés chacun (K1 à K5) et un domaine sérine-protéase en C-terminal (Val<sub>562</sub>-Asn<sub>791</sub>). Ce dernier renferme l'activité catalytique de la plasmine.

Les kringles K1 et K4 possèdent une très grande affinité pour la lysine. Cette affinité est assurée par la présence de « lysine binding site » (LBS), qui confèrent au plasminogène sa grande capacité à se fixer sur les résidus lysines carboxy-terminaux de la fibrine ainsi qu'à la membrane de certaines cellules *via* des protéines membranaires possédant des résidus lysines carboxy ou amino-terminaux tels que l'Annexine A2/S100A10 [73].

L'affinité du plasminogène augmente pour la fibrine dégradée. Cette dégradation expose plus de lysines C-terminales permettant plus d'interaction plasminogène-fibrine.

Les domaines kringles interviennent aussi dans l'interaction avec l' $\alpha$ 2-antiplasmine, inhibiteur physiologique de la plasmine (Voir partie II.3.B).

Une fois fixés sur la fibrine, les activateurs physiologiques du plasminogène (t-PA et u-PA) agissent par hydrolyse de la liaison Arg<sub>561</sub>-Val<sub>562</sub> du plasminogène pour donner naissance à la plasmine.

### • La plasmine

La plasmine est une molécule bicaténaire de 85 kDa (perte d'un peptide N-terminal) formée de deux chaînes A et B reliées par deux ponts disulfures. La chaîne A, ou chaîne lourde N-terminale (58 kDa), porte le site de fixation à la fibrine (les kringles) et la chaîne B, ou chaîne légère C-terminale (25 kDa), porte le site catalytique (His<sub>603</sub>, Asp<sub>646</sub>, Ser<sub>741</sub>).

La plasmine a un spectre d'action assez large. Outre la fibrinolyse (sa principale action) et la fibrinogénolyse, qui correspond à la dégradation du fibrinogène, la plasmine protéolyse d'autres facteurs du système de l'hémostase (les facteurs V, VIII, Von Willebrand) ainsi que certains composants de la MEC tels que la fibronectine et la vitronectine [74].

L'action de la plasmine sur la fibrine produit des fragments hétérogènes appelés produits de dégradation de la fibrine (PDF) qui sont spécifiques de la fibrine : les D-Dimères. Ces derniers sont utilisés comme marqueurs d'une activité thrombolytique.

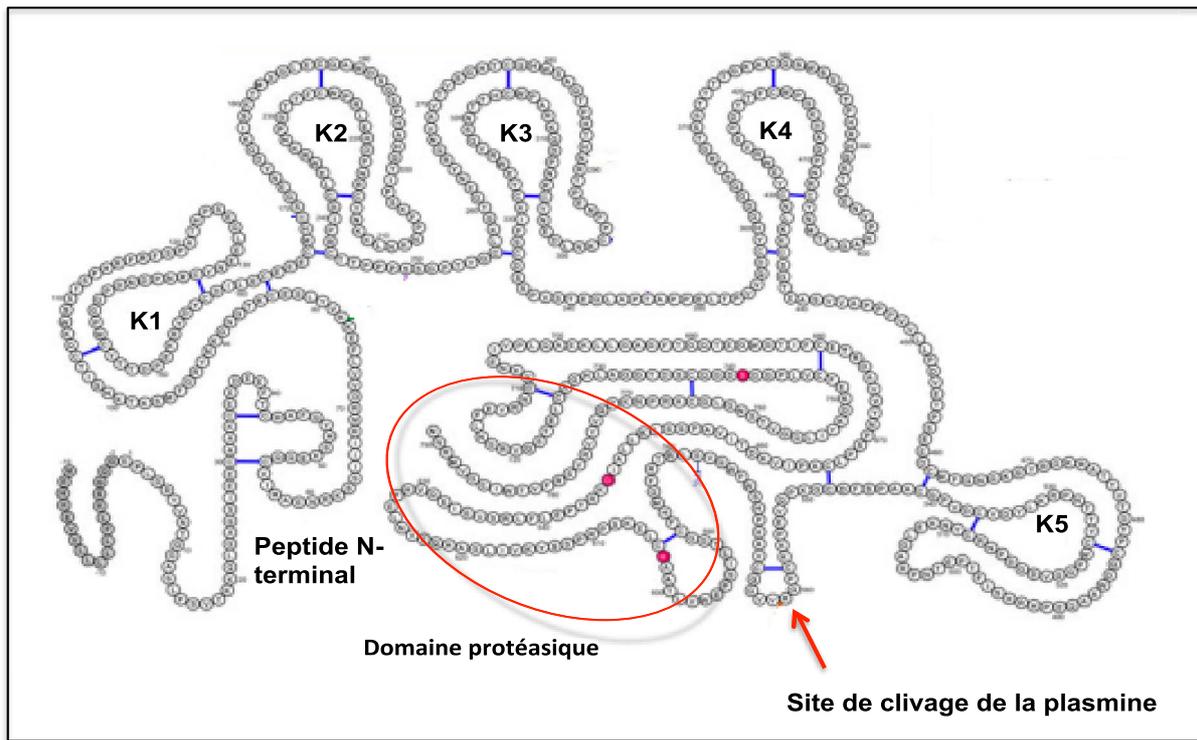


Figure 11 : Structure du plasminogène [75]

## 2. Les activateurs physiologiques du plasminogène

Il existe deux activateurs physiologiques du plasminogène : l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'urokinase (u-PA).

### A. L'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) [72]

Le t-PA (Figure 12), enzyme protéolytique initiant la fibrinolyse, est une glycoprotéine monocaténaire de 70 kDa composée de 527 acides aminés. Il est principalement produit par les cellules endothéliales, mais également par les CML, les monocytes, les mégacaryocytes et les neurones [76-79].

Il est composé de 5 domaines structuraux : à son extrémité N-terminale, un domaine « *finger* », un domaine « Epidermal Growth Factor-like » (EGF-like), deux domaines kringles (K<sub>1</sub> et K<sub>2</sub>), et, à l'extrémité C-terminale, un domaine sérine-protéase comprenant son site catalytique composé de la triade : His<sub>322</sub>, Asp<sub>371</sub>, Ser<sub>478</sub>. Chaque domaine assure une fonction spécifique telle que la liaison avec la fibrine, l'activité enzymatique, l'interaction cellulaire ou l'interaction avec les inhibiteurs.

La plasmine protéolyse le t-PA monocaténaire (sct-PA : single chain t-PA) au niveau du pont peptidique Arg<sub>275</sub>-Ile<sub>276</sub>, et donne naissance à un t-PA bicaténaire (tct-PA : twin chain t-PA).

Les deux formes du t-PA (sct-PA et tct-PA) présentent une activité enzymatique égale sur le plasminogène en présence de fibrine, tandis que l'activité du sct-PA est plus faible en l'absence de fibrine [80-82].

Le t-PA possède une grande affinité pour les résidus lysines N-terminaux de la fibrine. Cette affinité est portée principalement par le domaine «*finger*» et est augmentée en présence du plasminogène [83].

L'action du t-PA sur le plasminogène est potentialisée par la présence de fibrine. En sa présence, le t-PA devient un puissant activateur du plasminogène (1000 à 1500 fois plus puissant qu'en son absence). Cette importante activation peut s'expliquer par la formation du complexe ternaire fibrine-t-PA-plasminogène. Une proximité physique entre le t-PA et le plasminogène est nécessaire pour aboutir à son activation, proximité physique offerte sur la fibrine comme sur les complexes Annexine A2/S100 (présents à la surface cellulaire) par les plateformes lysines [84, 85].

La demi-vie plasmatique du t-PA est très courte, de l'ordre de 5 à 10 minutes chez l'homme et de 1 à 4 min chez le murin [86, 87]. Le t-PA libre ou complexé à son principal inhibiteur (PAI-1, plasminogen activator inhibitor -1) est rapidement éliminé de la circulation sanguine, clairance principalement hépatique faisant intervenir des récepteurs LRP (*Low-Density Lipoprotein Receptor- Related Protein*), récepteurs dits scavengers (éboueurs) [88] et des récepteurs au Mannose présents à la surface hépatique. Les récepteurs LRP peuvent fixer le t-PA seul au niveau de son domaine « EGF-like », ou complexé au PAI-1, puis les internaliser et les dégrader. Les récepteurs au Mannose fixent le t-PA libre *via* le domaine « kringle 1 », l'internalisent puis le dégradent [89, 90].

Il a été rapporté, dans les travaux de Noorman *et al.* une implication des macrophages dans l'internalisation et la dégradation du t-PA libre *via* des récepteurs au Mannose et des récepteurs LRP [91].

Le t-PA possède d'autres propriétés. Il joue un rôle dans les phénomènes inflammatoires (processus neuro-inflammatoires *via* l'activation des cellules microgliales [92], ainsi que la stimulation de la diapédèse dans la sclérose en plaques [93, 94]. Il est impliqué dans les phénomènes apoptotiques (anti-apoptotiques plus que pro-apoptotiques)

[89, 95, 96]. Il a également une action pro-angiogénique [97, 98], et un rôle dans la neuro-modulation (plasticité synaptique, neuro- et glio-transmission) [99-101].

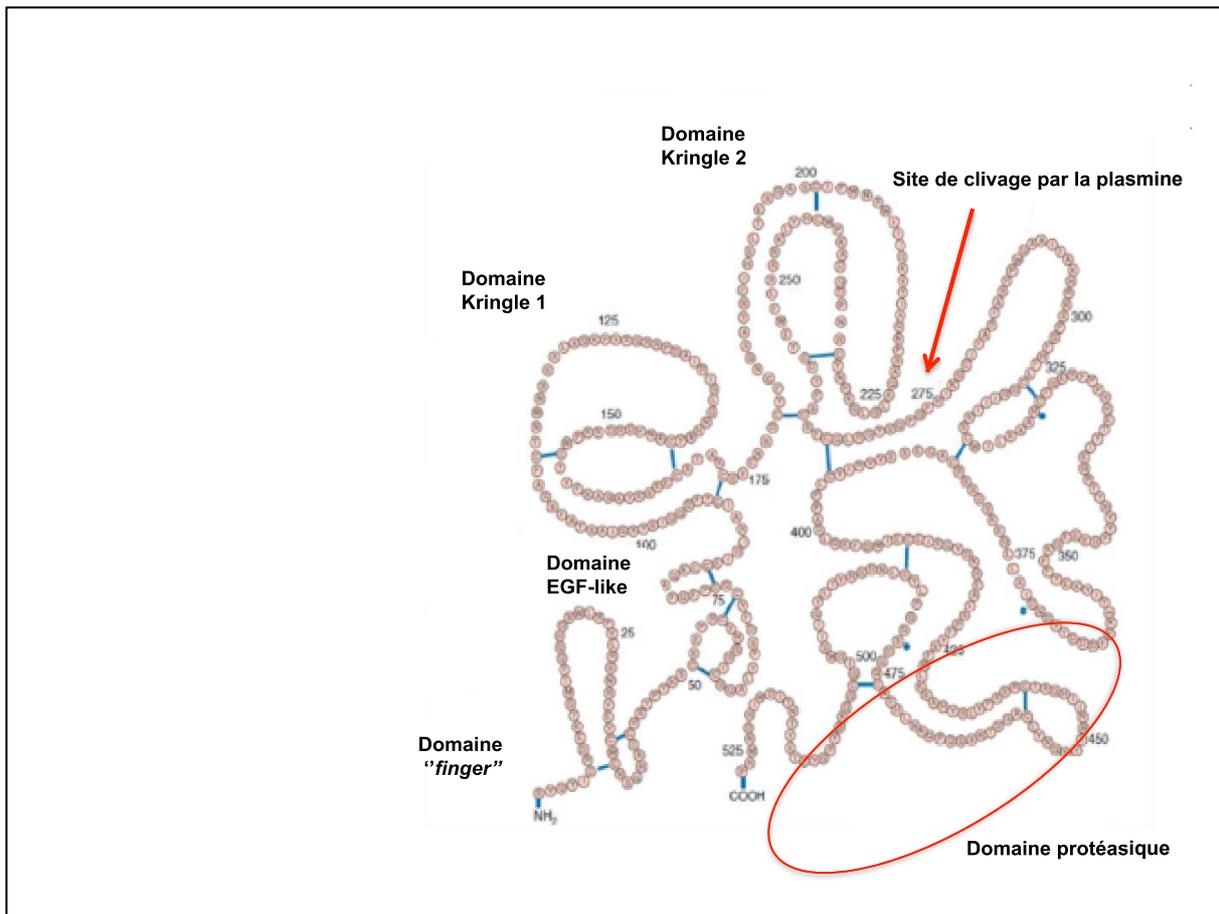


Figure 12 : L'activateur tissulaire du plasminogène [101]

## **B. Le système pro-urokinase (pro u-PA)/urokinase (u-PA) [72, 102]**

### **. La pro-urokinase (pro u-PA)**

La pro-urokinase (pro u-PA), précurseur de l'urokinase, est une sérine-protéase monocaténaire de 54 kDa composée de 411 acides aminés. Elle est sécrétée par différents types cellulaires : cellules endothéliales, cellules épithéliales, monocytes, neutrophiles et cellules tumorales.

La pro u-PA, possède 3 domaines structuraux : un domaine EGF en N-terminal qui interagit avec un récepteur cellulaire spécifique, un domaine Kringle qui n'a pas d'affinité pour la fibrine et un domaine sérine-protéase comprenant la triade catalytique « His<sub>204</sub>, Asp<sub>255</sub>, Ser<sub>356</sub> » à l'extrémité C-terminale. Cette forme est insensible aux inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAI-1 et PAI-2).

La pro u-PA ne se fixe pas sur la fibrine, et n'a que peu d'action sur le plasminogène. Son clivage au niveau de la liaison peptidique Lys<sub>158</sub>-Ile<sub>159</sub> par la plasmine, mais aussi par la kallikrein, la trypsine ou la cathepsine B permet de la convertir en forme bicaténaire active appelée « l'urokinase (u-PA) ».

### **. L'urokinase (u-PA)**

Issue de la protéolyse de la pro u-PA, elle est composée de deux chaînes A et B reliées par un pont disulfure (Cys<sub>194</sub>-Cys<sub>222</sub>). La chaîne A, ou chaîne légère (20 kDa), est composée de 158 acides aminés et contient le fragment amino-terminal (ATF) incluant le domaine EGF et le domaine kringle. La chaîne B, ou chaîne lourde (34 kDa), est composée de 253 acides aminés et contient la triade catalytique « His<sub>204</sub>, Asp<sub>255</sub>, et Ser<sub>356</sub> ». La plasmine peut également protéolyser la liaison peptidique Lys<sub>135</sub>-Lys<sub>136</sub>, et générer une forme écourtée de l'u-PA (33kDa), qui est toujours active, mais qui perd son site de liaison avec son récepteur cellulaire.

L'u-PA a peu d'affinité pour la fibrine, mais elle active le plasminogène en présence ou en l'absence de la fibrine. Ainsi le rôle de ce système dans la thrombolyse est considéré secondaire, après celui du t-PA. Au niveau de la membrane cellulaire, il existe un récepteur spécifique de la pro u-PA/u-PA : le récepteur u-PAR.

## **C. u-PAR**

L'u-PAR, ou CD87, est une protéine glycosylée dont la masse moléculaire varie entre 55 et 60 kDa. Il est synthétisé sous une forme polypeptidique comprenant 313 acides aminés, et est exprimé à la surface de plusieurs types cellulaires : monocytes-macrophages,

endothéliales, musculaires lisses, épithéliales, et les fibroblastes. La forme exprimée à la membrane contient 283 résidus et un glycolipide d'ancrage fusionné à sa partie carboxy-terminale. Il voit son expression régulée positivement en réponse à une stimulation par les cytokines inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ), les interleukines 1 et 2 (IL-1 et 2), et l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) [103].

L'interaction pro u-PA/u-PA avec le récepteur u-PAR assure une activation plus efficace du plasminogène lié aux résidus carboxy-terminaux des protéines membranaires. En revanche, elle n'empêche pas l'inhibition de l'u-PA par ses inhibiteurs spécifiques (les PAI) (Voir partie II.C.1). La plasmine formée à ce niveau exerce une action protéolytique sur certains composants de la MEC.

L'u-PAR lié à l'u-PA joue également un rôle dans la migration et l'adhésion cellulaires *via* la régulation de l'expression de différentes matrices metalloprotéinases (MMP) (Voir parties : 3.A.a, 3.A.b).

Le système u-PA/u-PAR joue un rôle important dans le cancer *via* la dégradation de la MEC et la modulation de la motilité cellulaire [104], ainsi que dans la biologie vasculaire *via* la modulation de l'angiogénèse et l'altération des CML dans l'athérosclérose [105].

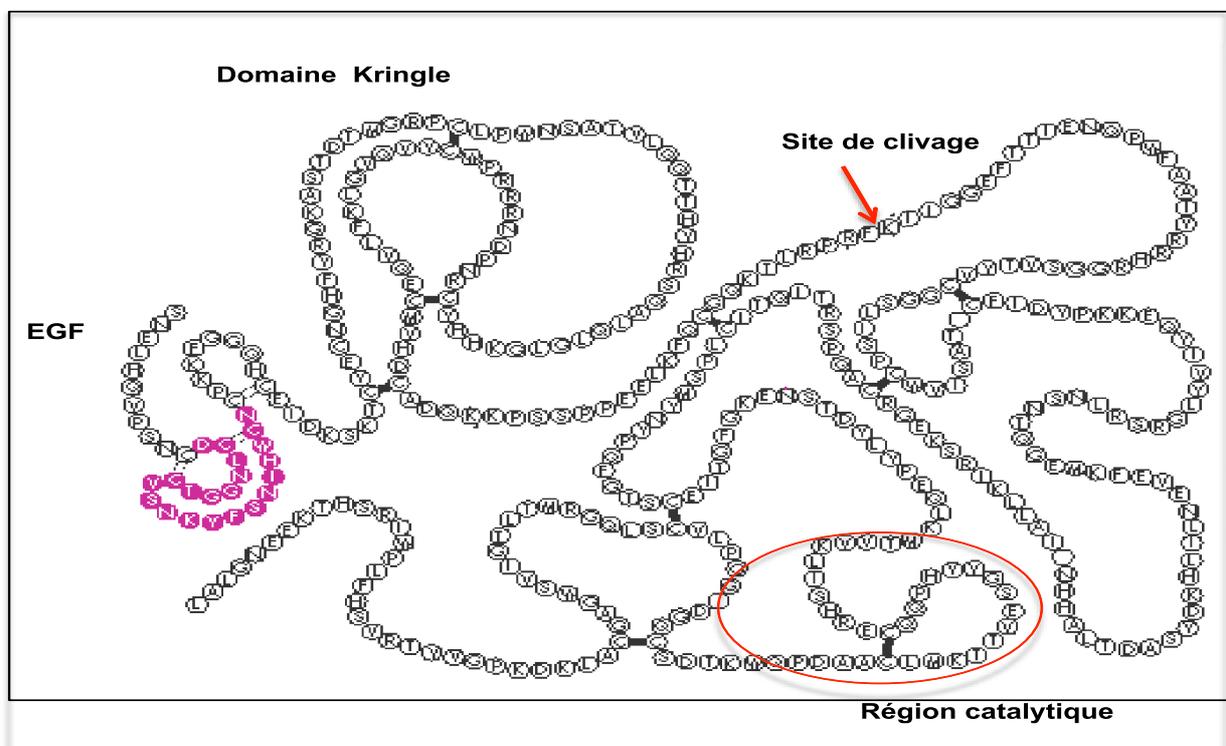


Figure 13 : L'urokinase [106]

La fibrinolyse est régulée par différents inhibiteurs physiologiques qui agissent soit en inhibant directement les activateurs du plasminogène, soit en inhibant directement ou indirectement la plasmine.

### 3. Les inhibiteurs de la fibrinolyse

#### A. Les inhibiteurs des activateurs du plasminogène

Leur action est dirigée principalement contre le t-PA et l'u-PA.

##### a. PAI-1 [72]

Le PAI-1, principal inhibiteur du t-PA et de l'u-PA, est une glycoprotéine monocaténaire de 52 kDa constituée de 379 acides aminés. Il fait partie de la super famille des serpins. Son site actif correspond à la liaison peptidique Arg<sub>346</sub>-Met<sub>347</sub>. Il est abondamment stocké et produit par les plaquettes qui le libèrent au cours de l'agrégation plaquettaire. Le PAI-1 plaquettaire représente 95% du PAI-1 circulant [107]. Présent en forte concentration au niveau du thrombus (accumulation et neosynthèse), il préviendrait la lyse prématurée du thrombus en cours de formation. La production de PAI-1 n'est pas uniquement plaquettaire, mais également assurée par d'autres cellules : endothéliales, monocytes-macrophages, hépatocytes, fibroblastes et adipocytes. Cette production peut être modulée par des stimuli extérieurs tels que la thrombine, le TGF $\beta$ , les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, et TNF $\alpha$ ) et l'endotoxine [103, 108]. Sa concentration plasmatique est de l'ordre de 400 pM. Elle est augmentée pendant la grossesse ou en pathologie dans le diabète.

Dans le plasma, le PAI-1 circule sous trois formes : (i) la forme inactive complexée aux activateurs du plasminogène, de demi-vie très courte, (ii) la forme active complexée au domaine somatomedine B de la vitronectine ou lié avec la protéine S et, (iii) la forme libre dite « latente » qui correspond à la perte d'activité de la forme active [109, 110].

Le PAI-1 n'interagit pas avec la pro u-PA mais il possède une grande affinité pour le t-PA (sous ces deux formes : sct-PA, tct-PA) et l'u-PA ( $K_i=10^7 M^{-1} sec^{-1}$ ), avec lesquels il forme rapidement un complexe réversible qui évolue progressivement, suite au clivage de son site actif, en complexe irréversible covalent inactif et stable [111]. La clairance de ces complexes s'effectue par internalisation *via* les récepteurs scavengers LRP. Cette internalisation permet une dégradation du PAI-1 ainsi que des activateurs du plasminogène. Malgré sa grande affinité pour le t-PA, le PAI-1 ne peut l'inhiber lorsque celui-ci est lié à la

fibrine. Il peut cependant inhiber l'u-PA liée aux cellules en formant le complexe u-PA/PAI-1/u-PAR, qui va être rapidement internalisé et dégradé, tandis que l'u-PAR sera recyclé.

Au-delà de son rôle principal de prévention d'une forte activité fibrinolytique plasmatique, le PAI-1 semble impliqué dans la régulation de la migration et de l'adhésion cellulaires. Sa complexation stabilisatrice avec la vitronectine empêche toute liaison u-PAR à la vitronectine et donc l'adhésion cellulaire à la MEC [112, 113].

#### **b. PAI-2 [114]**

Le PAI-2, de la super famille des serpinines, est une protéine monocaténaire composée de 393 acides aminés. Il inhibe principalement l'u-PA, réagit plus faiblement avec le t-PA, mais n'interagit pas avec la pro u-PA. Son site actif correspond à la liaison peptidique Arg<sub>358</sub>-Thr<sub>359</sub>. Il est produit principalement par les monocytes-macrophages, les trophoblastes placentaires et les cellules de fibrosarcome. Deux formes de PAI-2 ont été décrites : une forme intracellulaire (stockée) non glycosylée de 47 kDa, et une forme extracellulaire glycosylée de 60 kDa. Cette dernière est sécrétée sous l'action de certains stimuli comme la thrombine. Le PAI-2 est indétectable dans le plasma de sujets sains. Il l'est en revanche dans le plasma au cours de la grossesse et de certaines maladies tumorales. Il explique en partie le risque thrombotique durant la grossesse.

Des effets autres que la fibrinolyse ont été rapportés notamment un rôle modulateur des événements protéolytiques intracellulaires, et un effet protecteur dans le cancer *via* l'inhibition de l'u-PA qui est fortement impliquée dans la diffusion des cellules métastatiques [115].

#### **c. La protéase nexine-1 (PN-1)**

La PN-1, appelée aussi glial-derived nexin (GDN), est une glycoprotéine d'environ 43 kDa, qui appartient à la famille des serpinines. Cette serpine a un large spectre, inhibe la thrombine, mais aussi des sérines-protéases telles que la plasmine et les activateurs du plasminogène (t-PA, u-PA), en formant des complexes covalents PN-1/sérine-protéase [116-118]. Ces complexes sont internalisés *via* les récepteurs scavengers LRP, puis dégradés.

La PN-1 est produite et sécrétée par de très nombreux types cellulaires : cellules gliales dans le cerveau [119], cellules endothéliales, plaquettes, cellules musculaires lisses [120, 121]. Elle est aussi exprimée dans plusieurs tissus : reins, rate, foie, cœur et poumons [122]. Au

contraire du PAI-1, la PN-1 est peu diffusible du fait de sa liaison au glycosaminoglycane (GAG) péri-cellulaire. Cette propriété fait du PN-1 une antiprotéase tissulaire.

#### **d. La neuroserpine [123]**

La neuroserpine, de la super famille des serpinines, est une glycoprotéine de 55 kDa constituée de 410 acides aminés. Elle est exprimée principalement par les neurones du système nerveux central et périphérique, surtout à la fin du développement lors de la migration des neurones et de la formation des synapses. Elle est également exprimée dans le pancréas, les reins, le cœur et les testicules. Elle inhibe principalement et préférentiellement le t-PA avec lequel elle forme un complexe covalent, stable et irréversible [124-126]. Les complexes neuroserpine/t-PA sont internalisés *via* les récepteurs scavengers LRP, puis dégradé [127]. La localisation de la neuroserpine dans le cerveau correspond à la zone où est exprimé le t-PA. Chez les patients touchés par un infarctus cérébral, la neuroserpine a un effet protecteur en inhibant l'excitotoxicité et l'inflammation qui peuvent être causées par le t-PA [128].

### **B. Les inhibiteurs de la plasmine**

#### **a. L' $\alpha$ 2-antiplasmine [72, 129]**

L' $\alpha$ 2-antiplasmine ( $\alpha$ 2-AP), de la super famille des serpinines, est le principal inhibiteur physiologique circulant de la plasmine ( $K_i=10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). C'est une glycoprotéine monocaténaire d'environ 70 kDa composée de 464 acides aminés. Son site actif correspond à la liaison peptidique Arg<sub>376</sub>-Met<sub>377</sub>. Elle est synthétisée principalement par le foie avec une concentration plasmatique de l'ordre de 1  $\mu\text{M}$ , et une demi-vie plasmatique de 3 jours. Son taux diminue lors d'une affection hépatique sévère. Son action inhibitrice sur la plasmine se fait en deux étapes. Dans un premier temps, l' $\alpha$ 2-AP se fixe sur le domaine K1 de la plasmine *via* ses résidus carboxy-terminaux. Cette réaction rapide conduit à la formation d'un complexe inactif, mais réversible. Dans un second temps, la plasmine, *via* le résidu sérine de son site catalytique, clive son inhibiteur au niveau de la liaison peptidique Arg<sub>354</sub>-Met<sub>355</sub> et libère un peptide de 11 kDa. De ce fait, un pont se crée entre le résidu arginyl de l'inhibiteur et le résidu seryl du site actif de la plasmine, aboutissant à la formation d'un complexe irréversible et inactif.

L' $\alpha$ 2-AP assure aussi d'autres fonctions anti-fibrinolytiques indirectes. Sous l'action du FXIIIa, elle se lie de façon covalente avec la fibrine, rendant la fibrinolyse plus difficile [130]. Possédant des domaines de liaison à la fibrine, elle limite aussi la fixation du plasminogène sur la fibrine, en agissant comme inhibiteur compétitif du plasminogène.

#### **b. L' $\alpha$ 2 macroglobuline**

L' $\alpha$ 2 macroglobuline (A2M) est une glycoprotéine de 725 kDa synthétisée par le foie avec une action inhibitrice lente sur la plasmine [131]. Les macroglobulines suppléent à l' $\alpha$ 2-AP lorsque le pouvoir inhibiteur de celle-ci est dépassé.

#### **c. Le TAFI (*Thrombin-Activatable Fibrinolyses Inhibitor*) [72]**

Le TAFI est une procarboxypeptidase B plasmatique de 60kDa, appartenant à la famille des carboxypeptidases B (metalloproteinase à zinc), et composée de 401 acides aminés. Il est synthétisé par le foie, et est présent dans le plasma où il circule sous forme liée au plasminogène. Son activité protéolytique est exercée par sa forme activée TAFIa, suite à un clivage au niveau de la liaison peptidique Arg<sub>92</sub>-Ala<sub>93</sub>. La demi-vie plasmatique de ce dernier est très courte, d'environ 10 minutes. Ce clivage activateur est assuré principalement par la thrombine ou la plasmine. L'activation par la thrombine, calcium-dépendante, est fortement potentialisée en présence de thrombomoduline [132, 133], contrairement à l'activation par la plasmine qui est calcium indépendante [134].

Le TAFIa assure son activité anti-fibrinolytique par le clivage des terminaisons lysines C-terminales exposées à la surface de la fibrine, ainsi que les terminaisons lysines C-terminales à la surface des cellules, ce qui empêche le plasminogène de se fixer.

Le TAFIa, à forte concentration, peut interagir avec la plasmine et l'inhiber directement.

#### **d. HRGP (*histidin rich glycoprotéine*)**

C'est une glycoprotéine de 75 kDa synthétisée principalement par le foie, et peut également être synthétisée par les macrophages et les mégacaryocytes. Son action inhibitrice ressemble à celle de l'acide epsilon-amino caproïque (EACA), formant un complexe réversible avec le plasminogène plasmatique, ce qui réduit la quantité du plasminogène capable de se lier à la fibrine [135].

## Chapitre III : Complications thrombotiques

Dans certaines conditions pathologiques, la fibrinolyse naturelle est dépassée par une surcoagulation ou par des dérégulations au niveau de la triade de Virchow. Ce processus entraîne la formation inappropriée d'un caillot dans une cavité vasculaire (cœur, artères, veines ou capillaires) qui aboutit à une thrombose. La thrombose peut s'étendre localement et/ou engendrer des complications emboliques à distance.

### . Les thromboses veineuses

Les thromboses veineuses sont principalement déclenchées par une stase sanguine (avec un flux nul ou quasiment nul) et/ou un état d'hypercoagulabilité.

. **L'état d'hypercoagulabilité** : ce terme est utilisé pour désigner des conditions favorisant un état procoagulant en raison de déséquilibres dans les mécanismes hémostatiques tels que l'activation des facteurs de coagulation, ou bien un déficit héréditaire en antithrombine III, la voie de protéine C, ou un déficit en facteurs fibrinolytiques, qui jouent un rôle majeur dans la thrombose veineuse.

. **La stase** : une association entre la stase et la thrombose veineuse a longtemps été reconnue la base d'un certain nombre d'observations cliniques. Ce ralentissement de flux veineux s'observe dans les conditions d'immobilisation prolongées telles que l'état post opératoire ou l'immobilité prolongée durant un vol. Le mécanisme potentiel par lequel la stase prédispose la thrombose veineuse est une induction d'une hypoxie relative permettant l'exocytose de la P-sélectine endothéliales accompagnée d'une libération accrue de vWF endothéliales. Ceci favorise un recrutement des plaquettes ainsi qu'un relargage du FT par les monocytes permettant de déclencher la coagulation (Voir Chapitre IV). Plus récemment, il a été mis en évidence un rôle probablement prépondérant de l'interaction cellules endothéliales/ neutrophiles en pathologie veineuse, incluant la thrombose [136]. Les neutrophiles sont constitutionnellement porteurs du PSGL-1 ligand saccharidiques de la P-sélectine. Les neutrophiles activés et marginés forment des filaments (Neutrophil Extracellular Traps, NETs) de chromatine (ADN+histones) sur lesquels se lient les enzymes cytosoliques pro-oxydant (MPO) et protéolytique (elastase). Ces structures activent la coagulation.

Les complications thrombotiques veineuses sont dominées par la thrombose veineuse profonde appelée aussi « phlébite » et qui correspond à la formation d'un caillot dans un

réseau veineux profond des membres inférieurs principalement. Ce caillot peut migrer jusque dans le réseau artériel pulmonaire et provoquer une complication potentiellement fatale : l'embolie pulmonaire (EP).

### **. Les thromboses artérielles**

Les thromboses artérielles se développent dans des conditions de forces de cisaillements élevées sur l'endothélium, où les plaquettes jouent un rôle majeur dans l'initiation et la propagation de la thrombose. La cause principale est l'athéromatose.

L'érosion de la plaque d'athéromatose expose les matériaux procoagulants, tels que le FT, les phospholipides membranaires, le collagène, permettant la formation du thrombus. Il est à noter que la composition de la plaque plutôt que sa taille ou même de la gravité de la sténose est plus importante pour la thrombose. Contrairement à la thrombose veineuse, l'activation des facteurs de coagulation ne semble pas jouer un rôle majeur dans la thrombose artérielle car ces facteurs sont susceptibles d'être éliminés par le débit élevé dans le système artériel. Par contre la reconnaissance du collagène sous-endothélial exposé interagit avec la GPVI plaquettaire et provoque l'activation et l'agrégation plaquettaire, exposant la P-sélectine et initiant la coagulation.

La complication principale est la nécrose ischémique de l'organe auquel l'artère est destinée : par exemple l'infarctus du myocarde (IDM), l'accident vasculaire cérébral ischémique (AVC ischémique) en cas d'atteinte dans le territoire artériel coronaire ou carotidien, respectivement.

L'AVC ischémique, l'IDM et l'EP sont des complications thromboemboliques majeures qui représentent la première cause de morbidité et de mortalité chez l'homme dans le monde selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)<sup>1</sup>.

Dans ces situations, l'urgence thérapeutique est la désobstruction vasculaire pour limiter les effets délétères de l'ischémie tissulaire mais aussi ceux d'une reperfusion tardive, source de toxicité cellulaire radicalaire [137]. Ainsi dans le cadre de certaines urgences vasculaires cliniques, la FDA (*Food and Drug Administration*, USA) recommande une intervention appelée la thrombolyse thérapeutique<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> [www.who.int/media-centre/factsheets/fs310/en/2014](http://www.who.int/media-centre/factsheets/fs310/en/2014)

<sup>2</sup> [www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsafdata/index.cfm/en/2014](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsafdata/index.cfm/en/2014)

## **I. La thrombolyse thérapeutique**

La thrombolyse thérapeutique correspond à la dissolution d'un caillot obstruant un vaisseau sanguin par un agent thrombolytique, administré principalement par voie intraveineuse (IV), qui active le plasminogène en plasmine afin de dégrader la fibrine. Depuis 2010, plusieurs agents thrombolytiques ont été développés. Les molécules approuvées pour l'usage clinique sont :

- Les streptokynases (SK),
- l'urokinase de synthèse (UK),
- et les recombinants tissue plasminogen activators (rt-PA) : alteplase, tenecteplase et reteplase.

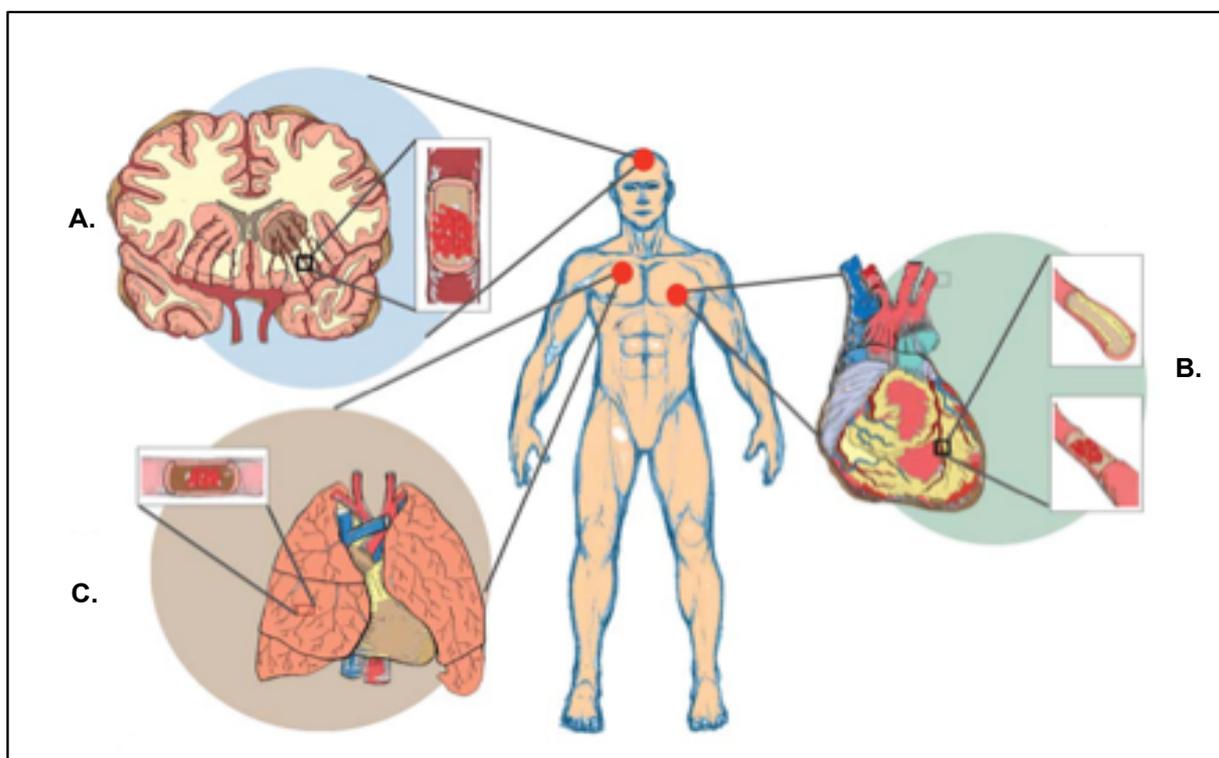
Les SK, agents thrombolytiques dits « de première génération », économiques, sont des produits de synthèse bactérienne (streptocoques principalement). Ils sont utilisés dans certains cas d'IDM ou d'EP. Les SK ne sont pas spécifiques de la fibrine et ne sont pas capables de localiser leur action sur le thrombus. Cependant, ils lient le plasminogène et sont donc fibrinogénolytiques [138]. L'UK, agent thrombolytique dit « de première génération » également, est utilisé dans certains cas d'IDM et d'EP. En plus de son incapacité à localiser l'action de la plasmine sur le thrombus, sa production est plus difficile et son coût de production reste très élevé [139].

Les rt-PAs, analogues du t-PA, sont des sérines-protéases produites par génie génétique. Ils ont une demi-vie plasmatique supérieure à celle du t-PA, une résistance au PAI-1 ainsi que la propriété de se fixer sur la fibrine [140].

La non spécificité des SK et de l'UK à la fibrine et leur effet fibrinogénolytique ont fait du rt-PA l'agent thrombolytique le plus utilisé en thérapie thrombolytique, d'où l'intérêt porté pour cette molécule dans notre travail de recherche.

## II. Les Utilisations cliniques actuelles du rt-PA (Figure14)

Le rt-PA est approuvé pour le traitement de l'EP massive aiguë depuis 1990 et pour l'IDM depuis 1987 [141]. Concernant l'ischémie cérébrale, l'utilisation du rt-PA a été autorisée aux Etats Unis par la FDA en 1996 après l'étude clinique NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) [142] et en Europe en 2002 par l'Agence Européenne de Médicament (EMA) après les études ECASSI et ECASSII (European Cooperative Acute Stroke Study I et II) [143, 144] qui ont évalué son efficacité .



**Figure 14 : Recommandation du rt-PA dans la clinique**  
**[140]**

**A.** Accident vasculaire cérébrale ischémique (AVC ischémique). **B.** Infarctus du myocarde (IDM). **C.** Embolie pulmonaire (EP)

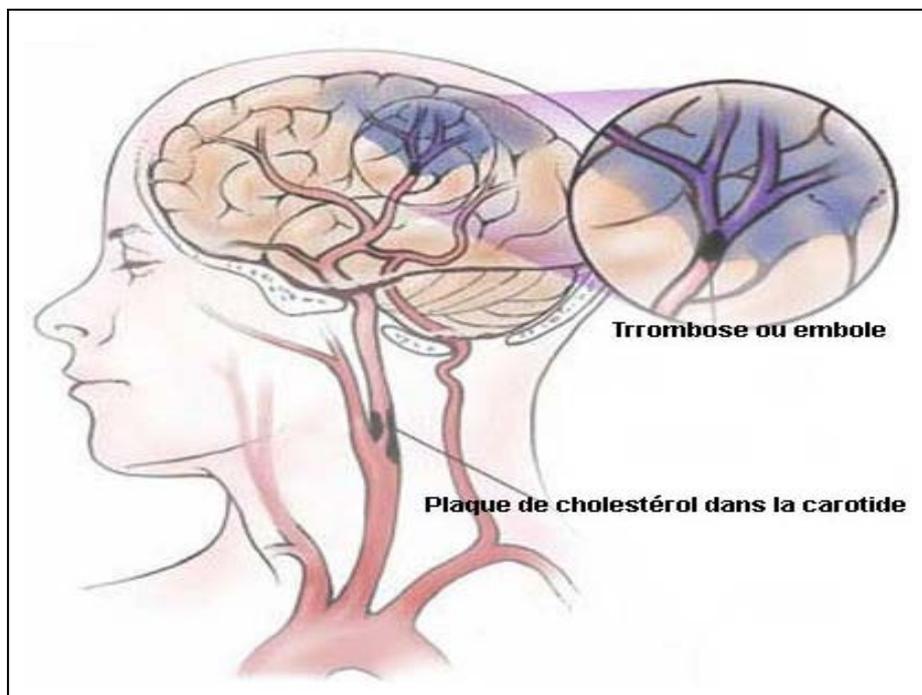
## 1. Accident vasculaire cérébrale ischémique

L'accident vasculaire cérébral est un problème majeur de santé publique. Il est la 1<sup>ère</sup> cause de handicap moteur, la 2<sup>ème</sup> cause de démence, et la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité dans les pays industrialisés. Selon les données de l'OMS en 2012, 6,7 millions de personnes décèdent chaque année des suites d'un AVC<sup>1</sup>.

En France, l'incidence des AVC est de 100 000 à 150 000 nouveaux cas par an, soit 400 cas par jour ou un cas toutes les 5 minutes. L'accident vasculaire cérébral est devenu un motif d'hospitalisation plus fréquent que l'IDM. Il y a deux types d'AVC : ischémique (85%) et hémorragique cérébral (15%) [145].

Dans notre travail de recherche, nous nous intéresserons à l'AVC ischémique.

L'AVC ischémique est la conséquence d'un défaut d'apport de sang artériel oxygéné dans un territoire cérébral aboutissant à une dette métabolique (oxygène et glucose), ce qui provoque la mort des cellules cérébrales. Il est causé par l'occlusion d'un vaisseau cérébral (artère cérébrale moyenne par exemple) ou à destination cérébrale (carotide) par la formation locale d'un thrombus sur une lésion endothéliale telle qu'une plaque d'athérome, ou à partir d'un embolie secondaire à la rupture d'une plaque d'athérosclérose ou à une cardiopathie emboligène (**Figure 15**).



**Figure 15 : Accident vasculaire cérébral ischémique**

<sup>1</sup> [www.who.int/media-centre/factsheets/fs310/en/2014](http://www.who.int/media-centre/factsheets/fs310/en/2014)

## **A. Traitement des AVC ischémiques**

Le traitement des AVC ischémiques repose principalement sur la recanalisation des vaisseaux occlus, permettant la reperfusion du territoire ischémié et de prévenir les complications. La thrombolyse IV par le rt-PA est le traitement d'urgence de référence des AVC ischémiques. Il est d'ailleurs le seul traitement médicamenteux qui améliore significativement le pronostic fonctionnel et vital des patients [142-144, 146]. Les recommandations internationales proposent l'usage du rt-PA dans une fenêtre d'administration de 4 heures et demie suivant le début des symptômes [147]. Dans ce contexte, le rt-PA est d'autant plus efficace qu'il est administré précocement [148].

D'autres thérapies sont en cours d'évaluation, principalement en cas d'occlusion d'un gros vaisseau : la thrombolyse intra-artérielle (IA) *in situ* (administration de l'agent thrombolytique au contact direct du caillot après cathétérisme artériel), et la thrombectomie chirurgicale ou percutanée (extraction mécanique du caillot) qui représente une avancée thérapeutique majeure dans la prise en charge des AVC ischémiques [149]. Cette dernière est envisagée en complément d'une thrombolyse IV ou en alternative thérapeutique chez les patients ayant une contre-indication à la thrombolyse IV [150, 151].

## **B. Limites de la thrombolyse IV par le rt-PA**

En dépit de ses bénéfices, la thrombolyse thérapeutique présente plusieurs limites.

La première limite du rt-PA est sa fenêtre d'administration très étroite. En effet, seuls 3 à 5% des patients victimes d'AVC ischémique sont concernés par l'indication à ce traitement [152].

De plus, l'administration du rt-PA comporte plusieurs risques potentiels avérés, notamment hémorragiques et neurotoxiques.

Ainsi, la transformation hémorragique de l'infarctus cérébral est multipliée par 10 pour atteindre les 6% des cas suite à l'administration du rt-PA [153]. Le risque de transformation hémorragique est cependant lié à d'autres facteurs tels que l'âge, le diabète, le délai d'administration du rt-PA, l'hypertension artérielle.

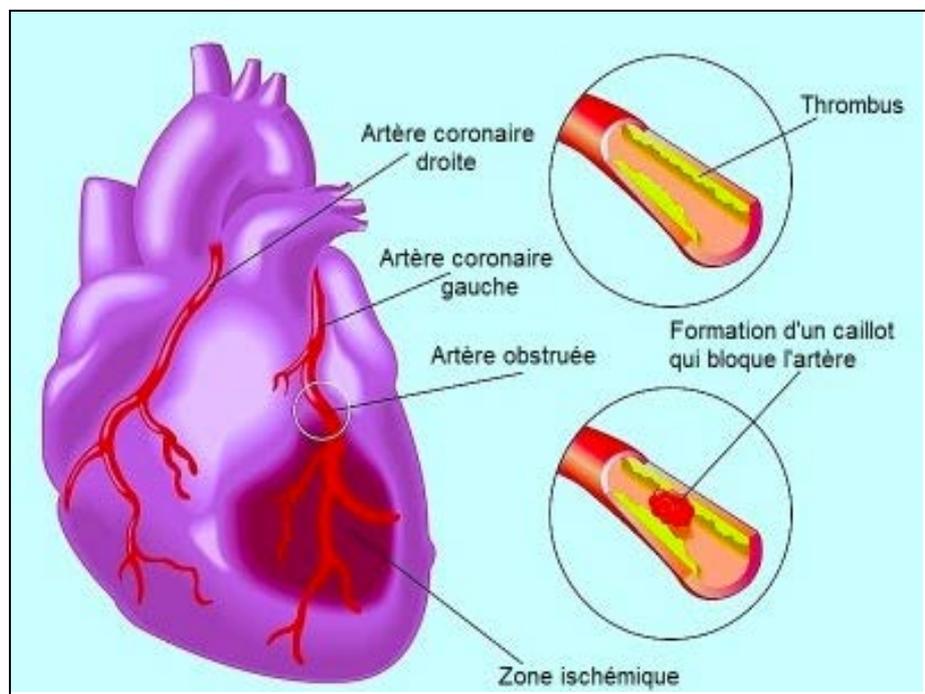
Le rt-PA pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), intacte ou altérée par l'ischémie, peut exercer une toxicité au niveau du système nerveux *via* la majoration des phénomènes d'excitotoxicité favorisée par son interaction avec les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) au glutamate [154].

De plus, le rt-PA et la plasmine générée par son activité pourraient augmenter le taux d'activation des MMP aggravant la mort neuronale (apoptose) par protéolyse péricellulaire [155].

## 2. Infarctus du myocarde (IDM)

L'IDM est une nécrose ischémique du muscle cardiaque (myocarde), conséquence de sa privation en oxygène. Il résulte de l'occlusion de l'artère coronaire par un thrombus suite à une fracture d'une plaque d'athérosclérose activant l'agrégation plaquettaire (**Figure 16**). Du fait de l'activité constante de l'automatisme cardiaque, la dette métabolique est immédiate entraînant une nécrose tissulaire précoce. La nécrose cardiomyocytaire entraîne une insuffisance contractile et rythmique à l'origine d'insuffisance cardiaque ou dysrythmies pouvant se compliquer du décès.

Selon des données de l'OMS, sur 50 millions de décès annuels dans le monde, les cardiopathies ischémiques représentent la première cause de décès avec 7,2 millions de décès d'origine coronaire (chiffre 2012)<sup>1</sup>. En France, l'IDM est une manifestation très fréquente des thromboses artérielles avec une incidence qui reste encore très élevée (environ 120 000 cas/an). La mortalité est précoce, 10 à 12 % des victimes décédant dans l'heure qui suit les premiers signes cliniques.



**Figure 16 : Infarctus du myocarde**

<sup>1</sup> [www.who.int/media-centre/factsheets/fs310/en/2014](http://www.who.int/media-centre/factsheets/fs310/en/2014)

### **A. Traitement de l'IDM**

Les approches thérapeutiques actuelles ont pour objectif de rétablir la perméabilité du vaisseau occlus dans les plus brefs délais, afin de limiter la nécrose et de prévenir les complications. Pour rétablir la perméabilité du vaisseau occlus, deux options thérapeutiques sont disponibles : la thrombolyse IV et l'angioplastie [156].

La thrombolyse par administration IV du rt-PA est une méthode de revascularisation recommandée par les sociétés savantes, indiquée en médecine pré-hospitalière lorsque le temps écoulé entre le début des symptômes et l'hospitalisation du patient risque de dépasser 90 minutes. Lorsqu'une unité de cardiologie interventionnelle est accessible en deçà de ce délai, il est préférable de proposer une angioplastie. L'angioplastie consiste en une reperméabilisation mécanique du vaisseau sanguin occlus par une dilatation coronaire par un ballonnet, consolidée par la pose d'un stent. L'étude "TRANSFER" AMI trial (Trial of Routine Angioplasty and Stenting after Fibrinolysis to Enhanced Reperfusion in Acute Myocardial Infarction) a démontré l'effet bénéfique de thérapeutiques combinant une administration IV du rt-PA suivie d'une angioplastie [157]. Leur usage reste cependant encore peu répandu et limité.

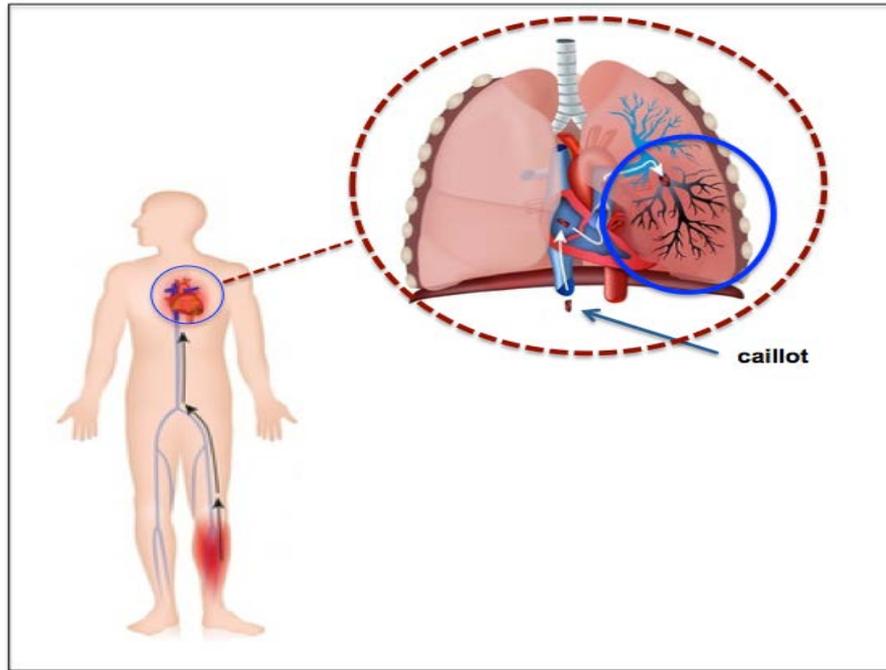
### **B. Limites de la thrombolyse IV par le rt-PA**

L'étude STEMI (ST-segment Elevation Myocardial Infarction) a démontré que l'une des complications majeures de la thrombolyse IV par le rt-PA dans l'IDM est l'hémorragie cérébrale qui survient dans 1% des cas [158].

## **3. Embolie pulmonaire (EP)**

L'EP est une complication thromboembolique veineuse. Elle se réfère à l'obstruction d'une artère ou d'une ramification artérielle irriguant les poumons par un caillot circulant. Ce caillot, formé au niveau d'une veine profonde, se détache et migre jusqu'à l'artère pulmonaire et ses ramifications (**Figure 17**). Les complications pulmonaires (diminution des échanges gazeux, œdème et infarctus pulmonaire) et hémodynamiques (insuffisance du ventricule droit) peuvent mettre en jeu le pronostic vital du patient.

En France, son incidence annuelle est estimée à plus de 60 cas pour 100000 personnes [159]. Ces chiffres sont probablement sous-estimés compte tenu des difficultés diagnostiques encore rencontrées en pratique. En effet, certains arrêts cardiaques inexplicables pourraient être secondaires à une EP proximale non identifiée [160].



**Figure 17 : Embolie pulmonaire**

### **A. Traitement de l'EP**

La thrombolyse IV est le traitement de première intention des EP graves menaçant le pronostic vital immédiat [161]. En dissolvant le thrombus, elle permet une diminution des pressions artérielles pulmonaires et l'amélioration du débit cardiaque.

Les études pionnières dirigées principalement par Goldhaber et Buneameux ont mis en évidence l'effet bénéfique d'une thrombolyse IV par le rt-PA dans le cas d'une embolie pulmonaire grave [162-166].

Plus récemment, l'étude PEITHO, qui a comparé la thrombolyse IV par rt-PA à un placebo dans une population de 1005 patients présentant une EP grave (massive), était également en faveur d'une thrombolyse IV au rt-PA [167].

L'embolectomie chirurgicale, ou l'extraction mécanique, permet aujourd'hui de l'envisager comme une alternative efficace en cas de contre-indication ou d'échec de la thrombolyse IV.

### **B. Limites de la thrombolyse IV par le rt-PA**

Une réponse à la thrombolyse par le rt-PA est rapportée chez 92 % des patients. Elle est cependant compliquée d'une hémorragie : 2% d'hémorragies cérébrales et 13% d'hémorragies majeures (hémorragies digestives potentiellement fatales et musculaires profondes) [161].

## Chapitre IV : Ciblage moléculaire du thrombus

Si l'utilisation du rt-PA est une stratégie thérapeutique recommandée dans des indications bien ciblées, des méthodes adjuvantes pourraient en augmenter les bénéfices sans en augmenter les risques et seraient d'un intérêt considérable dans le traitement des maladies thrombotiques aiguës. Notre projet de recherche s'inscrit dans le cadre du développement d'un adjuvant capable de vectoriser le rt-PA au thrombus.

Cibler le thrombus permettrait de vectoriser le rt-PA particulièrement au thrombus riche en plaquettes dans le but d'augmenter son rendement fibrinolytique et de diminuer ses effets délétères. Afin de cibler le thrombus, il est nécessaire dans premier temps d'identifier les composantes et les cibles potentielles. Deux constituants clés semblent être prometteurs : la fibrine et les plaquettes.

Dans le premier chapitre nous avons vu que l'activation plaquettaire exposait une grande quantité de P-sélectine à la surface du thrombus. D'où l'intérêt porté sur la P-sélectine dans notre travail de recherche.

### I. La P-sélectine : une cible potentielle ?

La P-sélectine, appelée aussi CD62P et GMP 140, est une glycoprotéine de surface de 84 kDa composée de 768 acides aminés. Elle est stockée dans les granules  $\alpha$  des plaquettes non activées, et dans le corps de Weibel-Palade (WP) des cellules endothéliales non activées [168, 169]. Elle est exprimée par ces cellules de façon inductible, suite à leur activation, à raison de 10 000 molécules/plaquette activée [170].

Lors de l'activation de ces cellules par des agonistes tels que la thrombine, l'histamine, ou des cytokines (IL-4, IL-13) pour les cellules endothéliales, ou tels que l'ADP, le collagène, et la thrombine pour les plaquettes, la P-sélectine est rapidement transloquée à la surface membranaire. Cette expression est permise par la fusion des granules ( $\alpha$  et WP) avec la membrane plasmique. La P-sélectine est d'ailleurs utilisée comme un marqueur de l'activation plaquettaire.

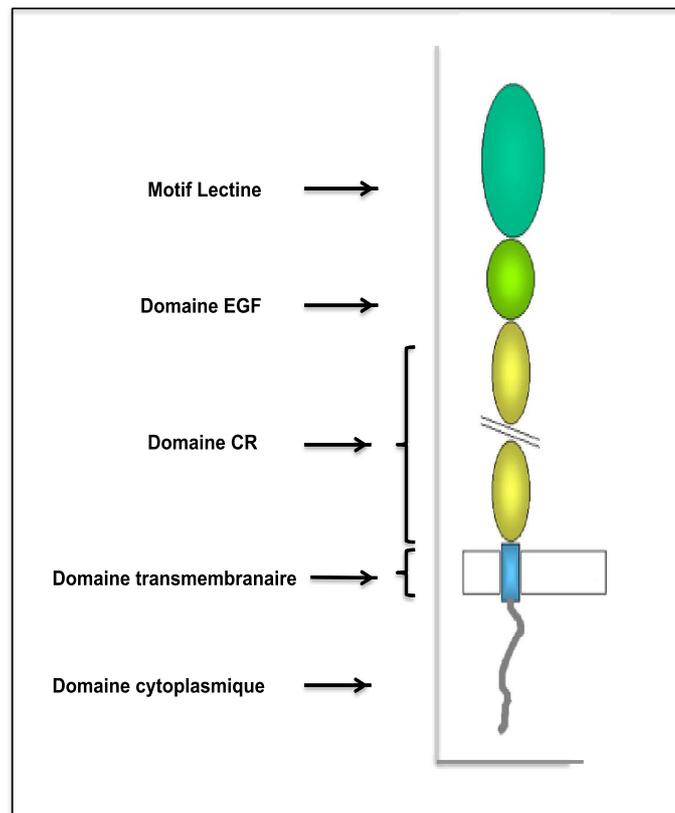
La P-sélectine appartient à la famille des lectines animales (glycoprotéines de surface), capables de lier les sucres, qui compte également la E-sélectine (E pour endothélium) et la L-sélectine (L pour leucocyte) [171, 172]. Elles sont impliquées dans les processus

inflammatoires *via* leur capacité à recruter des leucocytes. La L-sélectine étant exprimée par la plupart des leucocytes (granulocytes, monocytes, et la plupart des lymphocytes) et la E-sélectine étant exprimée par l'endothélium activé en réponse à un stimulus inflammatoire (TNF  $\alpha$ , lipopolysaccharides (LPS) ou interleukine-1(IL-1)) [173].

### 1. Structure

La P-sélectine possède une structure commune avec la L-sélectine et la E-sélectine. Ces protéines d'adhésions sont composées de trois domaines : un court domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un long domaine extra-membranaire fortement glycosylé. Cette dernière comporte, à son extrémité N-terminale, un domaine lectine calcium-dépendant (site d'accroche propre aux sélectines), un domaine EGF-like (*Epidermal Growth Factor*) et deux à neuf domaines CR (Complement Regulatory) (variable selon le type de sélectine) (**Figure 18**). Chez l'Homme, les P-, E- et L-sélectines possèdent respectivement neuf, six et deux répétitions.

La P-sélectine existe sous deux formes : une forme transmembranaire et une forme soluble (sP-sélectine) relarguée par protéolyse de la forme membranaire (shedding) [174, 175].



**Figure 18 : Structure schématique des sélectines [172]**

## **2. Rôle de la P- sélectine dans l'immunité innée, l'athérosclérose et la thrombose**

La P-sélectine, exprimée sur les cellules endothéliales suite à leur activation, joue un rôle important dans l'inflammation vasculaire principalement *via* le recrutement des neutrophiles et des monocytes au site de la blessure [176, 177]. Il a été démontré que, les souris déficientes en P-sélectine étaient protégées des agressions neutrophiles-dépendantes dans le modèle d'ischémie-reperfusion [177, 178].

La P-sélectine, fortement exprimée sur les plaquettes activées, est impliquée dans le processus d'athérosclérose. Elle participe au développement de la lésion athérosclérotique *via* le recrutement de leucocytes. Le blocage ou l'élimination de cette fonction chez les souris réduit nettement la lésion athérosclérotique [179, 180] avec la diminution de la formation d'une néo-intima induite par l'agression pariétale [181].

La P-sélectine plaquettaire est impliquée aussi dans la thrombose. Gross *et al.* ont étudié la P-sélectine plaquettaire incorporer dans un thrombus après induction d'une lésion. Dans un premier temps, elle apparaît sur les plaquettes à l'interface entre la paroi vasculaire et le thrombus puis à travers tout le thrombus, de la paroi vasculaire à la surface luminale du thrombus. Lorsque la densité de P-sélectine sur la surface luminale du caillot est suffisante, il y a adhésion neutrophilaire au thrombus [182]. Adhésion assurée par les PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1). L'interaction PSGL-1 /P-sélectine plaquettaire induit une expression positive du FT (dont les neutrophiles sont richement pourvus) en plus de la génération de microparticules procoagulantes neutrophilaires, consolidant ainsi un état pro-thrombotique [183].

Actuellement les auteurs soulignent le rôle important de la présence de NETs dans les caillots, en particulier dans sa consolidation [184].

## **3. Les ligands de la P-sélectine**

### **PSGL-1, le Sialyl Lewis X (SLe<sup>x</sup>) et analogues**

Le PSGL-1 est le principal ligand naturel de la P-sélectine. Il est exprimé à la surface des leucocytes [185] et possède une forte affinité pour la P-sélectine ( $K_d = 320$  nM) [186]. L'interaction PSGL-1/P-sélectine est médiée par un tétrasaccharide présent dans l'organisme humain, le Sialyl Lewis X (SLe<sup>x</sup>) [187] (Encadré en rouge, sur la figure 19).

Le SLe<sup>x</sup> possède des éléments structuraux permettant à la P-sélectine de reconnaître le PSGL-1. Ces éléments sont : les fonctions hydroxyles du D-galactose et du L-fucose et le groupe carboxylique de l'acide sialique [188].

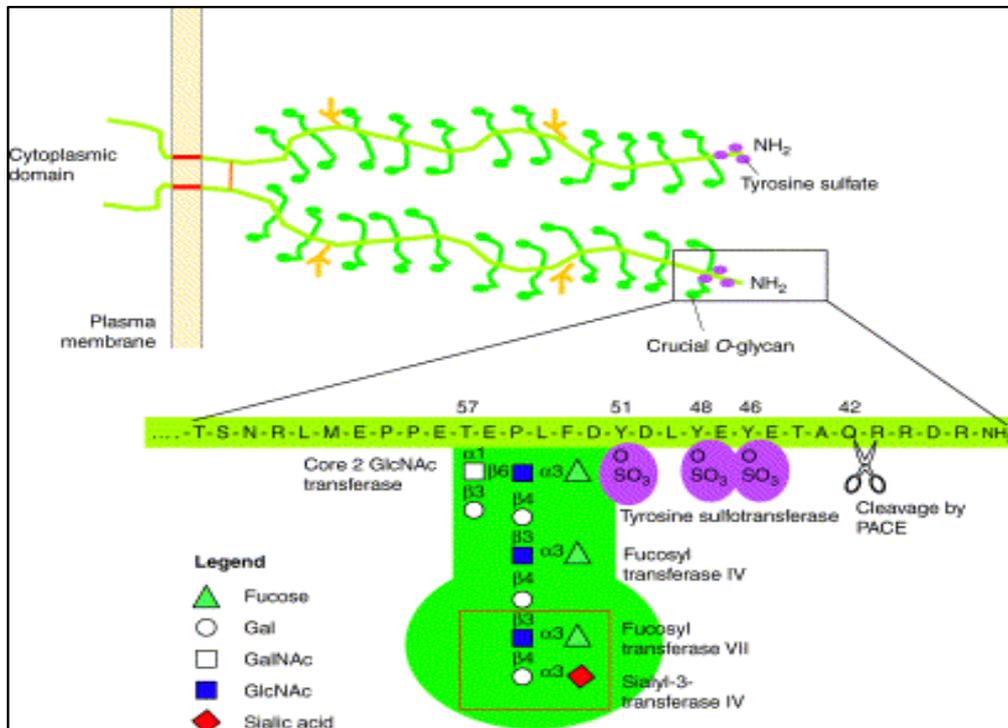


Figure 19 : Structure schématique du PSGL-1, ligand naturel de la P-sélectine [172]

De plus, la P-sélectine endothéliale interagit aussi avec le GPIb plaquettaire, permettant une interaction plaquettes/paroi activée [25].

La P-sélectine lie également des protéoglycanes ou des glycolipides ainsi que des molécules mimétiques du SLe<sup>x</sup> tels que les polysaccharides sulfatés (héparanes sulfatés, dextrans sulfatés et Fucoïdanes) [189, 190]. Dans ce travail de recherche nous nous intéressons au Fucoïdane.

## Chapitre V : Le Fucoïdane [191]

Le Fucoïdane, appelé aussi Fucane ou Fucane sulfaté, est un polysaccharide sulfaté contenant un pourcentage important de L-fucose et de groupes esters sulfates. Identifié pour la première fois par Kylin *et al.* [192], il est extrait principalement de la matrice extracellulaire hydrophile de plusieurs espèces d'algues brunes telles que *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata* et *Laminaria saccharina*.

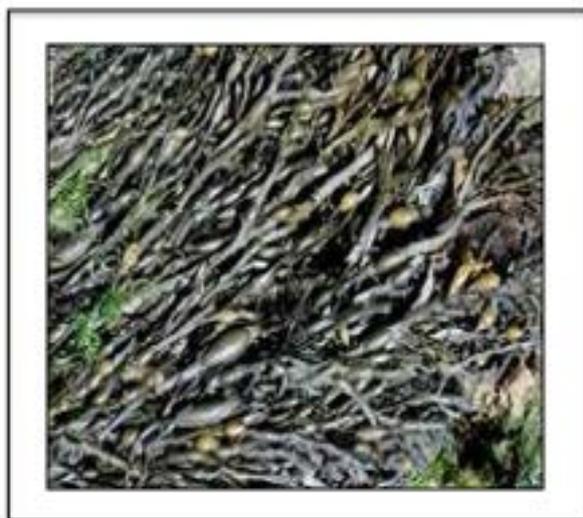
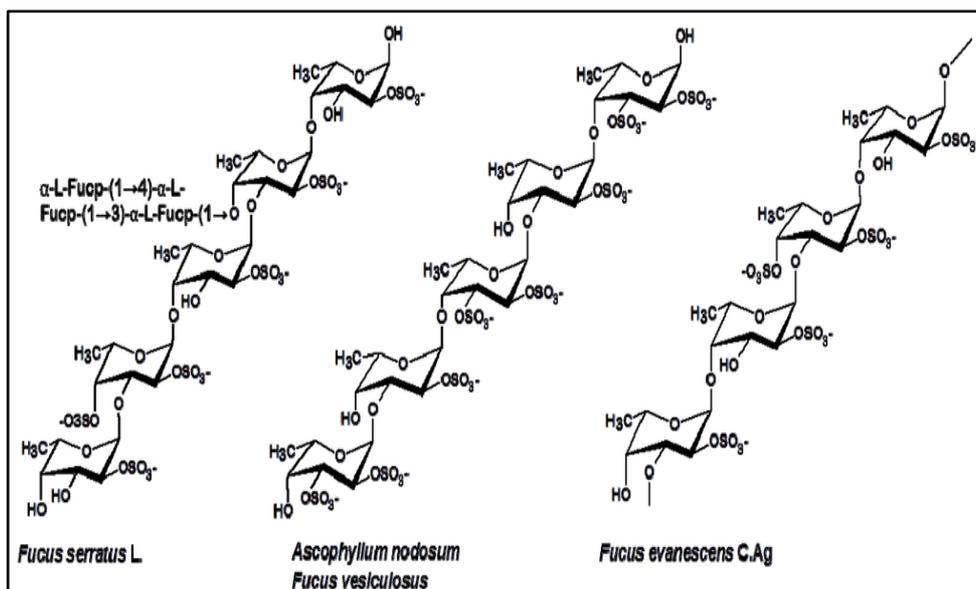


Figure 20 : Algue brune de l'espèce *Fucus vesiculosus*

### 1. Structure et composition

La structure et la composition chimique des Fucoïdanes varient en fonction de l'espèce d'algue dont ils sont extraits. La composition chimique de la plupart des Fucoïdanes est complexe, en dehors du L-fucose, des groupements sulfates et de l'acide uronique, certains contiennent des monosaccharides (galactose, mannose, xylose, glucose) en proportion variables [191].

La structure des Fucoïdanes peut contenir des chaînes linéaires faites d'alternance de  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3)-L-fucose et  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4)-L-fucose branchés sur la chaîne principale. Les positions de substitutions par les groupements sulfates sont variables mais occupent souvent les positions C-2, ou C-4 [193].



**Figure 21 : Exemples de structures répétitives de fractions de Fucoïdanes (*Fucus serratus*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus évanescens* C.Ag) [194]**

## 2. Activités biologiques des Fucoïdanes

Au cours des dernières décennies, l'intérêt pour le Fucoïdane a considérablement augmenté compte tenu de ses nombreux effets biologiques et de son faible coût de production. Son activité biologique varie également en fonction des modifications de structures observées entre les différentes espèces d'algues dont il est extrait.

Parmi le large panel d'actions biologiques rapportées dans la littérature scientifique, on note des activités antithrombotiques et anticoagulantes [195, 196], les plus décrites et les plus étudiées, mais aussi des actions anti-inflammatoires [197], anti-virales [198], anti-oxydantes [199] et anti-tumorales [200, 201].

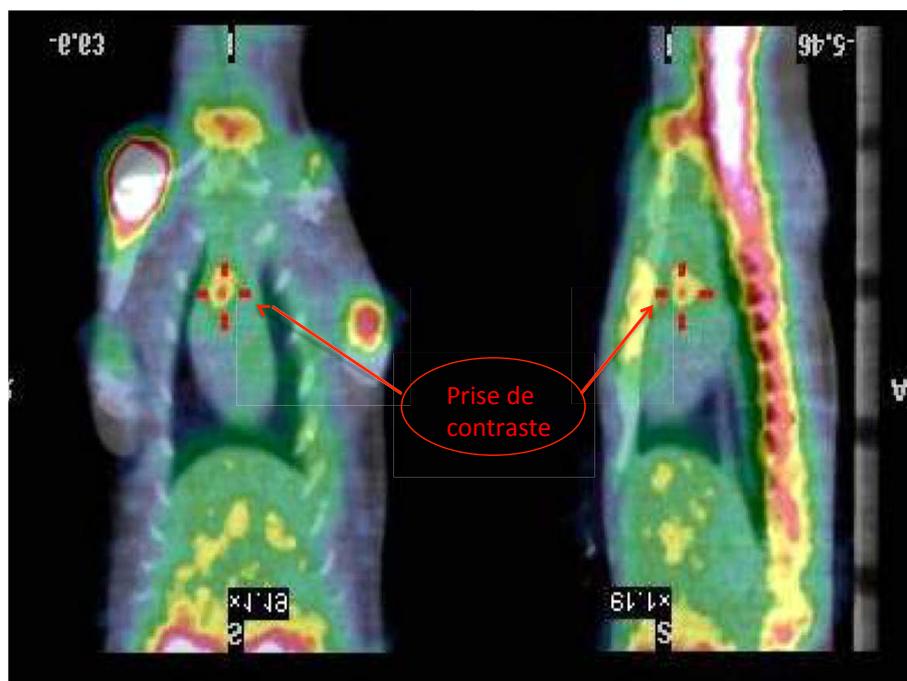
Dans ce projet de recherche, nous nous intéresserons plus particulièrement à la capacité du Fucoïdane à se lier à la P-Sélectine.

## 3. Affinité pour la P-sélectine

Notre laboratoire a une longue expérience du Fucoïdane, de sa purification chimique et de ces propriétés biologiques. Les travaux de Bachelet *et al.* ont démontré que le Fucoïdane de bas poids moléculaire (entre 5 kDa et 10 kDa) possède une affinité de l'ordre du nanomolaire pour la P-sélectine ( $k_d=1,2$  nM) [202].

Cette forte affinité est assurée par les sites sulfatés du Fucoïdane qui présentent une analogie avec le SLe<sup>x</sup>. Cette affinité à la P-sélectine est plus importante que celle du PSGL-1 (ligand naturel de la P-sélectine) dont la constante de dissociation ( $K_d$ ) est de 320 nM [186].

Cette forte affinité a fait du Fucoïdane un sérieux candidat pour l'imagerie médicale : Rouzet *et al.* ont démontré que le Fucoïdane couplé à un agent de contraste cible *in vivo* avec une excellente sensibilité et spécificité les thrombi fibrino-plaquettaires (**Figure 22**) [203]. Le développement du Fucoïdane comme ligand multimodal a fait l'objet d'un dépôt de brevet : « Fucoïdane comme ligand pour le diagnostic des pathologies dégénératives », par INSERM Transfert en 2009.



**Figure 22 : Images TEMP d'un rat présentant une endocardite aortique après injection de Fucoïdane radio-marqué au  $^{99m}\text{Tc}$  [203]**

Les travaux de Bonnard *et al.* ont démontré également l'excellent ciblage du thrombus anévrysmale par de microparticules décorées de Fucoïdane [204].

Ces propriétés confèrent au Fucoïdane une excellente valeur de ciblage du thrombus, raison pour laquelle nous l'avons choisi comme vecteur du rt-PA dans notre projet de recherche pour mieux cibler le thrombus.

## **Chapitre VI : Modèles de thromboses expérimentales *in vivo* [205, 206]**

Comprendre la physiologie de l'hémostase, les mécanismes de la thrombose ainsi que l'évaluation des molécules antithrombotiques, nécessitent des modèles de thromboses expérimentales chez l'animal. Les premiers modèles de thromboses ont été développés chez les chiens, les lapins et les rats puis chez la souris. La souris a été choisie pour ses avantages non spécifiques reconnus en biologie expérimentale : une reproduction rapide, une descendance nombreuse et une très bonne caractérisation génétique des lignées.

Plus spécifiquement, de nombreuses similitudes existent entre les systèmes de l'hémostase et de la thrombose de l'homme et de la souris. Ceci permet l'utilisation de médicaments utilisés en clinique humaine, qui inhibent aussi la thrombose chez la souris, tels que les antiplaquettaires et les anticoagulants.

### **I. Modèles de thromboses expérimentales chez la souris (Figure 27)**

Il existe plusieurs modèles de thromboses provoquées chez la souris dont les principaux sont exposés ci-dessous.

#### **1. Lésion mécanique et électrique**

Les lésions mécaniques ont été les premières techniques utilisées pour le développement d'une thrombose chez la souris. La thrombose peut être induite par : un choc électrique, l'insertion d'un guide métallique, le pincement de l'artère mésentérique, la compression de l'artère carotidienne avec des forceps ou une ligature complète et temporaire des vaisseaux [207-209]. Ces méthodes induisent un dommage direct de l'endothélium aboutissant à la formation d'un thrombus. La thrombose est localisée, et se développe dans la région où le vaisseau a été agressé.

#### **2. Lésion au Chlorure de Fer ( $\text{FeCl}_3$ )**

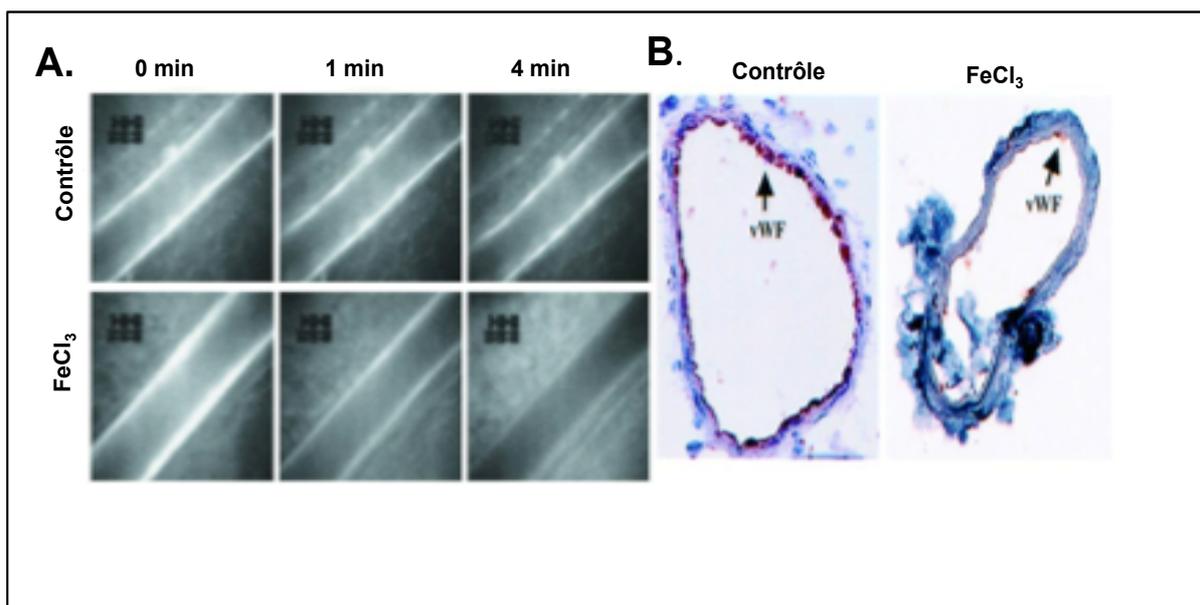
La thrombose induite par le  $\text{FeCl}_3$  est la technique la plus utilisée dans la littérature. Elle est principalement utilisée au niveau des vaisseaux mésentériques ainsi qu'au niveau de l'artère carotidienne. L'application du  $\text{FeCl}_3$ , contenu dans une solution d'agarose ou dans un papier buvard déposé pendant un temps défini, induit une génération massive de radicaux libres qui dénudent l'endothélium. Cette dénudation expose le contenu sous-endothélial, fortement

thrombogène, favorisant ainsi une adhésion et une agrégation plaquettaire, et donc une formation d'un thrombus qui peut être occlusif [210].

Les mécanismes exacts de la genèse du thrombus ont été le thème de plusieurs débats, Eckly *et al.* ont démontré que suite à la diffusion des ions de  $Fe^{3+}$  à travers les différentes couches de la paroi vasculaire, et en plus de la dénudation de l'endothélium, il y a formation de corps sphériques chargés en FT dans la lumière du vaisseau. Ce qui leur suggère un rôle important dans la thrombose *via* la génération de thrombine [211].

Les travaux récents de Barr *et al.* ont mis en évidence l'implication des globules rouges dans l'initiation de la thrombose induite par le  $FeCl_3$  [212].

Cette lésion est simple, Facile à provoquer et reproductible. La cinétique de formation du thrombus peut être analysée et suivie par microscopie intravitale et par doppler. De plus, le thrombus artériel formé dans ce modèle présente des similitudes avec le thrombus artériel humain [213].

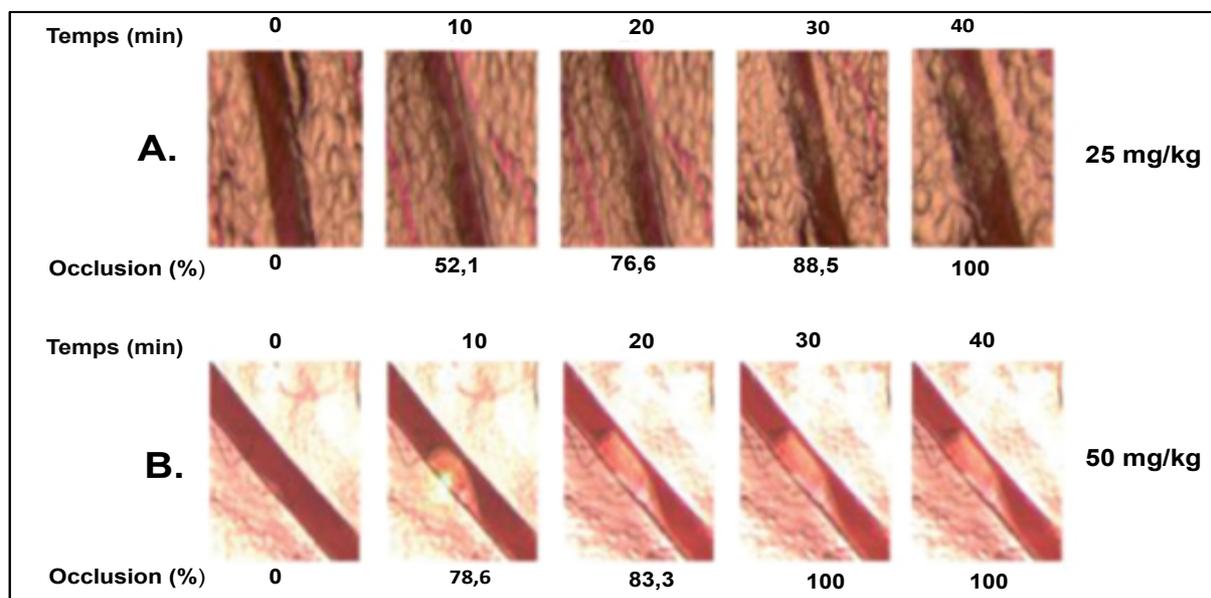


**Figure 23 : Dénudation de l'endothélium par le  $FeCl_3$  [214]**

**A.** Lésion au niveau des artérioles mésentériques. Les cellules endothéliales expriment la GFP et la fluorescence disparaît après application du  $FeCl_3$ , induisant une dénudation des cellules endothéliales. **B.** Coupe immuno-histochimique avec un marquage du vWF des artérioles lésées par le  $FeCl_3$  ou contrôles, confirmant l'endommagement des cellules endothéliales.

### 3. Lésion photochimique

Ce modèle utilise le Rose Bengale ( $C_{20}H_4Cl_4I_4O_5$ ), un composé chimique photoactivable dérivé de la fluorescéine. Il est principalement utilisé pour étudier la thrombose au niveau de l'artère carotidienne, les veines ainsi qu'au niveau des vaisseaux mésentériques. La thrombose est induite par l'injection du Rose Bengale dans la circulation suivie d'une exposition à un faisceau lumineux fluorescent de longueur d'onde 543 nm sur le vaisseau d'intérêt. L'exposition à cette lumière entraîne, par transfert d'énergie, la production d'oxygène singulet  $^1O_2$  et favorise la génération des espèces réactives de l'oxygène (R.O.S) au site d'illumination. Ceci endommage les cellules endothéliales et expose le sous-endothélium fortement thrombogène permettant la formation du thrombus [215]. Cette lésion est moins sévère que celle provoquée par le  $FeCl_3$ , mais son induction est cependant un peu plus lente. Elle est localisée, reproductible et le thrombus artériel formé ressemble également au thrombus artériel humain. Le Rose Bengale est particulièrement efficace pour les études *in vivo* en raison de sa grande efficacité photochimique et de sa faible toxicité systémique.



**Figure 24 : Cinétique de formation de thrombus induit par le Rose Bengale [216]**

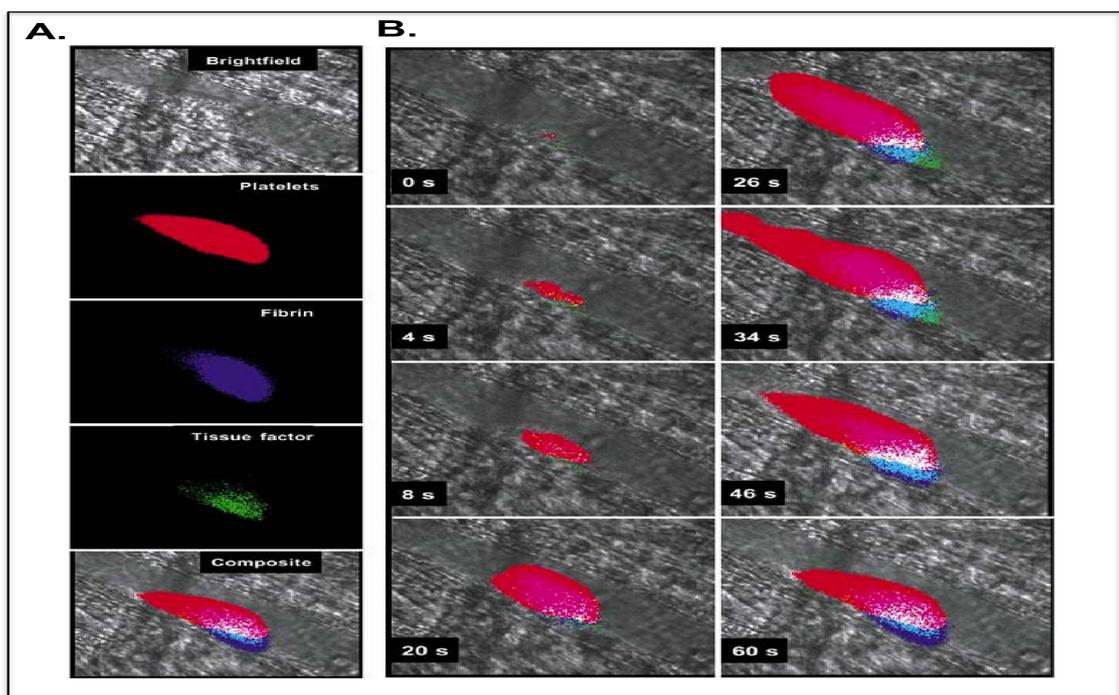
Visualisation du thrombus par microscopie intravitale, **A.** Cinétique de formation de thrombus (25mg de Rose Bengale). **B.** Cinétique de formation de thrombus (50mg de Rose Bengale).

#### 4. Lésion par exposition laser

Ce modèle a été décrit la première fois par Arfos *et al.* au niveau de l'oreille du lapin [217]. Rosen *et al.* l'ont adapté chez la souris par application sur la veine de l'oreille [218]. Cette thrombose est provoquée par des tirs laser qui induisent une lésion localisée. Elle est principalement utilisée dans les petits vaisseaux présentant une transparence suffisante pour le passage du faisceau laser comme les artérioles et les veinules mésentériques, ainsi que le crémaster artériole. La thrombose provoquée dépend de l'intensité du tir laser et de la profondeur de la lésion.

Une lésion superficielle expose le sous-endothélium et provoque une thrombose non occlusive [219], alors qu'une lésion profonde endommage la média, l'intima et la lame élastique externe [220] induisant l'intervention du FT et donc une thrombose subocclusive [221].

Cette lésion est reproductible. La cinétique de formation du thrombus peut ainsi être suivie en temps réel *via* la microscopie intravitale après injection d'anticorps fluorescents dirigés contre la fibrine, les plaquettes et le FT. Ceci permet de mieux caractériser le thrombus.



**Figure 25 : Formation d'un thrombus après lésion d'artérioles du crémaster au laser [221]**

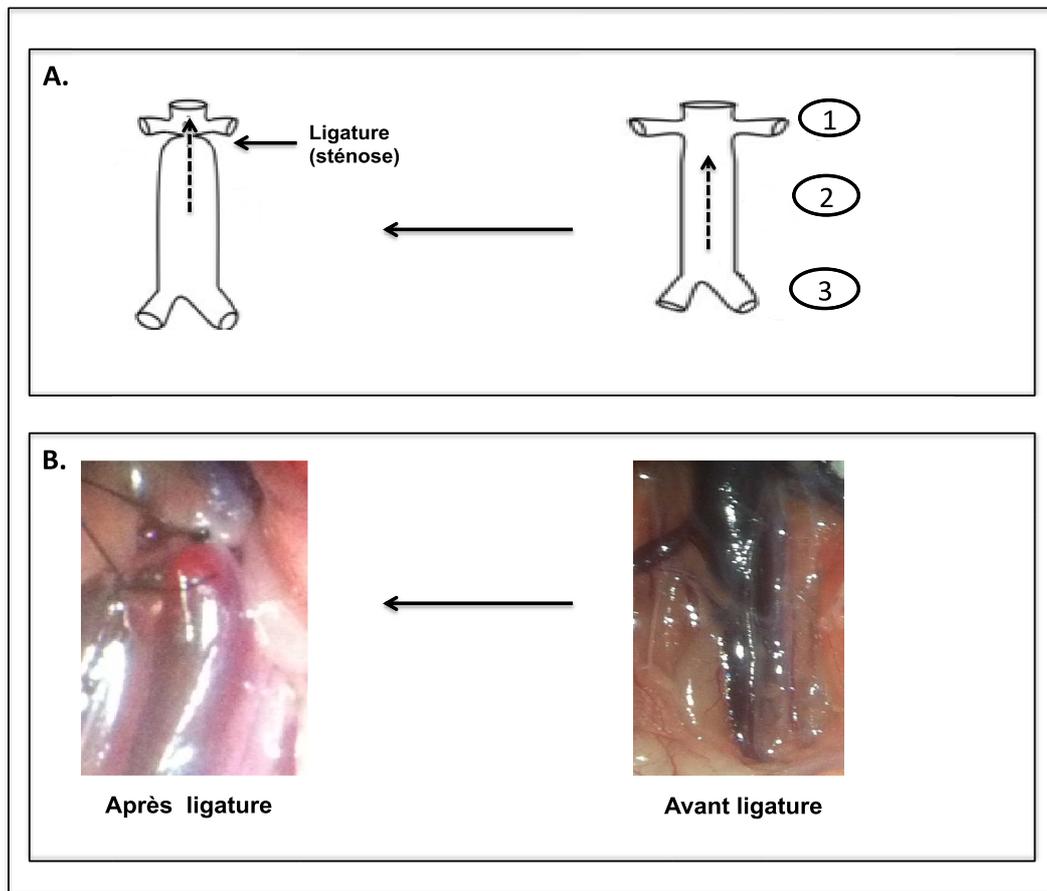
Visualisation du thrombus par microscopie intravitale, **A.** détection des plaquettes (en rouge), de la fibrine (en bleu), du FT (vert) et la superposition des 3 fluorescences. **B.** cinétique de formation de thrombus.

## 5. Sténose de la veine cave inférieure

Ce modèle est provoqué par une ligature partielle de la veine cave inférieure de la souris. Une ligature réalisée sous la veine rénale gauche au-dessus d'un guide, qui sera retiré permettant de créer une sténose [71, 222] (**Figure 26**).

Contrairement aux autres modèles de thromboses provoquées, ce modèle n'induit pas de dénudation endothéliale. Massberg *et al.* ont démontré que suite à cette sténose, les voies intrinsèque et extrinsèque de la coagulation dépendantes du FT étaient activées. La voie intrinsèque est déclenchée par les NETS neutrophilaires générés suite à l'interaction leucocytes-cellules endothéliales. Le FT dérivé des leucocytes induit *in fine* la formation de la fibrine, cette dernière caractérisant la thrombose veineuse profonde (TVP) [71].

La TVP provoquée chez la souris présente une ressemblance avec la TVP chez l'homme.



**Figure 26 : Sténose de la veine cave inférieure**

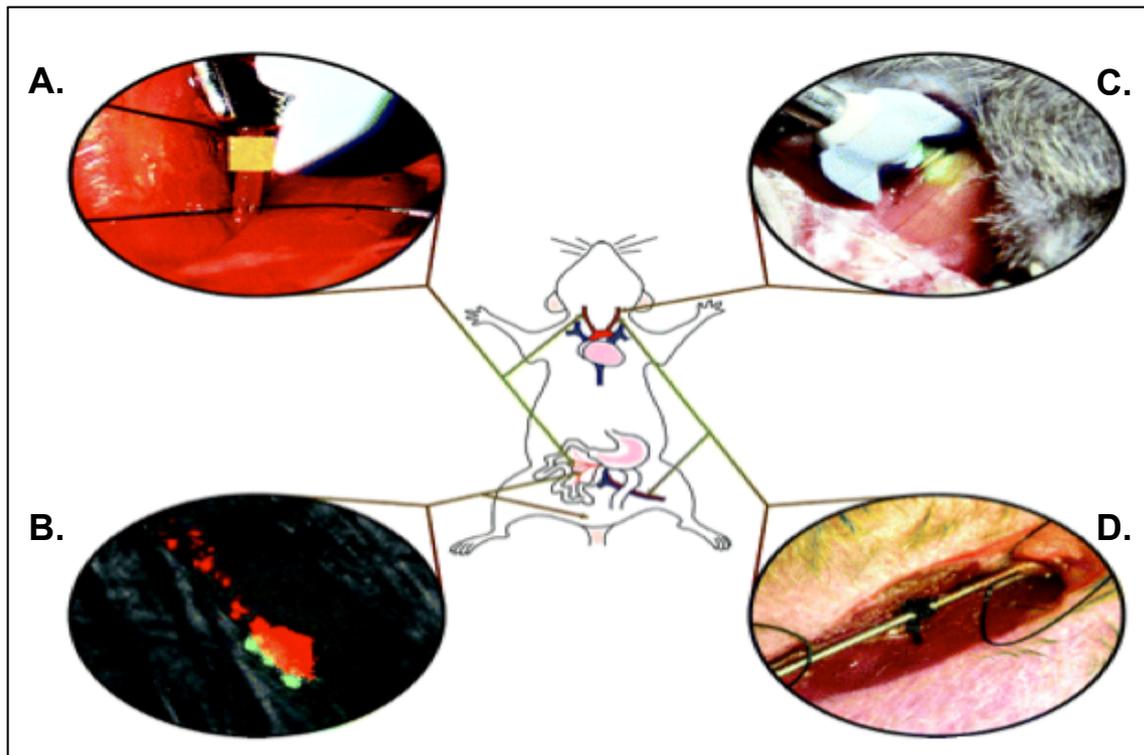
**A.** Schéma de la sténose la veine cave inférieure : 1- veine rénale gauche ; 2- veine cave inférieure ; 3- veine iliaques. **B.** Sténose de la veine cave d'une souris.

## II. Avantages et limites des modèles animaux

Les principaux avantages ainsi que les limites majeures des différents modèles de thromboses provoquées chez la souris sont représentés dans le tableau suivant.

Modèle	Site vasculaire	Avantages	Limites	Références
Lésion mécanique	Artériole mésentérique, carotide, veine cave.	Peut être produites dans plusieurs vaisseaux.	Difficile, matérielle spécialisé, Peu de reproductibilité. Ne reflètent pas ce qui se passe réellement chez l'homme.	[208, 209]
FeCl <sub>3</sub>	Carotide, vaisseaux mésentère.	Simple, reproductibles Peu coûteux, ressemblance avec le thrombus artériel humain.	Très sévères, Dénaturation des protéines d'adhésion et modification de leur capacités adhésives.	[21, 211, 223-225]
Lésion photochimique	Vaisseaux mésentériques, carotides, veines.	Ressemblance avec le thrombus artériel humain.	Le Rose Bengale peut être toxique pour la récupération de l'anesthésie.	[226, 227]
Lésion par exposition au laser	vaisseaux mésentériques ainsi que l'artériole crémaster.	Peut être produite dans plusieurs vaisseaux/souris. Similitude à une réaction inflammatoire associée à une thrombose.	Équipements spéciaux, réactifs coûteux.	[218, 221]
Sténose veineuse	La veine cave inférieure.	Ressemblance avec la thrombose veineuse profonde chez l'homme.	Reproductibilité difficile, poids des caillots différents, risque d'une thrombose occlusive.	[71]

**Table 1 : Tableau récapitulant les avantages et les limites majeures des modèles de thromboses expérimentales chez la souris**



**Figure 27 : Modèles et site vasculaire d'intérêt de thrombose chez la souris**

**A.** Modèle de  $\text{FeCl}_3$  : application du papier de Whattman imbibé en  $\text{FeCl}_3$  sur la carotide de souris. **B.** Modèle photochimique : application de la lumière verte sur la carotide après injection du Rose Bengale. **C.** Modèle par exposition au laser : artériole crémaster, 25 secondes après l'initiation de la thrombose plaquettes en rouge et la fibrine en vert. **D.** Modèle de lésion mécanique : introduction d'un guide métallique dans la l'artère fémorale.

**DEUXIEME PARTIE :**  
**RESULTATS EXPERIMENTAUX**



## PUBLICATION

### **Amino-Fucoidan as a vector for t-PA-induced fibrinolysis in thrombotic diseases**

Radouane Ghebouli<sup>1</sup>, Stephane Loyau<sup>1</sup>, Benoît Hoe Tin Hoé<sup>1</sup>, Murielle Maire<sup>1</sup>, Pierre Saboural<sup>1</sup>, Jean-Philippe Collet<sup>2</sup>, Martine Jandrot-Perrus<sup>1</sup>, Didier Letourneur<sup>1</sup>, Frédéric Chaubet<sup>1</sup>, Jean-Baptiste Michel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Vascular Translational Science, Inserm U1148, Paris Diderot University, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, CHU Bichat, 46 rue Henri Huchard, Paris, France  
<sup>2</sup>INSERM U1166, Centre Hospitalier Universitaire Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

## INTRODUCTION

### **Le Fucoïdane aminé comme vecteur du t-PA dans les complications thrombotiques**

L'AVC ischémique, l'IDM et l'EP représentent la première cause de mortalité dans le monde. Ces complications sont caractérisées par des occlusions thrombotiques. Le rt-PA est le seul traitement médicamenteux utilisé pour ces situations d'urgence thérapeutique pour la recanalisation des vaisseaux occlus.

Les travaux de Bachelet *et al.* et de Rouzet *et al.* réalisés au sein de notre laboratoire ont démontré que le Fucoïdane de bas poids moléculaire (compris entre 5 kDa et 10 kDa) possédait une affinité nanomolaire pour la P-sélectine [202]. Il cible *in vivo* avec une excellente sensibilité et spécificité le thrombus intraluminal [203].

L'objectif de notre travail était d'améliorer l'efficacité de la fibrinolyse provoquée par injection IV du t-PA en le vectorisant au caillot et en le protégeant de ses inhibiteurs solubles durant son transit circulatoire.

Nous avons testé l'hypothèse que le **Fucoïdane aminé** pouvait être un vecteur du t-PA au thrombus. Un vecteur capable à la fois de lier le t-PA, de le protéger et de le vectoriser spécifiquement au caillot. Pour cela nous avons développé une molécule bipolaire : **un**

**Fucoïdane**, comme vecteur au thrombus, **aminé** sur une de ses extrémités par une ou plusieurs lysines en N-terminales offrant une plateforme semblable à celle offerte par la fibrine pour la fixation du t-PA exogène mais pas celle du plasminogène (lysines carboxy-terminales). Dans un premier temps, nous avons comparé au t-PA seul *in vitro* la capacité de ces molécules bipolaires couplées au t-PA à accélérer la lyse des thrombi humains riches en plaquettes, ainsi qu'au niveau de caillots de sang total dans un modèle *ex vivo* de thromboelastogramme, ROTEM<sup>®</sup>.

Enfin, nous avons évalué *in vivo* également l'effet vecteur de notre molécule ainsi que l'augmentation du rendement fibrinolytique par injection IV du t-PA dans trois modèles de thromboses expérimentales, sur différents territoires vasculaires (thromboses veineuses et artérielles).

## **Amino-Fucoïdan as a vector for t-PA-induced fibrinolysis in thrombotic diseases**

Radouane Ghebouli<sup>1</sup>, Stéphane Loyau<sup>1</sup>, Benoît Hoe Tin Hoé<sup>1</sup>, Murielle Maire<sup>1</sup>, Pierre Saboural<sup>1</sup>, Jean-Pierre Collet<sup>2</sup>, Martine Jandrot-Perrus<sup>1</sup>, Didier Letourneur<sup>1</sup>, Frédéric Chaubet<sup>1</sup>, Jean-Baptiste Michel<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory for Vascular Translational Science, Inserm U1148, Paris Diderot University, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, CHU Bichat, 46 rue Henri Huchard, Paris, France

<sup>2</sup>INSERM U1166, Centre Hospitalier Universitaire Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

World count of body : 7256

World count of abstract : 201

Figure number : 7

\* Corresponding author :

Jean-Baptiste Michel, MD, PhD.

Inserm U1148

Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard

75877 Paris Cedex 18 France

Tel : +33 (0)1 -40 -25 -75-26

Fax : + 33 (0)1 -40- 25 -86 -02

Email: jean-baptiste.michel@inserm.fr

## **ABSTRACT**

Acute ischemic stroke (AIS), acute myocardial infarction (AMI), and pulmonary embolism (PE) are main cause of mortality and morbidity worldwide. Thrombolysis by intravenous injection (IV) of recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) remains the most common non-interventional treatment to recanalize vessels occluded. However, its use is limited by significant drawbacks, including bleeding complications. Recent studies showed that Fucoidan targets *in vivo* intraluminal thrombus.

In this study, we have developed a bipolar chimere associating Fucoidan, able to target the thrombus, and a NH<sub>2</sub>-exposing lysine platform able to bind to t-PA. We hypothesized that this construct was able to vectorize t-PA to the thrombus, would increase its fibrinolytic efficacy and avoid its deleterious effects. *In vitro* assays, tPA complexed to Dilysine Fucoidan (DLF) has shown its over thrombolytic superiority on platelet rich thrombi as compared to t-PA alone. In Rotational thromboelastometry (ROTEM<sup>®</sup>) analysis, t-PA complexed to DLF significantly increased maximal lysis as compared to t-PA alone. *In vivo* mesenteric, arterial and deep vena cava thrombosis and thrombolysis, vascular reperfusion was significantly increased in mice treated with DLF complexed to t-PA as compared in mice treated by t-PA alone. These data demonstrate that amino Fucoidan is an excellent vector to deliver of t-PA to the thrombus.

## **Keywords**

Thrombosis, clot, t-PA, fibrinolysis, amino-Fucoidan, lysine, vector.

## INTRODUCTION

Acute vascular thrombotic events remain the main cause of mortality and morbidity in western countries (1, 2). Thrombolysis by intravenous injection (IV) of recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) remains the most common non-interventional treatment to recanalize vessels occluded by acute thrombosis. Thrombolysis is indicated at the acute phase of arterial thrombosis, acute ischemic stroke (AIS) and myocardial infarct (3-6) and also in venous thrombosis and pulmonary embolism (5). For the last 20 years, apart from thrombectomy, thrombolysis by rt-PA has been the only clinically approved treatment of ischemic stroke. However, despite its recognized efficacy, its use is limited to a very short therapeutic window of 4.5 hours after the first clinical signs (3) because beyond this term, the risk of hemorrhagic transformation (7) exceeds the therapeutic benefit. rt-PA also presents some neurological toxicity (4) and, in addition, since it is administered intravenously, it is also quickly neutralized and inhibited by circulating plasminogen activator inhibitor (PAI-1) (8-10). Therefore, it would be a great advantage to conjugate rt-PA with a chaperon molecule able to transport it to the thrombus, with a final result, a specific increase in its local thrombolytic effect.

It is well known that plasminogen and t-PA bind to lysine residues in the fibrin network, forming t-PA-fibrin-plasminogen ternary complexes (11). t-PA binds to the cationic amine residues (amino-groups) of Lys side-chains essentially by its finger domain (12), while plasminogen mainly binds to the C-carboxyl terminal lysines. Therefore, t-PA converts plasminogen to plasmin, initiating local fibrinolysis. Indeed, binding of t-PA to amine residues facilitates t-PA/plasminogen interaction and protects t-PA from its circulating inhibitors such as PAI-1 (13).

Fucoidan, a term referring to sulfated polysaccharides mainly extracted from brown seaweed, is a naturally occurring mimic of Sialyl lewis X, a tetrasaccharide present on the cell surface that play a key role in cell-cell interactions. SLe<sup>x</sup> interacts with selectins and in particular P-selectin that is exposed at the surface of activated platelets (14, 15). Indeed, Fucoidan binds to activated platelets *in vitro* (16) and also targets intraluminal thrombi *in vivo* (17), even when coupled to nano or microsystem (18, 19). We hypothesized that coupling t-PA to Fucoidan would allow its more specific delivery to the thrombus which would, as a consequence, increase its fibrinolytic efficacy. For this purpose, we have attempted to create a bipolar construct associating Fucoidan, able to bind to the thrombus, and an NH<sub>2</sub> exposing lysine platform able to bind to t-PA, in order to target t-PA to the site of platelet activation.

Lysine or di-lysine and tri-lysine were linked to Fucoidan by their carboxy-terminal function. The ability of aminated Fucoidan/t-PA constructs or t-PA alone to lyse thrombi and clots *in vitro* were compared. This first step allowed us to select di-lysine-Fucoidan (DLF) as the most efficient compound. Thereafter, we used different murine models (mesenteric thrombosis, arterial carotid thrombosis, and deep venous thrombosis) to demonstrate *in vivo* the thrombolytic efficacy of t-PA complexed to DLF as compared to t-PA alone.

## **Materials and Methods**

### **Preparation and characterization of Fucoidan derivatives**

Fucoidan was obtained from Algues & Mer (Ascophycient<sup>®</sup>, batch #ASPHY12399, Ouessant, France) and dialysis membranes from Spectra/Por, (MWCO 1 kDa, Dominique Dutscher, France). All other chemicals were purchased in analytical grade from Carlo Erba, Sigma-Aldrich and Fisher Scientific and used without further purification.

### **Fucoidan coupling with lysine, di-lysine and tri-lysine**

Low molecular weight Fucoidan was modified at its reducing end to maintain the integrity of the glycosidic backbone. The method of the synthesis is illustrated in Figure 1. Lysine residues were linked to Fucoidan via their carboxylic residue in order to expose their NH<sub>2</sub> terminals.

Fucoidan derivatives with lysine, di-lysine and tri-lysine (namely LF, DLF, TLF) were prepared in two steps:

- (i) Fucoidan was first aminated with diaminopropane at its reducing end as previously described (16). Briefly, 5.4 mL of 1.5 M diaminopropane in glacial acetic acid were added to 500 mg of Fucoidan in a glass tube (16). The tube was sealed and heated to 90 °C for three hours, and three more hours at the same temperature after adding 1.4 mL of 3M dimethylborane in acetic acid. After cooling and neutralization with diluted NaOH, the product was dialyzed successively against a carbonate buffer 0.45 M at pH 9.6 containing 1 M NaCl, a water/ethanol (80/20, v/v) solution containing 0.5 M NaCl, and distilled water. After freeze drying the aminated Fucoidan, namely F-NH<sub>2</sub>, was obtained with a yield of 65%.
- (ii) Then, to a solution of 5mL of 10.4 mM amino acid derivative in bi-distilled water, 20 mg of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and 12 mg of N-hydroxy-succinimide (NHS) were successively added at room temperature. After stirring the mixture for 15 min, 76.4 mg of F-NH<sub>2</sub> were added. After 2h of stirring at room temperature, the

solution was dialyzed as described above (cut-off 1,000 Da). After freeze drying, 70-75% yields of LF, DLF and TLF were obtained.

### **Physicochemical characterization**

#### **. Amine quantification**

The amount of primary amine was determined with a phthalaldehyde colorimetric assay using bromopropylamine as the standard according to Roth.

#### **. Fucose and glucuronic contents**

Fucose and uronic acid content were quantified by the classical colorimetric assays of Dische and Schettles, and Bitter and Muir respectively (20, 21).

#### **. Sulfate content**

The sulfate content was quantified according to the protocol described in Bachelet *et al* (16). Briefly, in a home-made glass device, sulfates were reduced to hydrogen sulphide with a mixture of hydroiodic acid, hypophosphorous acid and acetic acid heated under reflux. Gaseous hydrogen sulphide was flushed from the medium with nitrogen as a carrier gas into a zinc acetate solution. N, N-dimethylphenylenediamine dihydrochloride and ferric chloride in strong acidic medium were added to this solution to quantitatively produce methylene blue which was quantified with absorption at 670 and 744 nm. The comparison with potassium sulfate standard solutions provided the sulfate content of the sample.

#### **. Molecular mass analysis**

The average molecular weights and molecular weight distributions were determined at room temperature by coupling online a high performance size exclusion chromatograph (Ultimate 3000 autosampler with 250  $\mu$ L automatic injector and Pump, Thermofischer Scientific, France), a multi- angle laser light scattering detector (Minidawn TREOS, Wyatt Technology Inc., USA) and a differential refractive index (dRI) detector (Iota 2, Precision Instruments, France). 0.15 M NaNO<sub>3</sub>, was used as carrier, degassed on line and eluted at a 0.5 mL/min flow rate. 100  $\mu$ L of a 0.45  $\mu$ m- filtered sample solution (at about 20 mg/mL) were injected. The size exclusion chromatography line consisted of an OHPak SB-G guard column for protection and two OHPak SB-802.5 and-803 HQ columns (Showa Denko Europe, Germany) in series. The overall chromatographic system was monitored by Chromeleon Software (Thermofischer Scientific, France), which was also used to process the results.

#### **. Infrared (IR) spectrum analysis**

Infrared spectra were acquired between 400 and 4000 cm<sup>-1</sup> with an AVATAR 370 FT-IR spectrometer (Thermo-Nicolet, Villebon, France) with 32 scans/sample and a resolution of 2

cm<sup>-1</sup>. Dry samples were pressed with potassium bromide (2% w/w). Spectra were processed and analyzed with OMNIC v6.1 (Thermo-Nicolet software).

### **. NMR-<sup>1</sup>H analysis**

<sup>1</sup>H spectra were recorded on a NMR Bruker 500 Avance III (probe: 5mm PAQXI 1H/X) in D<sub>2</sub>O solvent (99,9%) after 3 lyophilisations; sequence: TD 32k; 16 scans; SW: 10 ppm/500 Hz; P90°: 9,5µs; Temperature 300 K; D1: 1s.

### **Complexation of Amino Fucoidan to t-PA**

The single chain recombinant t-PA (American Diagnostica<sup>®</sup>) was associated with amino Fucoidans with a molar ratio of t-PA/Fucoidan-lysine : 1 to 10, 1 to 5, 1 to 10 and 1 to 5 moles of LF, DLF, TLF or of Native Fucoidan (NF) respectively, in PBS supplemented with human serum albumin (HSA) 0.1% and Tween 20 (0.01%) for 2 hours at 4°C and immediately used for clot lysis or stored at - 80°C for a future use.

### **SELDI-TOF mass spectrometry**

The complexation of t-PA to DLF in solution was analyzed with the use of SELDI-TOF Mass spectrometry. Mass spectrometry analysis was performed after retention on cation-exchanger (CM10) Protein Chip array surfaces (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Protein Chips were equilibrated with sodium acetate pH 4.0 (binding buffer) for 10min. Each sample (10 µl of a constant amount of 10µg of t-PA with a varying molar ratio of DLF from 0,5 to 10) was diluted in 90 µl of acetate buffer. Samples were applied to the Protein Chip arrays, using a bioprocessor (Bio-Rad Laboratories) and gently shaken at room temperature using a plate shaker (DPC Micromix) for 60 min.

Then, the spots were washed 3 times with binding buffer for 5 min. This step was followed by two washes with deionized water and then air-drying for 10 min. A volume of 2 µl of a sinapinic acid (SPA) solution (2 mg/ml) prepared in a water/acetonitrile mixture (50/50, v/v) with 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid was applied to each spot. All samples were analyzed using SELDI-TOF-MS (PCS4000 system; Bio-Rad Laboratories). All spectra consisted of 530 averaged laser shots. The acquisition was performed with a mass range of 10–100 kDa. Mass was determined after external calibration using All-in-One protein standards (Bio-Rad Laboratories). Spectra were analyzed with protein chip software (Bio-Rad Laboratories). In order to use the intensities as indicators of relative abundance of t-PA retained in the spot,

baselines were subtracted and the intensities normalized. Normalization was performed by total ion current normalization function.

### **Clot formation and fibrinolysis *ex vivo***

Human platelet-rich and platelet-poor plasma (PRP and PPP) were obtained from citrated blood after two centrifugation steps: at 120 g for 15 minutes followed by 12 min at 1200g. PRP was adjusted to  $3 \times 10^8$  platelets per mL with PPP and supplemented with 75  $\mu\text{g/mL}$  of fluorescein isothiocyanate-human fibrinogen. Clot formation in glass tubes was induced by adding of calcium chloride (10 mM) and incubating for 1 hour at 37°C. After retraction, clots harvested were washed in Hank's buffer (Sigma, St. Louis, MO), rapidly dried on an absorbent paper and weighed. To assess fibrinolysis, PRP or PPP clots were incubated in Hanks' buffer containing t-PA alone (1.72  $\mu\text{g/mL}$ ) or associated with LF, DLF, TLF or Native Fucoidan (NF) for 1h at room temperature. Clots were transferred into a new tube containing 500  $\mu\text{L}$  of Hank's buffer supplemented with 1  $\mu\text{M}$  of human plasminogen. The kinetics of fibrinolysis was evaluated by measuring fluorescence release from the clot into the supernatant at 485/520 nm. After 17 hours clots were reweighed to calculate the weight loss corresponding to total fibrinolysis. t-PA/ Fucoidan-lysine molar ratio used was: 1/10 for LF, 1/5 for DLF, 1/10 for TLF and 1/5 for NF. Evaluation criteria were the initial lysis kinetics (appearance of fluorescence in the supernatant) and the thrombus weight loss after 17H of incubation at 37°C.

### **Thromboelastometry Analysis**

Rotational thromboelastometry analysis was performed in a pre-warmed ROTEM<sup>®</sup> (Team International GmbH, Munich, Germany) cup containing 300  $\mu\text{L}$  of citrated total blood. Clotting was initiated by the addition of tissue factor (Innovin 1/5 vol/vol) (Siemens<sup>®</sup>) and calcium chloride (10 mM). Fibrinolysis was initiated by the addition of t-PA alone (3.44  $\mu\text{g/mL}$ ) (American Diagnostica) or associated with DLF. The fibrinolytic response was assessed with the use of ROTEM<sup>®</sup> software, thereby providing the lysis rate at 60 minutes in each condition.

### ***In vivo* experiments**

Experiments were performed on 8 to 12 weeks-old C57BL/6 male mice purchased from JANVIER's laboratory (France). Deep vein thrombosis experiments used 16 week-old mice. The amount of the complexed and non-complexed t-PA for injection was calculated according

to the body weight of the mice (mg/kg). All experiments were performed in accordance with European legislation on the protection of animals.

### **Intravital microscopy thrombosis of mesenteric venules vessels**

Thrombosis and thrombolysis was carried out according to the protocols described by Boulaftali *et al* (22). After anesthesia (100 mg/kg ketamine, 100 mg/kg xylazine i.p) and laparotomy, mouse mesenteric vessels were exposed for induction of thrombosis and video-microscopic intravital observation. Vascular injury was induced by placing a filter paper strip (1 x 2 mm) saturated with 10 % FeCl<sub>3</sub> (Sigma, St. Louis, MO) for 2 min 30. The filter paper was then removed, the exposed area was rinsed with saline, and thrombus formation following injury was examined in real-time by monitoring the accumulation of rhodamine 6G-labeled platelets and leukocytes (3 mg rhodamine 6G/kg mouse, Sigma, St. Louis, MO) and of Alexa 647 human-conjugated fibrinogen (10 mg/kg mouse, Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) using a fluorescence microscope (Axio Observer, Carl Zeiss Micro imaging) with a 5 x objective connected to a CCD camera (Hamamatsu). All fluorescent markers were administered intravenously into the retro-orbital sinus prior to the induction of vascular injury. Platelet deposition and thrombus growth were monitored for 18 minutes following injury and fluorescent t-PA alone (Abcam<sup>®</sup>) (1mg/kg mouse) or associated with DLF (1 mg/kg t-PA + 0.5 mg/Kg DLF) was then injected intravenously. Thrombus evolution was then examined in real-time for at least 1 hour following thrombus initiation.

### **Intravital microscopy of carotid artery thrombosis**

Thrombosis of the Carotid artery was induced in accordance with the protocol described by Wei *et al* (23). Mice were anesthetized with 100 mg/kg ketamine and 100 mg/kg xylazine. The right common carotid artery was exposed; a small plastic film was inserted between the carotid artery and the perivascular tissue to protect the latter. Vascular injury was induced by placing a small piece of Whatman filter paper (1 × 2 mm), saturated with 10% FeCl<sub>3</sub> (Sigma, St. Louis, MO), over the carotid artery for 3 min. The filter paper was then removed and the exposed artery was rinsed with saline. Thrombus formation after vessel injury was examined in real time by monitoring the accumulation of rhodamine 6G (3 mg/kg mouse, Sigma, St. Louis, MO) -labeled platelets with the use of an inverted fluorescence microscope with a 5<sup>x</sup> objective (Zeiss macroscope). Rhodamine 6G was administered intravenously into the retro-orbital sinus prior to the induction of vascular injury. Platelet deposition and thrombus growth were monitored for 11 minutes following injury and t-PA alone (5 mg/kg mouse) or

associated with DLF (5 mg/kg t-PA + 1 mg/Kg DLF) was then injected intravenously into the jugular vein. Images were acquired before, during and at least 60 minutes after induction of thrombosis. The thrombus size, quantified by Image J software, was set at 100% before injection of t-PA alone or associated with DLF.

### **Deep venous thrombosis model**

As described by Massberg *et al.* (24), venous thrombosis was initiated by restriction of blood flow in the absence of endothelial disruption. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection (100 mg/kg ketamine, 100 mg/kg xylazine). A median laparotomy was performed and the inferior vena cava (IVC) was exposed. After gentle separation from the aorta, the IVC was ligated by a 7.0 monofil polypropylene filament (Premilene ; Braun) just below the left renal vein, over a 30-gauge needle and the needle was removed. All visible side branches (usually 1 or 2) were also ligated. After surgery, the laparotomy was immediately closed by a 6.0 polypropylene suture (Ethicon). In order to perform *in vitro* fibrinolysis assays, thrombi were collected from animals euthanized 24 hours after surgery and were weighed. Clots were distributed in 200  $\mu$ L of PPP from a single, healthy, non-operated, wild-type C57/Bl6. t-PA alone (0.35nmol/L) or associated with DLF were added in order to trigger fibrinolysis. After 20 hours, clots were reweighed to calculate the weight loss, corresponding to total fibrinolysis.

*In vivo* thrombolysis analyses were performed 24 hours after surgery on animals randomized into three groups of therapy : 1) intravenous injection of t-PA alone (2.5 mg/kg mouse), 2) t-PA associated with DLF (2.5 mg/kg t-PA + 2.5 mg/kg DLF) and 3) no injection (untreated mice). After 1 hour of treatment, blood samples were collected by retro-orbital puncture for the measure of plasma fibrinogen levels. Mice were then euthanized and clots collected for clot weight assessment.

### **Measurement of Plasma Fibrinogen Levels**

Levels of fibrinogen were assayed on plasma samples taken immediately one hour after the different treatment injections (untreated mice, t-PA alone or associated with DLF). Plasma samples were immediately obtained by centrifugation at 2000g for 10 minutes and 2500g for 15 minutes and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis. Fibrinogen levels were measured by the Clauss method.

## Statistical analysis

Quantitative data were reported as means  $\pm$  SEM. Normally distributed quantitative data were analyzed with the Student t test. The Mann-Whitney U test was used otherwise. Qualitative data were compared using the Pearson  $\chi^2$  test. All tests were two sided and a p value  $< 0.05$  was considered to be significant. All analyses were performed using Prism software for Mac OSX (version 22.0, Chicago, Illinois, USA).

## Results

### Physicochemical characterization of the Fucoïdan derivatives

The physico-chemical characteristics of Fucoïdan derivatives are summarized in Table 1. The starting Fucoïdan was a low molecular weight fraction of about 8 kDa mainly constituted of sulfated L-fucose and uronic acids. Fucoïdan was modified by diaminopropane grafting at its reducing end to maintain the integrity of the glycosidic backbone leading to F-NH<sub>2</sub>, followed by the coupling of lysine residues via their carboxylic group using EDC/NHS chemistry ([COOH]/[F-NH<sub>2</sub>]=5) to obtain Fucoïdan-lysine (LF), Fucoïdan-dilysine (DLF) and Fucoïdan-trilysine (TLF) in overall yields of about 50%. The synthesis is schematized in Figure 1. The efficiency was checked by the content of primary amines that correlated with the expected modifications i.e: 1 for F-NH<sub>2</sub>, 2 for LF, 3 for DLF and 4 for TLF. The formation of the amide linkage is confirmed by FT-IR spectra with the appearance of a vibration band on LF, DLF and TLF at about 1530 cm<sup>-1</sup> (N-H amide II). The variations in the sulfate and fucose contents as well as the molecular weights are in accordance with the grafting.

The capacity of aminated Fucoïdan to form complex with t-PA was analyzed by SELDI-TOF MS (Figure 2). Purified t-PA (isoelectric point 7.61) bound to a cationic chip appeared as a broad peak formed of a 64.1 kDa and a 62.8 kDa major component. When incubated with DLF but not with Native Fucoïdan, the intensity of the peak decreased as the molar ratio DLF/t-PA increased. Thus, mixing t-PA with DLF complexed the negative charges of t-PA indicating that aminated Fucoïdan bound to t-PA in solution and presented the binding of t-PA to cationic platforms.

### ***In vitro* fibrinolysis**

The effect of coupling t-PA to aminated-Fucoidan on the efficacy of t-PA-triggered fibrinolysis was analyzed *in vitro* (Figure 3).

First, the efficiency of t-PA alone or associated with NF or coupled to one, two or three Lys residues, on fibrinolysis was compared by measuring the initial velocity of a platelet rich clot lysis. t-PA coupled with aminated-Fucoidan was able to increase the initial lysis of platelet-rich thrombi (PRT) as compared to t-PA alone. The highest rate of lysis was reached when t-PA was complexed with DLF compared to t-PA alone ( $155.7 \pm 10.98$  vs  $115.4 \pm 6.19$ ,  $p < 0.01$ ). In contrast, NF devoid of lysine and associated with t-PA, did not increase the lysis rate of platelet rich clots as compared to t-PA alone (Figure. 3A)

Additionally, the weight of the platelet rich clots was lower after 17H incubation with t-PA coupled to aminated-Fucoidan than with t-PA alone (Figure. 3B), and the loss of weight reached significance for DLF ( $58.86 \pm 9.25$  % vs  $47.99 \pm 8.59$  % respectively,  $p < 0.01$ ).

Since DLF appeared as the most efficient compound to enhance the fibrinolysis effect of t-PA on platelet rich clots, this compound was further characterized and used for *in vivo* experiments.

To assess whether the enhancing effect of DLF on t-PA-induced fibrinolysis was due to its binding to activated platelets as assumed, we performed the lysis experiments on platelet-rich and platelet-poor clots (Figure. 3C). The initial rate of fibrinolysis by t-PA alone was lower on platelet-rich clots as compared to platelet poor clots in agreement with the release by activated platelets of t-PA and plasmin inhibitors including PAI-1 et PN-1 (22). In contrast, the initial rate of lysis of the platelet-rich clots in the presence of DLF reached values close to those observed with t-PA on platelet-poor clots. Furthermore, the rate of lysis of platelet poor clots was not increased in the presence of DLF (Figure. 3C). These results show that DLF significantly enhanced thrombus lysis by t-PA *in vitro*, and that this effect was dependent on the presence of platelets.

The ability of DLF to accelerate clot lysis by t-PA was further studied in whole blood by thromboelastography, using a ROTEM<sup>®</sup> analyzer to induce clot lysis, blood was supplemented with a sub-threshold lytic concentration of t-PA alone (0.05 nmol/L) or complexed with DLF (Figure 4). As expected, the addition of this sub-threshold dose of t-PA to whole blood increased the maximum lysis. When t-PA was coupled to DLF, the maximum lysis was significantly increased up to  $59.25 \pm 13.03$  % as compared to  $44.5 \pm 9.36$  % with t-PA alone ( $p < 0.05$   $n = 4$ ). Neither NF nor DLF alone increased the maximum lysis levels

(supplementary Figure 1). These results demonstrate that complexation of t-PA with DLF increases the efficiency of t-PA on clot-lysis in whole blood *in vitro*

### ***In vivo* fibrinolysis**

Data obtained *in vitro* led us to hypothesize that DLF could be used as a vector to drive t-PA to the thrombus *in vivo* and to increase its fibrinolytic capacity. Three different models were used to assess this effect.

First, FeCl<sub>3</sub> triggered thrombosis of mesenteric vessels was observed by intravital microscopy.

After 18 minutes following FeCl<sub>3</sub>-induced injury and before total vessel occlusion, the mice received a same amount of fluorescent t-PA (1 mg/kg) coupled or not with DLF (0.5mg/kg). As shown in Figure 5A, after injection, DLF-fluorescent t-PA (green) readily targeted the intravascular thrombi and increased the quantity of t-PA in the thrombus whereas no fluorescence was observed in the control mice treated by fluorescent t-PA alone. At the end of the experiment (60 min), a reduction in the thrombus size was observed and vessel patency was maintained in mice treated with DLF-t-PA. In contrast, occlusive thrombosis occurred in most of the mice treated by fluorescent t-PA alone at 60 min. Therefore, at 60 min, the frequency of patent vessels was significantly higher in mice treated by DLF-t-PA, than those treated with t-PA alone (84.35% (27/32) vs 9.32% (3/32) respectively (p< 0.001) (Figure. 5B). In addition, vessel occlusion was observed in 100 % of the mice treated with native NF plus t-PA, NF (1 mg/kg) or DLF alone (0.5 mg/kg) (Supplemental Figure 2).

These results demonstrate the beneficial effect on clot lysis DLF as a vector for t-PA on clot lysis. In particular, these experiments show that DLF potentiates the *in vivo* thrombolytic activity of peripherally injected t-PA.

As the preceding model observed thrombolysis in small caliber veins, we assessed whether DLF was also capable to enhance lysis in a mouse model of arterial thrombosis, FeCl<sub>3</sub>-induced carotid artery thrombosis.

Thrombus formation in the carotid artery was correlated with the localized appearance of fluorescence corresponding to accumulation of platelets, previously labeled by an intravenous injection of rhodamine 6G. Thrombolysis, initiated 11 min after thrombosis induction, was assessed by the partial or complete disappearance of the fluorescence indicating complete or partial clot lysis leading to recanalization. Figure 6A shows that at 50 min following DLF-t-PA injection, vessel recanalization was observed with a complete disappearance of the clot, unlike mice treated with t-PA alone. At the end of the experiment (60 min), DLF-t-PA

significantly reduced thrombus size as compared to t-PA alone ( $38,21 \pm 12,91\%$  vs  $89,09 \pm 14,84\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) (Figure. 6B). Therefore, the rate of recanalization was significantly higher in mice treated by the DLF-t-PA than in mice treated by t-PA alone ( $47.8\%$  (9/19) vs  $15.3\%$  (3/19),  $p < 0.05$ ) (Figure. 6 C).

In a third model, we evaluated the efficacy of t-PA vectorized by DLF on deep vein thrombosis. The thrombolytic activity of DLF-t-PA was measured *ex vivo* and *in vivo*, 24 hours after induction of vena cava thrombosis in mice (Figure 7). First, venous clots harvested after animals sacrifice were weighted before and after incubation with t-PA or DLF-t-PA.

In *ex vivo* experiments, the weight loss of the venous clots was significantly higher when t-PA was complexed with DLF as compared to t-PA alone ( $51.42 \pm 2.46\%$  vs  $32.27 \pm 6.04\%$  respectively,  $p < 0.05$ ) (Figure 7A). Additionally, the venous clots were harvested from untreated mice or mice treated by t-PA (2.5mg/kg) or an equal amount of t-PA complexed with DLF. There was no difference in the mass of the clots obtained from untreated mice and mice treated with t-PA alone ( $11.6 \pm 1.22$  mg vs  $10.05 \pm 1.06$  mg, N.S). In contrast, the mass of the clots harvested for DLF-t-PA-treated mice dropped significantly to  $6.79 \pm 0.76$  mg ( $p < 0.01$  vs untreated and  $p < 0.05$  vs t-PA-treated) (Figure. 7B).

As *in vivo* t-PA-induced bleeding risk correlates with fibrinogenolysis, we examined whether delivering t-PA to the platelet rich clot with aminated Fucoidan limited unwanted effects on fibrinogen. Fibrinogen plasma concentration (Figure 7C) was significantly reduced in mice treated by t-PA when compared to untreated mice ( $3.46 \pm 0.35$  vs  $4.79 \pm 0.43$  mg.mL<sup>-1</sup>,  $p < 0.05$ ). In contrast, DLF-t-PA did not significantly reduce the plasma concentration of fibrinogen when compared to untreated mice ( $4.285 \pm 0.478$  vs  $4.787 \pm 0.428$ , NS). This result suggests that coupling t-PA to DLF could prevent peripheral fibrinogenolysis induced by t-PA alone.

Together, these results show that DLF potentiates the activity of peripherally injected t-PA in reducing thrombosis in arterial and mesenteric venules vessels.

## Discussion

Intravenous thrombolysis by rt-PA is widely used as a therapy in clinical practice in myocardial infarction, pulmonary embolism and ischemic stroke (5) . However, this treatment

is limited by potential incomplete reperfusion, its neurotoxic effects and its hemorrhagic risk. Thus, research should focus on improving the thrombolytic effect of rt-PA while limiting these unwanted side effects.

In this study, we were able to target t-PA to the thrombus where its binding with plasminogen forms a thrombolytic ternary complex. Fucoïdan linked to lysines allowed both binding to t-PA and thrombus targeting via a strong interaction with P-selectin on activated platelets (16). Furthermore, this strategy aims to protect t-PA through the formation of a complex with lysines linked to Fucoïdan, which allows the finger domain of t-PA to bind to the non-COOH-terminal lysine domain (11). In contrast, the binding of plasminogen to fibrin is dependent on carboxy-terminal lysine residues. Therefore, our molecular construct is able to target t-PA without displacing plasminogen.

Fucoïdan was modified at its reducing end in order to limit the risk of hindering the interaction with P-selectin by chemical modifications on the glycosidic backbone. Moreover, the length of the linker (i.e. an open fucosyl residue linked to diaminopropane) would allow interactions with both t-PA and P-selectin. Oligolysines linked to Fucoïdan were tested *in vitro* and *in vivo* in different models of thrombus formation. Our data demonstrates that DLF potentiates the binding of t-PA to the thrombus, increasing the concentration of t-PA on the clot and improving its thrombolytic potential.

*In vitro* assays demonstrated a potentiating effect of DLF on thrombus lysis by t-PA. In this first step, amination of Fucoïdan by di-Lysine proved to have the highest efficacy as compared to mono or tri-Lys. We also constantly observed a potentiating effect of DLF on platelet-rich thrombi but not on platelet-poor thrombi, confirming the important role of platelets in the initial binding of Fucoïdan to the thrombus. The molar ratio between t-PA and aminated Fucoïdan was also tested. The limit of most of the *in vitro* assays is that aminated Fucoïdan/t-PA reached the thrombus by diffusion and not in a flowing system, and in the absence of PAI-1 to the exception of Rotem<sup>®</sup> experiments performed in whole blood and lysis of deep venous thrombi performed in plasma. These *in vitro* tests were not able to evaluate the ability of aminated-Fucoïdan to transport t-PA to the thrombus.

*In vivo*, FeCl<sub>3</sub>-triggered thrombosis of mesenteric vessels confirmed the capability of DLF to vectorize t-PA. DLF increased the concentration of t-PA within the thrombus and this data provides the evidence that the linkage of Fucoïdan with di-lysine allows a sufficiently stable binding of t-PA to ensure its transport and delivery to the thrombus. It is important to note

that these experiments were carried out with the dose of t-PA used in Humans (1 mg/kg) that is 10 times lower than the dose commonly used in rats (10mg/kg). Potentiation of thrombolysis by the vectorization of t-PA by DLF as compared to t-PA alone was also confirmed in the carotid artery thrombosis model, which is characterized by a strong platelet-rich thrombus. For this reason, we increased the injected dose of t-PA (5 mg/kg).

The deep vein thrombosis model is characterized by progressive thrombus formation induced by venous stenosis leading to blood stagnation and endothelial activation including P-selectin engagement (20). Here again, the effectiveness of t-PA (2.5 mg/kg) complexed with DLF was greater than that of t-PA alone. Hemorrhage risk was verified in this animal model by the measure of free fg rate, which was significantly reduced in mice treated with t-PA alone when compared to untreated ones whereas those treated with DLF-t-PA were protected from any hemorrhage risk.

Several approaches have been proposed for the targeting of plasminogen activators to the thrombus, including their conjugation with specific monoclonal antibodies (25), oligopeptides, and nanoparticles (26). Among these approaches, a construct for the delivery of t-PA was developed by Absar et al (27). t-PA was masked with human serum albumin (HSA) via a thrombin-cleavable peptide (GFPRGFPAAGGctPA). The surface of the albumin molecule was decorated with a homing peptide (CQQHHLGGAKQAGDV) that binds to GPIIb/IIIa expressed on activated platelets. Binding of the construct to the thrombus was demonstrated *in vitro*, by fluorescence microscopy. Although targeting of GPIIb/IIIa has shown some success in increasing thrombolysis, this approach is limited by efficiency of t-PA binding to modified albumin (25%), and the early dependent thrombin rich nature of the clot, which decreases with time. The recent work of Zhu H et al (28) showed that recombinant annexin A2, a membrane molecule that binds to t-PA by lysine residues, accelerates *in vivo* the activation of plasminogen by t-PA thus reducing the volume of cerebral infarction and decreasing the *in vivo* bleeding risk by permitting a reduction in t-PA doses. Our approach is similar to that of Zhu's group on several points and differs on others: the binding of t-PA to modified Fucoidan (like the binding of t-PA to annexin A2) should protect it from circulating PAI-1 and thus prolong its half-life *in vivo*. These strategies did not require modifying the clinically approved t-PA. However, annexin A2 does not target the thrombus, unlike Fucoidan which is a strong ligand for platelet P-selectin, permitting t-PA to concentrate in the thrombus. Furthermore, unlike recombinant annexin A2, the Fucoidan molecule is easier and cheaper to produce.

However, there are several limitations of our study. One remaining limitation is that the structure of Fucoidan is not well defined, and our chemistry team is currently trying to verify and to validate it. Second, although the thrombosis patterns induced by FeCl<sub>3</sub> are reproducible, they are very severe and trigger a massive and continuous generation of thrombin leading to a permanent competition between thrombogenesis and thrombolysis during injection of a thrombolytic. In addition, thrombus formation mechanism in these models does not represent what actually happens in humans. Finally, the reproductibility of thrombosis in deep vein cava model was low, requiring the use of many mice.

### **Conclusion**

In this study, the chemical feasibility and the *in vitro* and *in vivo* proof-of-concept of the efficacy of amine-bearing Fucoidan as a vector for t-PA were explored. *In vivo* experiments demonstrate the beneficial effect on thrombolysis of using amine-bearing Fucoidan as a vector for t-PA. In particular, these experiments show that amine-bearing Fucoidan potentiates the *in vivo* thrombolytic activity of peripherally injected t-PA. The potential clinical use of this construct for the treatment of stroke, myocardial infarction and venous thrombosis presents a novel strategy for highly effective thrombolysis without the need of modifying the clinical-grade t-PA.

### **Disclosures**

A patent has been granted to protect the intellectual property of the presently described amino-Fucoidan as a vector for t-PA.

### **Bibliography**

1. Finegold JA, Asaria P, Francis DP. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int J Cardiol.* 2013 Sep 30;168(2):934-45.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2014 Jan 21;129(3):399-410.
3. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med.* 1995 Dec 14;333(24):1581-7.

4. Chapman KM, Woolfenden AR, Graeb D, Johnston DC, Beckman J, Schulzer M, et al. Intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: A Canadian hospital's experience. *Stroke*. 2000 Dec;31(12):2920-4.
5. Collen D, Lijnen HR. The tissue-type plasminogen activator story. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Aug;29(8):1151-5.
6. Docagne F, Parcq J, Lijnen R, Ali C, Vivien D. Understanding the functions of endogenous and exogenous tissue-type plasminogen activator during stroke. *Stroke*. 2015 Jan;46(1):314-20.
7. Sussman ES, Connolly ES, Jr. Hemorrhagic transformation: a review of the rate of hemorrhage in the major clinical trials of acute ischemic stroke. *Front Neurol*. 2013;4:69.
8. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*. 2005 May;129(3):307-21.
9. Medcalf RL. Fibrinolysis, inflammation, and regulation of the plasminogen activating system. *J Thromb Haemost*. 2007 Jul;5 Suppl 1:132-42.
10. Mutch NJ, Thomas L, Moore NR, Lisiak KM, Booth NA. TAFIa, PAI-1 and alpha-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots. *J Thromb Haemost*. 2007 Apr;5(4):812-7.
11. Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabo L, Kolev K. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):661-8.
12. Silva MM, Thelwell C, Williams SC, Longstaff C. Regulation of fibrinolysis by C-terminal lysines operates through plasminogen and plasmin but not tissue-type plasminogen activator. *J Thromb Haemost*. 2012 Nov;10(11):2354-60.
13. Kaneko M, Sakata Y, Matsuda M, Mimuro J. Interactions between the finger and kringle-2 domains of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *J Biochem*. 1992 Feb;111(2):244-8.
14. Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, et al. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol*. 1992 May;117(4):895-902.
15. Polley MJ, Phillips ML, Wayner E, Nudelman E, Singhal AK, Hakomori S, et al. CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jul 15;88(14):6224-8.

16. Bachelet L, Bertholon I, Lavigne D, Vassy R, Jandrot-Perrus M, Chaubet F, et al. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Feb;1790(2):141-6.
17. Rouzet F, Bachelet-Violette L, Alsac JM, Suzuki M, Meulemans A, Louedec L, et al. Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. *J Nucl Med*. 2011 Sep;52(9):1433-40.
18. Bonnard T, Yang G, Petiet A, Ollivier V, Haddad O, Arnaud D, et al. Abdominal aortic aneurysms targeted by functionalized polysaccharide microparticles: a new tool for SPECT imaging. *Theranostics*. 2014;4(6):592-603.
19. Suzuki M, Bachelet-Violette L, Rouzet F, Beilvert A, Autret G, Maire M, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with fucoidan for molecular MRI of intraluminal thrombus. *Nanomedicine (Lond)*. 2015 Jan;10(1):73-87.
20. Dische Z. New color reactions for determination of sugars in polysaccharides. *Methods Biochem Anal*. 1955;2:313-58.
21. Roth M. Fluorescence reaction for amino acids. *Anal Chem*. 1971 Jun;43(7):880-2.
22. Boulaftali Y, Ho-Tin-Noe B, Pena A, Loyau S, Venisse L, Francois D, et al. Platelet protease nexin-1, a serpin that strongly influences fibrinolysis and thrombolysis. *Circulation*. 2011 Mar 29;123(12):1326-34.
23. Li W, McIntyre TM, Silverstein RL. Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology. *Redox Biol*. 2013;1:50-5.
24. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012 Apr 9;209(4):819-35.
25. Runge MS, Bode C, Matsueda GR, Haber E. Antibody-enhanced thrombolysis: capture of tissue plasminogen activator by a bispecific antibody and direct targeting by an antifibrin-tissue plasminogen activator conjugate in vivo. *Trans Assoc Am Physicians*. 1987;100:250-5.
26. McCarthy JR, Sazonova IY, Erdem SS, Hara T, Thompson BD, Patel P, et al. Multifunctional nanoagent for thrombus-targeted fibrinolytic therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 2012 Jul;7(7):1017-28.
27. Absar S, Gupta N, Nahar K, Ahsan F. Engineering of plasminogen activators for targeting to thrombus and heightening thrombolytic efficacy. *J Thromb Haemost*. 2015 Sep;13(9):1545-56.

28. Zhu H, Fan X, Yu Z, Liu J, Murata Y, Lu J, et al. Annexin A2 combined with low-dose tPA improves thrombolytic therapy in a rat model of focal embolic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 Jun;30(6):1137-46.

**TABLE**

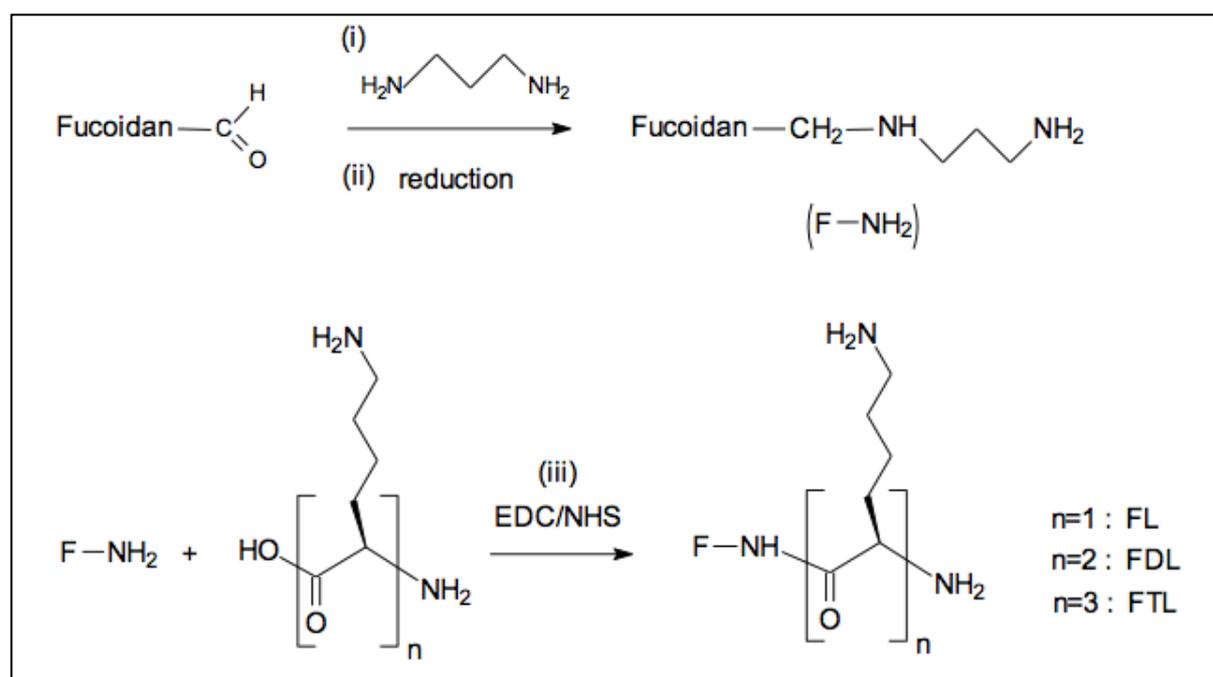
	Primary amine (NH <sub>2</sub> /mol)	<u>fucose</u> (g/100g)	<u>uronic acid</u> (g/100g)	Sulfate (g/100g)	MW* (g/mol)
<u>Fucoidan</u>	-	30.2 ± 4.1	19.5 ± 5.2	17.8 ± 2.4	6,200 ± 200
F-NH <sub>2</sub>	1.05 ± 0.01	49.3 ± 4.6	25.6 ± 2.1	25.9 ± 3.8	9,800 ± 400
LF	1.11 ± 0.03	31.2 ± 7.2	14.7 ± 1.9	30.2 ± 4.4	11,000 ± 400
DLF	1.97 ± 0.04	53.4 ± 6.6	22.1 ± 1.9	18.6 ± 0.8	10,900 ± 500
TLF	2.45 ± 0.01	45.4 ± 4,1	33.9 ± 3.5	21.5 ± 0.8	11,200 ± 500

**Table 1.** Physico-chemical characterization of Fucoidan and its derivatives (N=8)

\* Weight averaged molecular weight

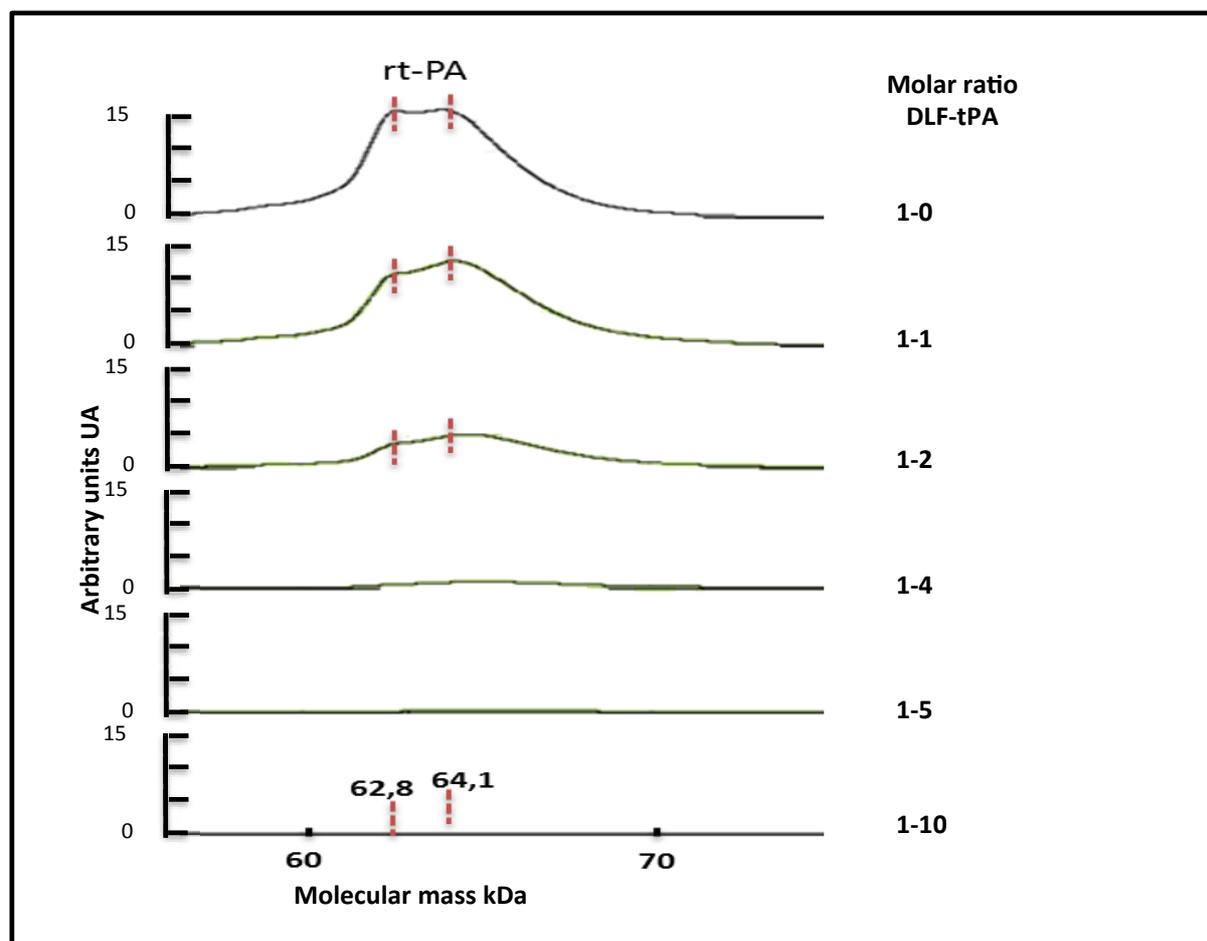
## Figures and legends

FIGURE 1



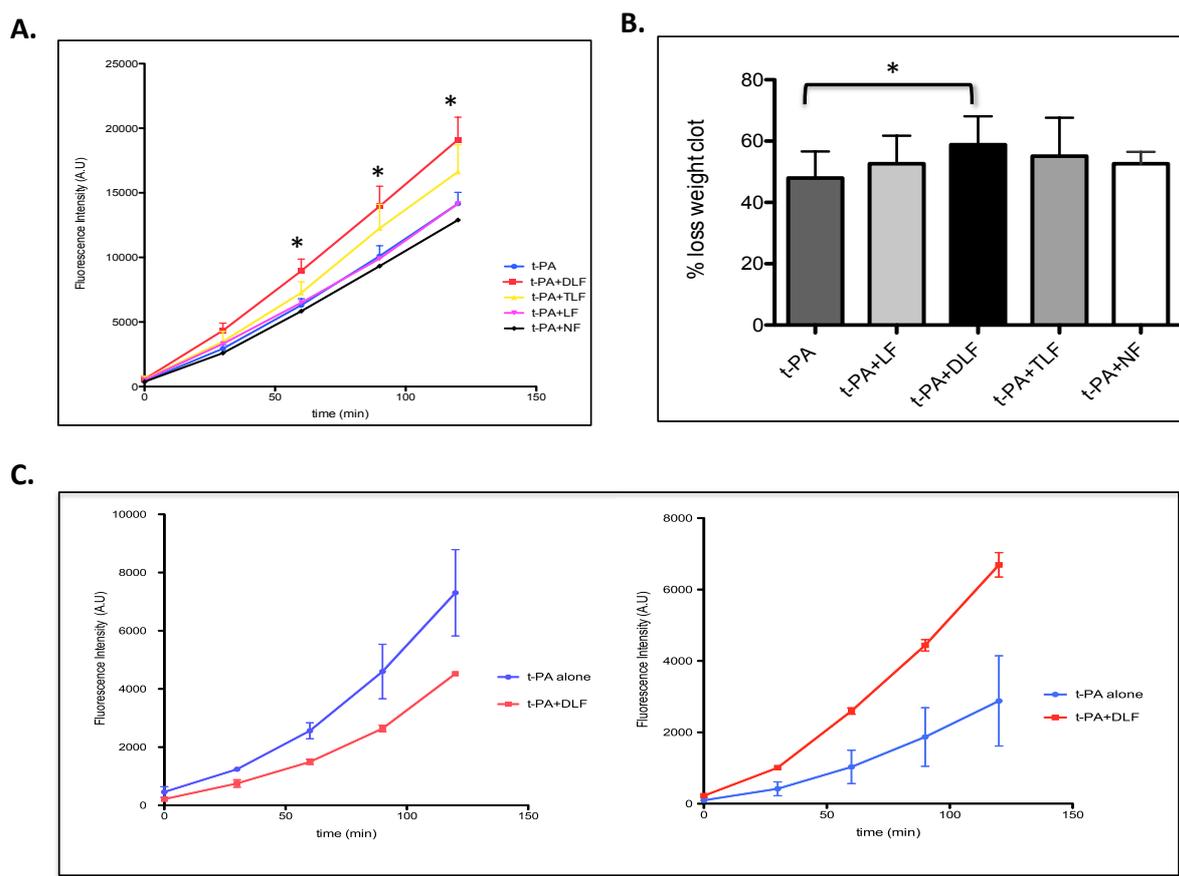
**Figure 1. Scheme for the synthesis of Fucoïdan derivatives.**

(i) Glacial acetic acid, 1.5 M diaminopropane, 90°C, 3 h/dimethyl borane 3 M, 60°C, 3 h; (ii) EDC/NHS 15 min, lysine, di-lysine or tri-lysine 2h at room temperature.



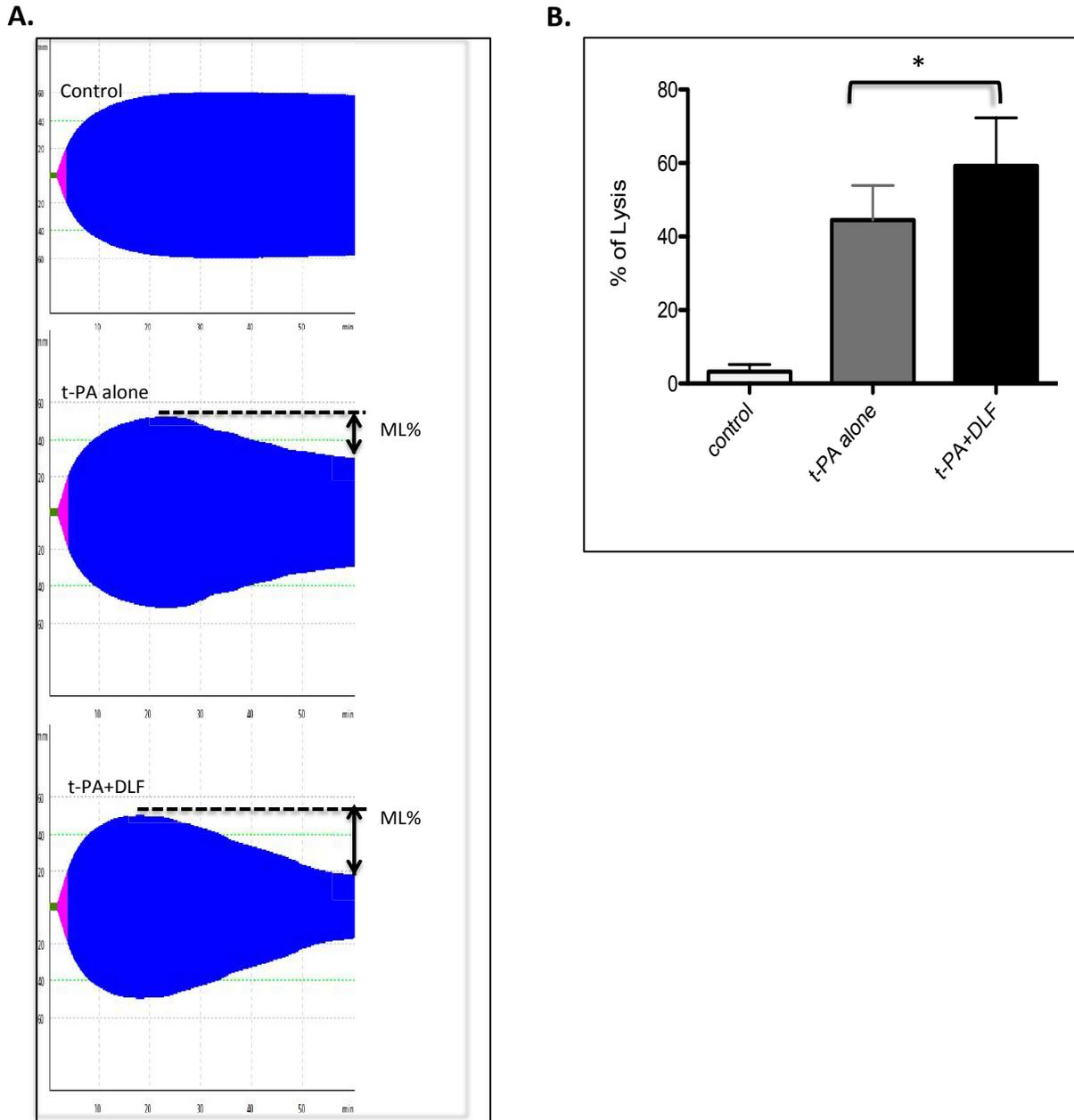
**Figure 2. Complexation of t-PA to DLF.**

The complexation of t-PA to DLF was analyzed using SELDI-TOF MS on CM10 cationic exchange chips. Samples were prepared by mixing with t-PA alone or with a various molar ratio of DLF (from 1-1 to 1-10). When t-PA is incubated with DLF, the intensity of the peak decreased as the molar ratio t-PA/DLF increased.



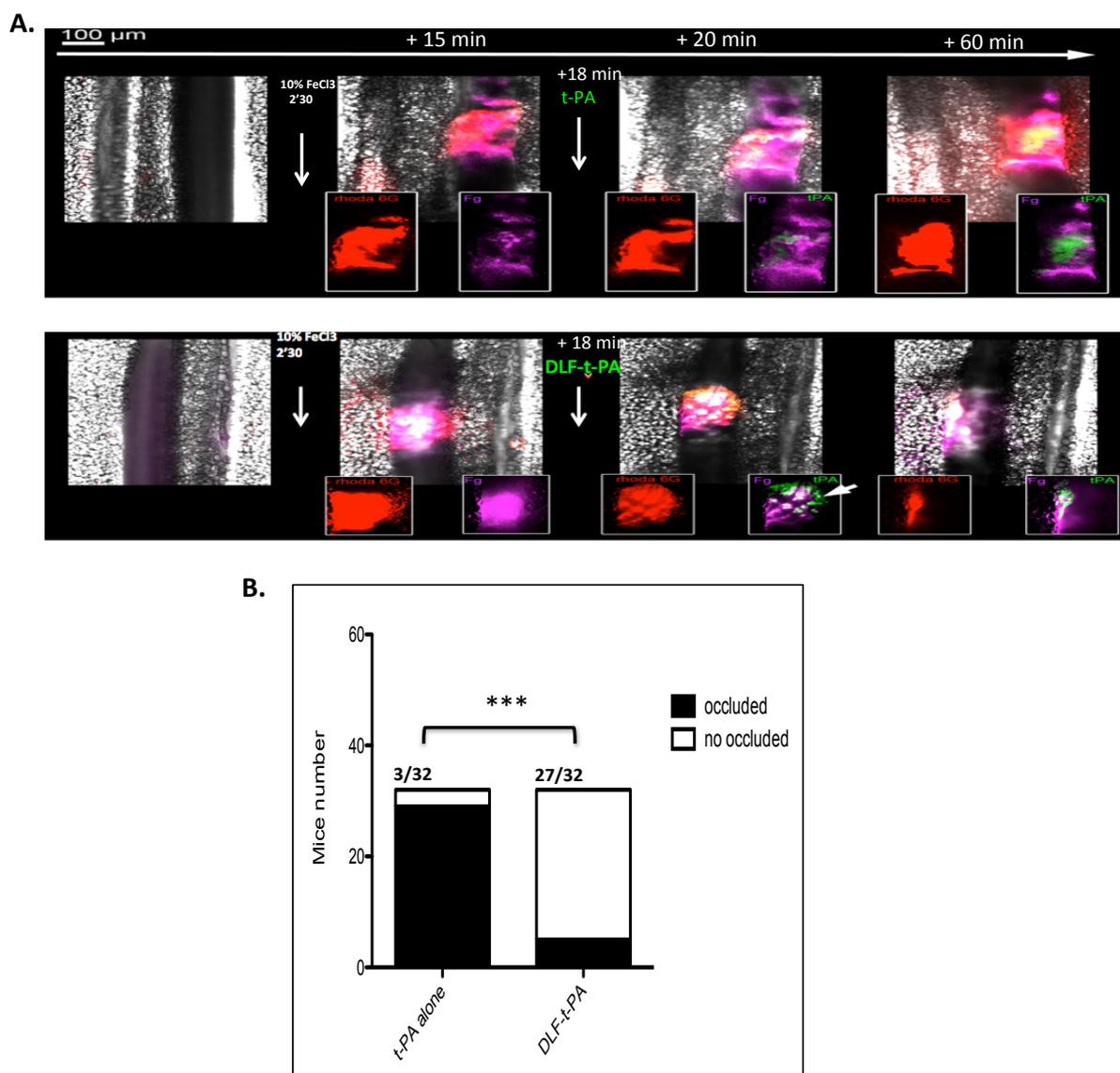
**Figure 3. Effect of amine-bearing Fucoidan/t-PA on *ex vivo* clot lysis.**

**A**, Representative kinetic lysis of platelets-rich thrombi (PRT). Clots were obtained from Plasma-Rich Platelets (PRP) of healthy donors incubated with fluorescein isothiocyanate-human fibrinogen (Fg FITC). The kinetic of fibrinolysis was evaluated by measuring fluorescence release from the clot into the supernatant with a spectrofluorometer (485/520nm) in the presence of low dose of t-PA, or t-PA associated with LF, DLF, TLF or NF. The fluorescence emission in the supernatants is linked to the degradation of fibrin (PDF). **B**, The percentage reduction in clot weight was analyzed over 17 hours at 37 °C. These assays were analyzed with a t-test. Data are presented as Mean % ± SEM of 3 independent experiments performed in triplicate from different healthy donors. \* $P < 0.05$ . **C**, Representative kinetic of the lysis of Platelet-Rich thrombi (PRT) vs Platelet-Poor platelets (PPT) in the presence of t-PA alone or associated with DLF. Data are presented as Mean % ± SEM of independent experiment performed in triplicate from one healthy donor.



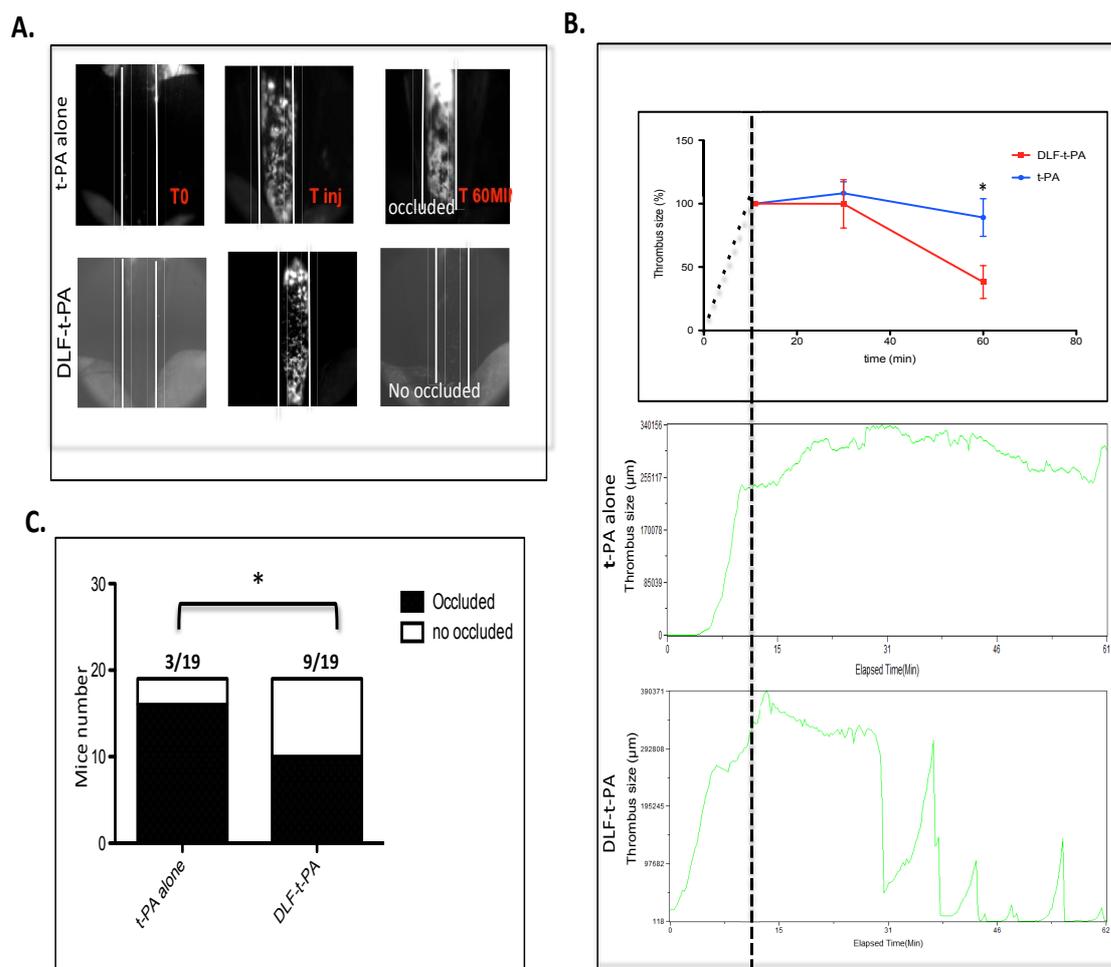
**Figure 4. ROTEM analysis.**

**A**, Representative human whole blood thromboelastogram (ROTEM<sup>®</sup>) profiles. Venous blood was preincubated with a sub-threshold dose of t-PA alone (0.05nmol/L) or complexed with DLF. **B**, In each condition, the rate of fibrinolysis was assessed by the reduction of the amplitude of the thromboelastogram profile at 60 minutes. Results were analyzed using a t-test. Data are presented as mean % ± SEM of 4 independent experiments from different healthy donors, \* $P < 0.05$  significantly different.



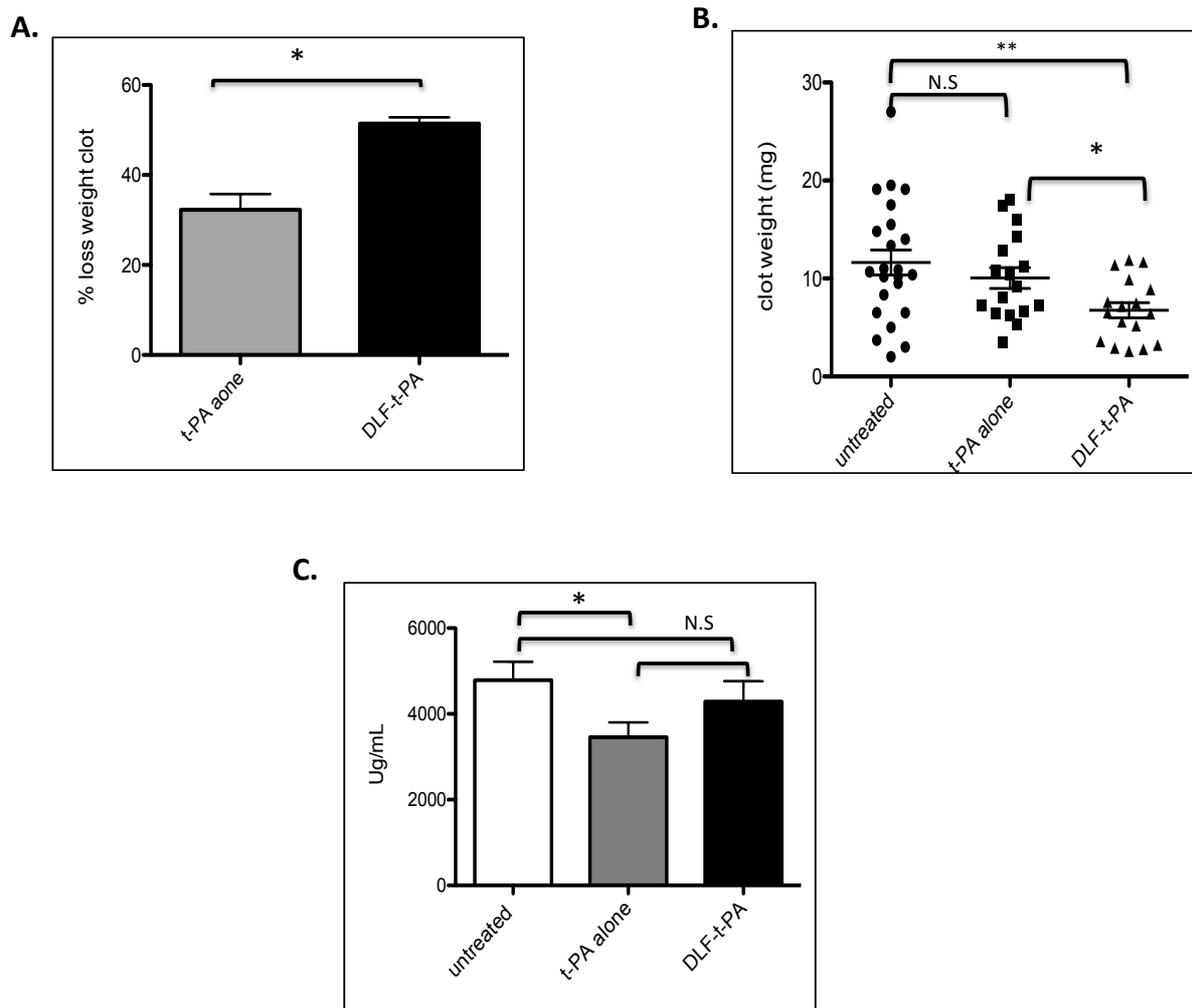
**Figure 5. *In vivo* evaluation of t-PA targeting to thrombi by DLF.**

**A,** Representative intravital images of mouse mesenteric venules vessels reperfusion after a partial occlusion induced by ferric-chloride 10%. The accumulation of Rhodamine 6G-stained platelets (in red), and Fibrinogen Alexa (purple) was recorded. Monitoring of thrombolysis post-administration of t-PA (1mg/Kg) ± DLF (0.5mg/Kg). Reperfusion of vessels was also observed for mice following DLF-t-PA treatment as compared to t-PA alone. Bar = 100 μm. **B,** Quantification of the rate of recanalized vessels within 1 hour following thrombosis induction. Groups were compared using the Pearson  $\chi^2$  test. Data are mean % ± SEM for 32 mice per group, \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figure 6. *In vivo* thrombolytic efficacy of DLF-t-PA on carotid artery thrombosis**

**A,** Intravital microscopy demonstrating thrombolytic activity of t-PA alone or complexed with DLF in *in vivo* carotid arterial thrombosis experiments. Thrombi were induced in the carotid artery of mice using ferric chloride (10%) for 3 min. The accumulation of rhodamine 6G-stained platelets was recorded. Representative images showing the thrombolytic efficacy of intravenously injection of DLF-t-PA following 1 h of thrombosis induction as compared to t-PA alone (5 mg/kg). **B,** Monitoring of the thrombus area using image J before and after intravenous injection of t-PA alone or DLF-t-PA. An important reduction in thrombus size was observed in mice treated by DLF-t-PA as compared to t-PA alone. Groups were compared by use of a 2 ways Anova. Data are mean %  $\pm$  SEM for 6 mice per group,  $*P < 0.05$ . **C,** Quantification of the rate of vessel recanalization within 1 hour following thrombosis induction. Groups were compared by use of the Pearson  $\chi^2$  test. Data are mean %  $\pm$  SEM for 19 mice per group  $*P < 0.05$  significantly different.

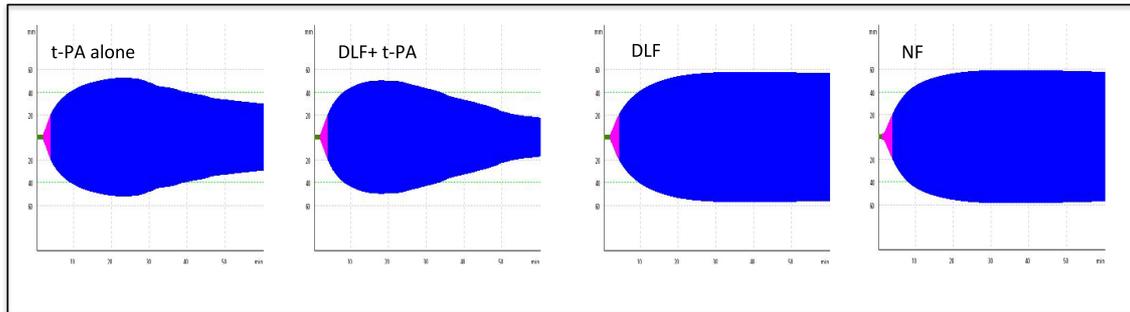


**Figure 7. Efficacy of DLF-t-PA in a deep vein thrombosis model**

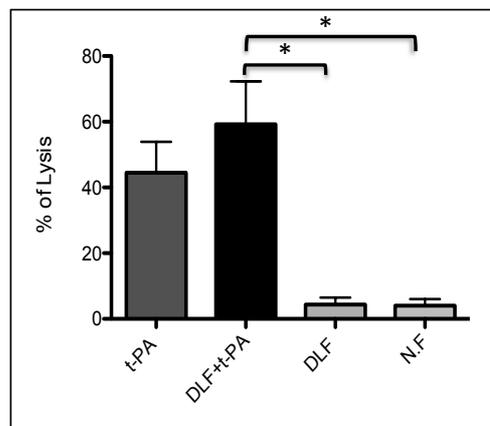
**A,** The percentage of weight loss of clots formed in vena cava *ex vivo* were analyzed over 20 hours at 37 °C. Results were analyzed with an unpaired t-test with Welch's correction. Data are presented as Mean % ± SEM, (\* $P < 0.05$ ,  $n=3$ ). **B,** representative DVT clot weights after one hour of treatment with t-PA alone (2.5 mg/kg mouse), DLF-t-PA or without treatment. Groups were compared using The Mann-Whitney U test. Data are mean % ± SEM \*\* $P < 0.01$  ( $n=20$ , group without treatment;  $n=17$ , groups having received treatment). **C,** The level of free fibrinogen in plasma after 1 hour of treatment with t-PA alone (2.5 mg/Kg mouse), DLF-t-PA or without treatment. The groups were compared using The Mann-Whitney U test. Data are mean%±SEM ( $n=7$ ), \* $P < 0.05$  significantly different.

## SUPPLEMENTARY FIGURE 1

A.



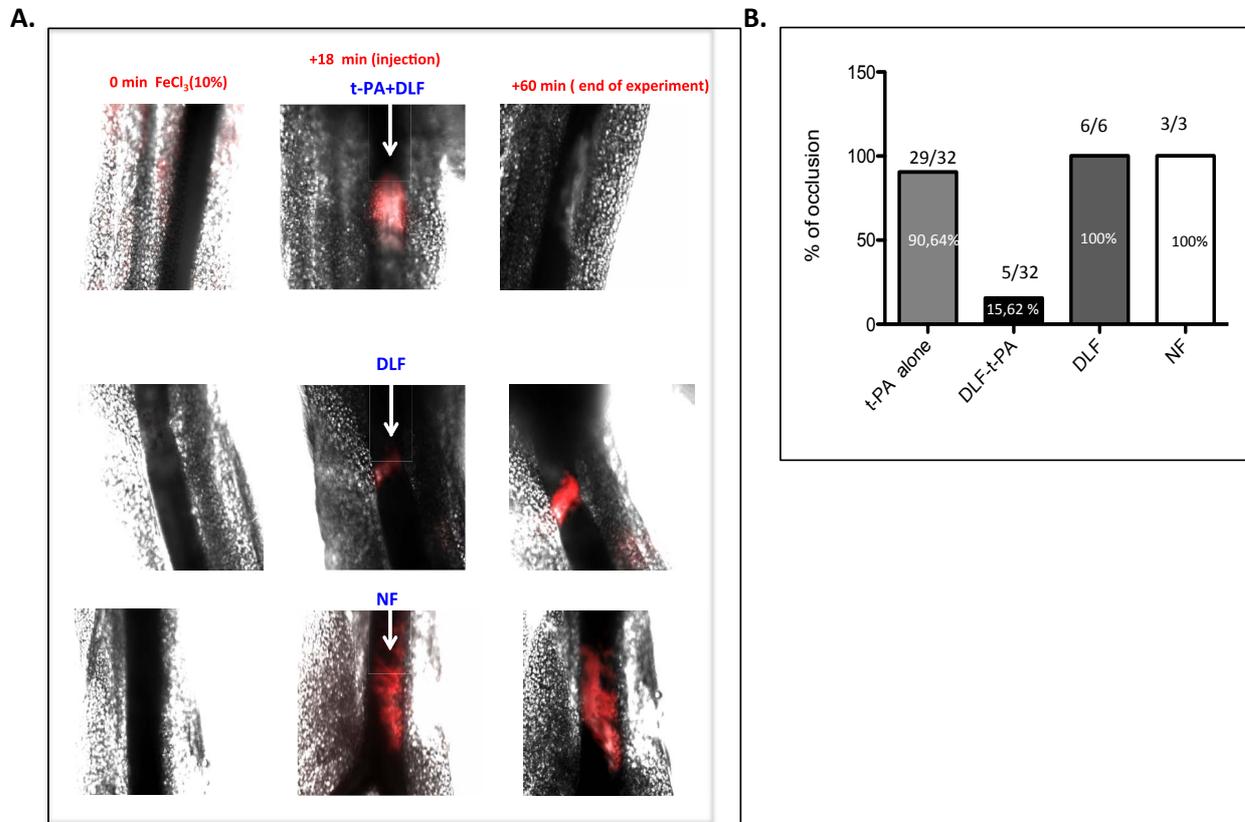
B.



### Supplementary figure1. ROTEM analysis

**A**, Representative human whole blood thromboelastogram (ROTEM<sup>®</sup>) profiles. Venous blood was preincubated with a subthreshold t-PA alone (0,05 nmol/L), DLF-t-PA (0.05 nmol/L), NF alone, and DLF alone. **B**, In each condition, the rate of fibrinolysis was assessed by the reduction of the amplitude of the thromboelastogram profile at 60 minutes. Groups were compared by the use of a t-test. Data are mean % ± SEM, \* $P < 0.05$  significantly different. (n=4), (n=3).

## SUPPLEMENTARY FIGURE 2



### Supplemental figure 2. The *in vivo* Efficacy of DLF-t-PA on thrombolysis.

**A**, Intravital microscopy demonstrating thrombolytic activity of t-PA alone or t-PA-DLF *in vivo* mesenteric thrombosis experiments. Clots were induced in the mesenteric venule of mice using Ferric Chloride (10%) for 2 min30 sec. The accumulation of rhodamine 6G-stained platelets (in red) was recorded. Representative images showing the thrombolytic efficacy of DLF-t-PA following 1 h of thrombosis as compared to t-PA alone, DLF alone (0.5 mg/kg mouse), and native Fucoidan (NF) (1 mg/kg). Reperfusion was observed only on mice treated by DLF-t-PA as compared to controls. **B**, Quantification of the rate of occluded vessels within 1hour following thrombosis induction.

## CONCLUSION

Le potentiel de vectorisation du t-PA par le Fucoïdan aminé ainsi que la preuve du concept ont été validés par notre travail.

Les études *in vitro* ont démontré une accélération de la lyse des thrombi riche en plaquettes ainsi qu'une augmentation de la lyse des caillots de sang total (thromboelastométrie) par le t-PA couplé à notre vecteur comparé au t-PA seul. Les études *in vivo* ont démontré l'efficacité thrombolytique par injection périphérique du t-PA vectorisé par le Fucoïdane aminé à des doses réduites. Cet effet vecteur est médié par l'amination du Fucoïdan à la dilysine. Le Fucoïdan dilysine a démontré qu'il était aussi responsable de la liaison du t-PA, permettant ainsi le ciblage du thrombus, ainsi que de l'augmentation de son effet thrombolytique dans les différentes expérimentations *in vitro* et *in vivo*. De prochaines études sont nécessaires pour mesurer et éventuellement caractériser la liaison t-PA au Fucoïdane aminé.

## **TROISIEME PARTIE : DISCUSION ET CONCLUSION**



Les maladies cardio-vasculaires et en particulier les accidents thrombotiques sont la première cause de mortalité dans le monde. Les accidents vasculaires cérébraux ischémiques (AVC ischémiques), l'infarctus du myocarde (IDM) et l'embolie pulmonaire (EP) sont des complications thrombotiques cardio-vasculaires majeures. En plus de ce taux de mortalité, les complications sont aussi responsables d'une morbidité importante, comme c'est le cas pour les AVC ischémiques qui sont responsables d'une morbidité à type de handicap moteur, sensitif, sensoriel ou cognitif.

La thrombolyse intraveineuse provoquée par le rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator) est le traitement médical (non-interventionnel) le plus utilisé dans l'IDM, l'EP grave et dans l'AVC ischémique. Cependant, ce traitement reste limité par une reperfusion souvent incomplète, des effets neurotoxiques et surtout par une aggravation du risque hémorragique. Vectoriser le rt-PA au thrombus sans augmenter ses effets délétères serait d'un grand intérêt. Mon programme de recherche rentre dans ce contexte, et avait pour objectif d'améliorer le rendement de l'injection IV du rt-PA et de limiter ses effets délétères.

Le t-PA et le plasminogène lient respectivement les résidus lysines N-terminaux et C-terminaux exposés par la fibrine formant un complexe ternaire fibrine-Plasminogène-t-PA [228], où le t-PA clive le plasminogène en plasmine permettant la dégradation du caillot. Il est à noter que la liaison du t-PA aux résidus lysines le protège du PAI-1 circulant (son principal inhibiteur).

Des travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont démontré que le Fucoïdane de bas poids moléculaire (un polysaccharide sulfaté principalement extrait des algues brunes, mimétique du sialyl lewis x (SLe<sup>x</sup>) possède une affinité nanomolaire pour la P-sélectine exposée en forte densité sur les plaquettes activées *in vitro* [202], ainsi qu'une excellente capacité de ciblage du thrombus intraluminale *in vivo* [203].

La stratégie choisie dans notre travail de recherche était d'utiliser à la fois les propriétés du Fucoïdane de reconnaître les thrombi riches en plaquettes, et du t-PA de lier les résidus aminés N-terminaux des lysines. Pour cela des molécules bipolaires ont été synthétisées associant Fucoïdane et résidus aminés en une même chimère moléculaire. Cette stratégie permettrait aussi de protéger le t-PA durant son trajet plasmatique et de le vectoriser au thrombus.

Dans l'objectif d'accélérer *in vivo* la fibrinolyse d'un thrombus occlusif, plusieurs stratégies pharmacologiques sont possibles par rapport au rt-PA intraveineux existant :

- Soit d'y associer des molécules ciblant d'autres processus comme certaines serpinines [116], ou déstabilisant le thrombus comme l'inhibition du TAFI (*thrombin activated-fibrinolysis inhibitor*)

(empêchant le clivage des lysines sur la fibrine) [229] ou l'ADAMTS 13 [230] (responsable de la protéolyse du facteur von Willebrand) ou plus récemment l'ADN libre des thrombi.

- Soit d'en améliorer le rendement. Cette seconde stratégie a retenu notre attention.

Dans un premier temps, l'équipe de chimie a synthétisé différentes constructions associant Fucoïdane et résidus aminés. Cette synthèse se fait en deux étapes : la première consiste à greffer un résidu Diamino propane (DAP), une simple amine présentant 2 NH<sub>2</sub> libres, sur le Fucoïdane ; la seconde étape consiste à accrocher les lysines qui représentent le ligand naturel du t-PA sous formes mono, di et trilycine sur ce résidu *via* leur extrémités carboxy-terminales. Cette modification chimique du Fucoïdane se fait à son extrémité réductrice pour limiter le risque d'entraver l'interaction avec la P- sélectine si des modifications chimiques avaient été effectuées sur le squelette glycosidique. En outre, la longueur du lien (par exemple un résidu fucosyl ouvert lié au DAP et sa flexibilité) doit permettre à la fois les interactions avec le t-PA et la P-sélectine.

Ces différentes molécules bipolaires ont été testées *in vitro* dans différents modèles de thrombus. La complexation de ces molécules au t-PA a montré un effet potentialisateur sur la lyse des thrombi : clivage plus rapide de la fibrine fluorescente, perte de poids du thrombus à 17 heures. Dans cette première étape nous avons pu montrer que c'est l'amination par une dilysine qui s'est avérée la plus efficace. Nous avons observé une constante entre les thrombi riches en plaquettes et thrombi pauvres en plaquettes, confirmant le rôle important des plaquettes dans la liaison initiale du Fucoïdane aux thrombi. Un travail a été fait également concernant le rapport molaire entre la quantité de t-PA et la quantité de Fucoïdane aminé pour optimiser le rendement fibrinolytique du t-PA *in vitro*. Pour les différentes aminations, le rapport était de 1/10 pour t-PA/Fucoïdane monolysine, 1/5 pour t-PA/Fucoïdane dilysine, et de 1/10 pour t-PA/Fucoïdane trilycine, possiblement en rapport avec le nombre de NH<sub>2</sub> libres sur les molécules finales. Il est à noter que les vitesses de lyse des thrombi étaient relativement hétérogènes, dépendant probablement du donneur, de la solidité du thrombus, etc. Ces résultats ont été confirmés sur de caillots de sang total (thromboélastographie).

Ces tests *in vitro* n'étaient pas en mesure d'évaluer la capacité du Fucoïdane aminé à vectoriser le t-PA au thrombus *in vivo*. Cependant, ces expériences pharmacologiques *in vitro* démontrent que le Fucoïdane aminé ne limite pas l'accessibilité du t-PA au thrombus. De plus, ils montrent que le

Fucoïdan aminé comme vecteur facilite la lyse des thrombi par le t-PA, et que cet effet nécessite la présence des plaquettes activées et agrégées dans le thrombus.

Ces résultats *in vitro* étaient encourageants, et ils nous ont permis de retenir le Fucoïdane dilysine comme molécule modèle pour poursuivre ces travaux et une validation *in vivo*.

Nous avons exploré la capacité du Fucoïdane dilysine à vectoriser le t-PA, et à accélérer la fibrinolyse *in vivo*. Pour cela nous avons utilisé un modèle de thrombose mésentérique chez la souris. Une thrombose occlusive est ainsi induite dans une veine mésentérique par exposition au FeCl<sub>3</sub> et soumise à l'action thrombolytique du t-PA seul administré par voie intraveineuse ou en association avec le Fucoïdane dilysine, évaluée par microscopie intravitale. Cette expérience a montré l'effet vecteur du Fucoïdane dilysine et sa capacité à augmenter la concentration du t-PA dans le thrombus. En plus de la preuve du concept de la vectorisation du t-PA par le Fucoïdane dilysine, ce complexe a prouvé une efficacité thrombolytique à la dose du t-PA injecté chez l'homme soit 1 mg/kg, contrairement à ce qui a été rapporté dans la littérature (10 mg/kg) [231].

L'effet vecteur du Fucoïdane dilysine, ainsi que l'activité thrombolytique du complexe Fucoïdane dilysine/t-PA ont été confirmés *in vivo* dans un modèle de thrombose artérielle chez la souris. Une thrombose occlusive est cette fois induite au niveau de l'artère carotidienne par exposition au FeCl<sub>3</sub> et l'activité thrombolytique IV du t-PA administré seul ou en association avec le Fucoïdane dilysine était évaluée par microscopie intravitale. Cette thrombose est sévère, caractérisée par un thrombus robuste, occlusif et très riche en plaquettes, ce qui a nécessité une augmentation de la dose du t-PA utilisé (5mg/Kg). Le rapport de molarité entre la quantité de t-PA et la quantité du Fucoïdane utilisé dans ce modèle a été modulé à 1/2 pour le t-PA /Fucoïdane dilysine au lieu de 1/5 utilisé pour la thrombolyse mésentérique, qui était peu efficace, du fait de la nature du thrombus et probablement d'un encombrement stérique.

La thrombose veineuse profonde (TVP) chez la souris est le troisième modèle animal utilisé dans notre travail de recherche, qui présente des ressemblances avec le caillot formé dans les membres inférieures chez l'homme (appelé aussi phlébite). Une thrombose initiée par une activation des cellules endothéliales générant une forte concentration de vWF et l'intervention du FT généré suite à l'interaction leucocyte-P-sélectine endothéliales, fortement exposées par les cellules endothéliales suite à leur activation. De nouveau, le t-PA associé au Fucoïdane dilysine a montré sa supériorité thrombolytique, comparé au t-PA seul. La dose de t-PA requise pour ce modèle était de 2,5mg/kg avec un rapport molaire de 1/10 pour le complexe t-PA/Fucoïdane dilysine. Il est à noter que

l'association du t-PA au Fucoïdane dilysine a réduit l'effet fibrinolytique du t-PA comparé au t-PA seul, ce qui pourrait prévenir un effet hémorragique de l'injection périphérique du t-PA. Ceci représente une autre preuve qu'il y a formation de complexe t-PA/Fucoïdane Dilysine qui vectorise le t-PA au thrombus, et concentre l'effet du t-PA sur le thrombus.

Dans ce travail, la dose du t-PA injectée était modulée pour chaque modèle, cherchant la sensibilité maximale, et pour avoir un effet thrombolytique net du complexe Fucoïdane dilysine/t-PA comparé au t-PA seul (1mg/kg pour la thrombose mésentérique, 5mg/kg pour la thrombose carotidienne et 2,5 mg/Kg pour la TVP).

Nous ne sommes pas les premiers à essayer d'optimiser le rendement du rt-PA. Dans des travaux récents, Zhu H *et al.* [232, 233] montrent que l'annexine A2 recombinante, une molécule membranaire de liaison du t-PA *via* des résidus lysines, autre que la fibrine, accélère *in vitro* l'activation du plasminogène par le t-PA, réduit le volume de l'infarctus cérébral dans un modèle de thrombus embolique chez le rat et diminue le risque hémorragique *in vivo* en permettant une réduction des doses de t-PA. L'effet de l'ajout d'annexine A2 sur la lyse du thrombus *in vitro*, ainsi que le mécanisme moléculaire de la combinaison t-PA/annexine A2 n'ont pas été étudié dans ce travail.

Notre approche est similaire à celle du groupe de Zhu sur plusieurs points et diffère par d'autres :

- La liaison du t-PA aux amines libres du Fucoïdane aminé, comme de l'annexine A2, devrait le protéger d'une liaison précoce au PAI-1 et prolonger sa demi-vie *in vivo*.
- Par contre l'annexine A2 n'a pas de fonction vectrice au thrombus, alors que le Fucoïdane est un ligand fort de la P-sélectine plaquettaire et probablement de la fibrine de façon moins spécifique (liaison hydrogène), permettant une concentration élevée du t-PA dans le thrombus.

Contrairement à l'annexine A2 recombinante, difficile à produire, le Fucoïdane est une molécule facile à purifier et son amination ne pose pas de problème majeur de synthèse.

D'autres approches ont été testées pour améliorer le rendement fibrinolytique du rt-PA par sa vectorisation au thrombus. L'approche de Absar *et al.* [234] s'inscrit dans cette démarche avec un système de délivrance du t-PA. Ce système est composé d'albumine humaine décorée d'un peptide de synthèse ayant la spécificité de cibler la glycoprotéine plaquettaire GPIIaIIIb fortement exposée sur la surface du thrombus. Le t-PA est encapsulé dans ce système *via* un peptide clivable par la thrombine exposant des terminaisons amines qui le lie et le stabilise. Ce système libère le t-PA

après une action de la thrombine. Cette approche a démontré une efficacité *in vitro* à cibler les agrégats mais elle a plusieurs limites *in vivo* :

Au-delà de sa complexité, ce système retient 25% du t-PA, qui pourrait produire des effets hors cible, ainsi que sa nécessité d'une forte concentration de thrombine pour la délivrance du t-PA encapsulé par ce système, trouvée dans le cas des caillots aigus. Contrairement à notre molécule chimère simple qui augmente l'effet thrombolytique du t-PA comparé au t-PA non vectorisé.

Notre travail présente actuellement plusieurs limitations :

Pour la chimie, la limite majeure de notre stratégie reste la structure non exactement définie du Fucoïdane d'un point de vue chimique et pharmaceutique, et que notre équipe de chimie travaille sur cet aspect pour disposer de composés de grade pharmaceutique (GMP).

La deuxième limite concerne la synthèse de la chimère moléculaire. Le nombre d'amines libres exposées diffère d'une synthèse à une autre, lié probablement à la purification du Fucoïdane, ce qui nécessite une adaptation du ratio de molarité dans les différents modèles expérimentaux.

Pour l'approche *in vivo*, les modèles de thromboses provoquées par le FeCl<sub>3</sub> sont des thromboses reproductibles certes, mais sévères qui provoquent une génération massive et continue de thrombine, conduisant à une compétition pérenne entre la thrombogénèse et la thrombolyse lors de l'injection d'un thrombolytique. De plus, Le mécanisme de formation des thrombi dans ces modèles ne représente pas ce qui se passe réellement chez l'homme.

Pour le modèle de thrombose veineuse profonde utilisé, il présente une limite majeure qui est sa faible reproductibilité comparée aux modèles provoqués par le FeCl<sub>3</sub>, ceci nécessite l'utilisation d'un grand nombre de souris.

Au total, nos résultats sont très encourageants. Après les premières évaluations *in vivo*, une demande de brevet a été déposée par Inserm-Transfert à l'agence européenne. Nos travaux de synthèse chimique et pharmacologique ont permis cette demande de brevet.

Nous testerons ensuite en thérapeutique expérimentale la capacité du complexe Fucoïdane dilysine/t-PA injecté par voie IV à accélérer la revascularisation et à diminuer les conséquences neurologiques d'une occlusion thrombotique cérébrale. Pour cela, nous utiliserons le modèle du thrombus embolique dans la circulation post carotidienne chez le rat, modèle développé au laboratoire [235]. Nous évaluerons le bénéfice du t-PA vectorisé par rapport au t-PA non vectorisé

dans le modèle sur des critères « cliniques » de récupération, sur la taille de l'infarctus, de l'œdème, de la transformation hémorragique, la neurotoxicité, ect.

En conclusion le Fucoïdane aminé comme vecteur du t-PA représente une stratégie intéressante dans les traitements des AVC ischémiques, dans l'IDM et dans l'EP massive. Il permettra de diminuer la dose du t-PA injecter, ainsi de réduire ses effets délétères et éventuellement le coût du traitement.



## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Wolberg, A.S., et al., *Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited*. *Anesth Analg*, 2012. **114**(2): p. 275-85.
2. Tsakiris, D.A., et al., *Hemostasis in the mouse (Mus musculus): a review*. *Thromb Haemost*, 1999. **81**(2): p. 177-88.
3. White, J.G., *Platelet structural physiology: the ultrastructure of adhesion, secretion, and aggregation in arterial thrombosis*. *Cardiovasc Clin*, 1987. **18**(1): p. 13-33.
4. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelet formation*. *Semin Hematol*, 2010. **47**(3): p. 220-6.
5. Leslie, M., *Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets*. *Science*, 2010. **328**(5978): p. 562-4.
6. McIntyre, T.M., et al., *Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions*. *Curr Opin Hematol*, 2003. **10**(2): p. 150-8.
7. Blache, D., *[Structure and function of blood platelets]*. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, 1992. **100**(4): p. A17-24.
8. George, J.N., *Platelets*. *Lancet*, 2000. **355**(9214): p. 1531-9.
9. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(1): p. 31-9.
10. Toti, F., et al., *Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder*. *Blood*, 1996. **87**(4): p. 1409-15.
11. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. *Platelets*, 2001. **12**(5): p. 261-73.
12. Boneu, B.e.J.P.C., ed. *Introduction à l'étude de l'Hémostase et de la Thrombose*. Vol. 2<sup>ème</sup> édition. 1997.
13. Fair, D.S., R.A. Marlar, and E.G. Levin, *Human endothelial cells synthesize protein S*. *Blood*, 1986. **67**(4): p. 1168-71.
14. Fajardo, L.F., *The complexity of endothelial cells. A review*. *Am J Clin Pathol*, 1989. **92**(2): p. 241-50.
15. Jaffe, E.A., *Cell biology of endothelial cells*. *Hum Pathol*, 1987. **18**(3): p. 234-9.
16. Broos, K., et al., *Platelets at work in primary hemostasis*. *Blood Rev*, 2011. **25**(4): p. 155-67.
17. Savage, B., E. Saldivar, and Z.M. Ruggeri, *Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor*. *Cell*, 1996. **84**(2): p. 289-97.
18. Lenting, P.J., et al., *von Willebrand factor: the old, the new and the unknown*. *J Thromb Haemost*, 2012. **10**(12): p. 2428-37.
19. Stocksclaeder, M., R. Schneppenheim, and U. Budde, *Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2014. **25**(3): p. 206-16.
20. Chauhan, A.K., et al., *von Willebrand factor and factor VIII are independently required to form stable occlusive thrombi in injured veins*. *Blood*, 2007. **109**(6): p. 2424-9.
21. Denis, C., et al., *A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(16): p. 9524-9.
22. Andrews, R.K., et al., *Glycoprotein Ib-IX-V*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(8): p. 1170-4.
23. Lanza F, G.C., David T, Mangin P, *Signalling through the platelet GPIb-V-X complex*. *Hématologie.*, 2008. **14**: p. 273-284.

24. Dumas, J.J., et al., *Crystal structure of the GpIb $\alpha$ -thrombin complex essential for platelet aggregation*. *Science*, 2003. **301**(5630): p. 222-6.
25. Berndt, M.C., et al., *The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex*. *Thromb Haemost*, 2001. **86**(1): p. 178-88.
26. Wang, Y., et al., *Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Ib $\alpha$  via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury*. *Circulation*, 2005. **112**(19): p. 2993-3000.
27. Zago, A.C., et al., *The importance of the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet glycoprotein Ib-a for leukocyte recruitment by platelets and for the inflammatory response to vascular injury*. *Arq Bras Cardiol*, 2008. **90**(1): p. 54-63.
28. Berndt, M.C. and R.K. Andrews, *Bernard-Soulier syndrome*. *Haematologica*, 2011. **96**(3): p. 355-9.
29. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* *Blood*, 2003. **102**(2): p. 449-61.
30. Farndale, R.W., et al., *Collagen-platelet interactions: recognition and signalling*. *Biochem Soc Symp*, 2003(70): p. 81-94.
31. Clemetson, J.M., et al., *The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc $\alpha$ R and the natural killer receptors*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(41): p. 29019-24.
32. Jandrot-Perrus, M., et al., *Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily*. *Blood*, 2000. **96**(5): p. 1798-807.
33. Best, D., et al., *GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear*. *Blood*, 2003. **102**(8): p. 2811-8.
34. Clemetson, K.J. and J.M. Clemetson, *Platelet collagen receptors*. *Thromb Haemost*, 2001. **86**(1): p. 189-97.
35. Lagrue-Lak-Hal, A.H., et al., *Expression and function of the collagen receptor GPVI during megakaryocyte maturation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(18): p. 15316-25.
36. Schulz, C., et al., *Identification of novel downstream targets of platelet glycoprotein VI activation by differential proteome analysis: implications for thrombus formation*. *Blood*, 2010. **115**(20): p. 4102-10.
37. Mammadova-Bach, E., et al., *Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation*. *Blood*, 2015. **126**(5): p. 683-91.
38. Cho, M.J., et al., *The roles of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-mediated outside-in signal transduction, thromboxane A<sub>2</sub>, and adenosine diphosphate in collagen-induced platelet aggregation*. *Blood*, 2003. **101**(7): p. 2646-51.
39. Jarvis, G.E., et al., *Distinct roles of GPVI and integrin  $\alpha$ (2) $\beta$ (1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens*. *Br J Pharmacol*, 2002. **137**(1): p. 107-17.
40. Nieswandt, B., et al., *Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation in platelets*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39493-8.
41. Nieswandt, B., et al., *Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice*. *J Exp Med*, 2001. **193**(4): p. 459-69.
42. Massberg, S., et al., *A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo*. *J Exp Med*, 2003. **197**(1): p. 41-9.
43. Takaya, N., et al., *Platelets activated by collagen through the immunoreceptor tyrosine-based activation motif in the Fc receptor gamma-chain play a pivotal role*

- in the development of myocardial ischemia-reperfusion injury.* J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(6): p. 856-64.
44. Zutter, M.M. and S.A. Santoro, *Widespread histologic distribution of the alpha 2 beta 1 integrin cell-surface collagen receptor.* Am J Pathol, 1990. **137**(1): p. 113-20.
  45. Tuckwell, D., et al., *Integrin alpha 2 I-domain is a binding site for collagens.* J Cell Sci, 1995. **108 ( Pt 4)**: p. 1629-37.
  46. Holtkotter, O., et al., *Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen.* J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 10789-94.
  47. Saelman, E.U., et al., *Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin).* Blood, 1994. **83**(5): p. 1244-50.
  48. Pugh, N., et al., *Synergism between platelet collagen receptors defined using receptor-specific collagen-mimetic peptide substrata in flowing blood.* Blood, 2010. **115**(24): p. 5069-79.
  49. Siljander, P.R., et al., *Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood.* Blood, 2004. **103**(4): p. 1333-41.
  50. Gruner, S., et al., *Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo.* Blood, 2003. **102**(12): p. 4021-7.
  51. Ruggeri, Z.M. and G.L. Mendolicchio, *Adhesion mechanisms in platelet function.* Circ Res, 2007. **100**(12): p. 1673-85.
  52. Abbracchio, M.P., et al., *International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy.* Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 281-341.
  53. Gachet, C., *P2 receptors, platelet function and pharmacological implications.* Thromb Haemost, 2008. **99**(3): p. 466-72.
  54. Gachet, C., et al., *Purinergic receptors on blood platelets.* Platelets, 1996. **7**(5-6): p. 261-7.
  55. Gachet, C., *Regulation of platelet functions by P2 receptors.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 277-300.
  56. FitzGerald, G.A., C. Healy, and J. Daugherty, *Thromboxane A2 biosynthesis in human disease.* Fed Proc, 1987. **46**(1): p. 154-8.
  57. Hirata, M., et al., *Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor.* Nature, 1991. **349**(6310): p. 617-20.
  58. Macfarlane, S.R., et al., *Proteinase-activated receptors.* Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 245-82.
  59. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
  60. Hamilton, J.R., I. Cornelissen, and S.R. Coughlin, *Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets.* J Thromb Haemost, 2004. **2**(8): p. 1429-35.
  61. Sambrano, G.R., et al., *Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis.* Nature, 2001. **413**(6851): p. 74-8.
  62. Shattil, S.J. and P.J. Newman, *Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets.* Blood, 2004. **104**(6): p. 1606-15.

63. Bledzka, K., S.S. Smyth, and E.F. Plow, *Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: from discovery to efficacious therapeutic target*. *Circ Res*, 2013. **112**(8): p. 1189-200.
64. Nurden, A. and P. Nurden, *Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9 Suppl 1**: p. 76-91.
65. Yuan, W., et al., *C1B1 is an endogenous inhibitor of agonist-induced integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation*. *J Cell Biol*, 2006. **172**(2): p. 169-75.
66. Yang, H., et al., *TMEM16F forms a  $Ca^{2+}$ -activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation*. *Cell*, 2012. **151**(1): p. 111-22.
67. Falati, S., et al., *Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin*. *J Exp Med*, 2003. **197**(11): p. 1585-98.
68. Brand, K., et al., *Tissue factor mRNA in THP-1 monocytic cells is regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels in response to lipopolysaccharide*. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(9): p. 4732-8.
69. Mackman, N., *Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(6): p. 1015-22.
70. Lwaleed, B.A. and P.S. Bass, *Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease*. *J Pathol*, 2006. **208**(3): p. 327-39.
71. von Bruhl, M.L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. *J Exp Med*, 2012. **209**(4): p. 819-35.
72. Rijken, D.C. and H.R. Lijnen, *New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(1): p. 4-13.
73. Madureira, P.A., et al., *The role of the annexin A2 heterotetramer in vascular fibrinolysis*. *Blood*, 2011. **118**(18): p. 4789-97.
74. Kuzuya, M. and A. Iguchi, *Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling*. *J Atheroscler Thromb*, 2003. **10**(5): p. 275-82.
75. Schaller, J. and S.S. Gerber, *The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(5): p. 785-801.
76. Correa, F., et al., *Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke*. *J Exp Med*, 2011. **208**(6): p. 1229-42.
77. Lemarchant, S., et al., *tPA in the injured central nervous system: different scenarios starring the same actor?* *Neuropharmacology*, 2012. **62**(2): p. 749-56.
78. Levin, E.G. and D.J. Loskutoff, *Cultured bovine endothelial cells produce both urokinase and tissue-type plasminogen activators*. *J Cell Biol*, 1982. **94**(3): p. 631-6.
79. Li, Y., et al., *The role of astrocytes in mediating exogenous cell-based restorative therapy for stroke*. *Glia*, 2014. **62**(1): p. 1-16.
80. Loscalzo, J., *Structural and kinetic comparison of recombinant human single- and two-chain tissue plasminogen activator*. *J Clin Invest*, 1988. **82**(4): p. 1391-7.
81. Rijken, D.C., M. Hoylaerts, and D. Collen, *Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(6): p. 2920-5.
82. Thelwell, C. and C. Longstaff, *The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(4): p. 804-11.
83. Silva, M.M., et al., *Regulation of fibrinolysis by C-terminal lysines operates through plasminogen and plasmin but not tissue-type plasminogen activator*. *J Thromb Haemost*, 2012. **10**(11): p. 2354-60.

84. Cesarman-Maus, G. and K.A. Hajjar, *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. Br J Haematol, 2005. **129**(3): p. 307-21.
85. Fan, X., et al., *Annexin A2: a tissue plasminogen activator amplifier for thrombolytic stroke therapy*. Stroke, 2010. **41**(10 Suppl): p. S54-8.
86. Gravanis, I. and S.E. Tsirka, *Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke*. Expert Opin Ther Targets, 2008. **12**(2): p. 159-70.
87. Verstraete, M., et al., *Pharmacokinetics and systemic fibrinolytic effects of recombinant human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in humans*. J Pharmacol Exp Ther, 1985. **235**(2): p. 506-12.
88. Bu, G., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7427-31.
89. Lee, H.Y., et al., *Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons*. J Neurochem, 2007. **101**(5): p. 1236-47.
90. Rijken, D.C., et al., *Receptor-mediated endocytosis of tissue-type plasminogen activator (t-PA) by liver cells*. Thromb Res Suppl, 1990. **10**: p. 63-71.
91. Noorman, F., E.A. Braat, and D.C. Rijken, *Degradation of tissue-type plasminogen activator by human monocyte-derived macrophages is mediated by the mannose receptor and by the low-density lipoprotein receptor-related protein*. Blood, 1995. **86**(9): p. 3421-7.
92. Sheehan, J.J., et al., *Proteolytic activation of monocyte chemoattractant protein-1 by plasmin underlies excitotoxic neurodegeneration in mice*. J Neurosci, 2007. **27**(7): p. 1738-45.
93. Ling, C., et al., *Disruption of tissue plasminogen activator gene reduces macrophage migration*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **349**(3): p. 906-12.
94. Reijerkerk, A., et al., *The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier*. J Neurochem, 2010. **113**(2): p. 447-53.
95. Flavin, M.P., G. Zhao, and L.T. Ho, *Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro*. Glia, 2000. **29**(4): p. 347-54.
96. Liot, G., et al., *Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity*. J Neurochem, 2006. **98**(5): p. 1458-64.
97. Diaz, V.M., et al., *Tissue plasminogen activator is required for the growth, invasion, and angiogenesis of pancreatic tumor cells*. Gastroenterology, 2002. **122**(3): p. 806-19.
98. Pepper, M.S., *Extracellular proteolysis and angiogenesis*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 346-55.
99. Melchor, J.P. and S. Strickland, *Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology*. Thromb Haemost, 2005. **93**(4): p. 655-60.
100. Samson, A.L. and R.L. Medcalf, *Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity*. Neuron, 2006. **50**(5): p. 673-8.
101. Vivien, D., et al., *Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. **31**(11): p. 2119-34.
102. Mondino, A. and F. Blasi, *uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology*. Trends Immunol, 2004. **25**(8): p. 450-5.

103. Medcalf, R.L., *Fibrinolysis, inflammation, and regulation of the plasminogen activating system*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 132-42.
104. Tang, C.H. and Y. Wei, *The urokinase receptor and integrins in cancer progression*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(12): p. 1916-32.
105. Binder, B.R., J. Mihaly, and G.W. Prager, *uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view*. Thromb Haemost, 2007. **97**(3): p. 336-42.
106. Anglés-cano, E., *Plasminogen activation and leukocyte pericellular proteolysis*. Hématologie., 1996. **2**(5).
107. Booth, N.A., et al., *Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets*. Br J Haematol, 1988. **70**(3): p. 327-33.
108. Samad, F. and D.J. Loskutoff, *Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice*. Mol Med, 1996. **2**(5): p. 568-82.
109. Declerck, P.J., et al., *Identification of a conformationally distinct form of plasminogen activator inhibitor-1, acting as a noninhibitory substrate for tissue-type plasminogen activator*. J Biol Chem, 1992. **267**(17): p. 11693-6.
110. Mottonen, J., et al., *Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1*. Nature, 1992. **355**(6357): p. 270-3.
111. Kruithof, E.K., et al., *Demonstration of a fast-acting inhibitor of plasminogen activators in human plasma*. Blood, 1984. **64**(4): p. 907-13.
112. Arroyo De Prada, N., et al., *Interaction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) with vitronectin*. Eur J Biochem, 2002. **269**(1): p. 184-92.
113. Deng, G., et al., *Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release?* J Cell Biol, 1996. **134**(6): p. 1563-71.
114. Medcalf, R.L. and S.J. Stasinopoulos, *The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2*. FEBS J, 2005. **272**(19): p. 4858-67.
115. Hasina, R., et al., *Plasminogen activator inhibitor-2: a molecular biomarker for head and neck cancer progression*. Cancer Res, 2003. **63**(3): p. 555-9.
116. Boulaftali, Y., et al., *Platelet protease nexin-1, a serpin that strongly influences fibrinolysis and thrombolysis*. Circulation, 2011. **123**(12): p. 1326-34.
117. Bouton, M.C., et al., *Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology*. Blood, 2012. **119**(11): p. 2452-7.
118. Scott, R.W., et al., *Protease nexin. Properties and a modified purification procedure*. J Biol Chem, 1985. **260**(11): p. 7029-34.
119. Choi, B.H., et al., *Protease nexin-1. Localization in the human brain suggests a protective role against extravasated serine proteases*. Am J Pathol, 1990. **137**(4): p. 741-7.
120. Bouton, M.C., et al., *The serpin protease-nexin 1 is present in rat aortic smooth muscle cells and is upregulated in L-NAME hypertensive rats*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(1): p. 142-7.
121. Kanse, S.M., et al., *Reciprocal regulation of urokinase receptor (CD87)-mediated cell adhesion by plasminogen activator inhibitor-1 and protease nexin-1*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 3): p. 477-85.
122. Mansuy, I.M., et al., *Variable and multiple expression of Protease Nexin-1 during mouse organogenesis and nervous system development*. Development, 1993. **119**(4): p. 1119-34.
123. Miranda, E. and D.A. Lomas, *Neuroserpin: a serpin to think about*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(6): p. 709-22.

124. Hastings, G.A., et al., *Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor learning and neuronal survival.* J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 33062-7.
125. Schrimpf, S.P., et al., *Human neuroserpin (PI12): cDNA cloning and chromosomal localization to 3q26.* Genomics, 1997. **40**(1): p. 55-62.
126. Yepes, M. and D.A. Lawrence, *Neuroserpin: a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system.* Thromb Haemost, 2004. **91**(3): p. 457-64.
127. Makarova, A., et al., *The low density lipoprotein receptor-related protein modulates protease activity in the brain by mediating the cellular internalization of both neuroserpin and neuroserpin-tissue-type plasminogen activator complexes.* J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50250-8.
128. Rodriguez-Gonzalez, R., et al., *Neuroprotective effect of neuroserpin in rat primary cortical cultures after oxygen and glucose deprivation and tPA.* Neurochem Int, 2011. **58**(3): p. 337-43.
129. Coughlin, P.B., *Antiplasmin: the forgotten serpin?* FEBS J, 2005. **272**(19): p. 4852-7.
130. Reed, G.L., G.R. Matsueda, and E. Haber, *Platelet factor XIII increases the fibrinolytic resistance of platelet-rich clots by accelerating the crosslinking of alpha 2-antiplasmin to fibrin.* Thromb Haemost, 1992. **68**(3): p. 315-20.
131. Sottrup-Jensen, L., et al., *Primary structure of human alpha 2-macroglobulin. V. The complete structure.* J Biol Chem, 1984. **259**(13): p. 8318-27.
132. Nesheim, M., et al., *Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis.* Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 386-91.
133. Wang, W., et al., *Elements of the primary structure of thrombomodulin required for efficient thrombin-activable fibrinolysis inhibitor activation.* J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 22942-7.
134. Mao, S.S., et al., *Characterization of plasmin-mediated activation of plasma procarboxypeptidase B. Modulation by glycosaminoglycans.* J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 35046-52.
135. Poon, I.K., et al., *Histidine-rich glycoprotein: the Swiss Army knife of mammalian plasma.* Blood, 2011. **117**(7): p. 2093-101.
136. Engemann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 34-45.
137. Matsuo, Y., et al., *Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation.* J Cereb Blood Flow Metab, 1995. **15**(6): p. 941-7.
138. IArabi, R., et al., *A comparative study on the activity and antigenicity of truncated and full-length forms of streptokinase.* Pol J Microbiol, 2011. **60**(3): p. 243-51.
139. Sugimoto, K., et al., *The safety, efficacy, and pharmacoeconomics of low-dose alteplase compared with urokinase for catheter-directed thrombolysis of arterial and venous occlusions.* J Vasc Surg, 2003. **37**(3): p. 512-7.
140. Gurman, P., et al., *Recombinant tissue plasminogen activators (rtPA): a review.* Clin Pharmacol Ther, 2015. **97**(3): p. 274-85.
141. Acheampong, P. and G.A. Ford, *Pharmacokinetics of alteplase in the treatment of ischaemic stroke.* Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012. **8**(2): p. 271-81.

142. *Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group.* N Engl J Med, 1995. **333**(24): p. 1581-7.
143. Hacke, W., et al., *Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS).* JAMA, 1995. **274**(13): p. 1017-25.
144. Hacke, W., et al., *Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators.* Lancet, 1998. **352**(9136): p. 1245-51.
145. Adams, H.P., Jr., et al., *Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment.* Stroke, 1993. **24**(1): p. 35-41.
146. Clark, W.M., et al., *Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke.* JAMA, 1999. **282**(21): p. 2019-26.
147. Hacke, W., et al., *Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke.* N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1317-29.
148. Hacke, W., et al., *Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials.* Lancet, 2004. **363**(9411): p. 768-74.
149. Ciccone, A., et al., *Endovascular treatment for acute ischemic stroke.* N Engl J Med, 2013. **368**(10): p. 904-13.
150. Jauch, E.C., et al., *Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association.* Stroke, 2013. **44**(3): p. 870-947.
151. Jovin, T.G., et al., *Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke.* N Engl J Med, 2015. **372**(24): p. 2296-306.
152. Cronin, C.A., *Intravenous tissue plasminogen activator for stroke: a review of the ECASS III results in relation to prior clinical trials.* J Emerg Med, 2010. **38**(1): p. 99-105.
153. Harada, M., et al., *Incidence and clinical correlation of intracranial hemorrhages observed by 3-tesla gradient echo T(2)\*-weighted images following intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator.* Cerebrovasc Dis, 2010. **29**(6): p. 571-5.
154. Nicole, O., et al., *The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling.* Nat Med, 2001. **7**(1): p. 59-64.
155. Ho-Tin-Noe, B., et al., *Role of plasminogen activation in neuronal organization and survival.* Mol Cell Neurosci, 2009. **42**(4): p. 288-95.
156. Goldstein, P. and E. Wiel, *Management of prehospital thrombolytic therapy in ST-segment elevation acute coronary syndrome (<12 hours).* Minerva Anestesiol, 2005. **71**(6): p. 297-302.
157. Goodman, S.G. and W.J. Cantor, *Drip-and-ship for acute ST-segment myocardial infarction: the pharmacoinvasive strategy for patients treated with fibrinolytic therapy.* Pol Arch Med Wewn, 2009. **119**(11): p. 726-30.
158. Armstrong, P.W., et al., *Fibrinolysis or primary PCI in ST-segment elevation myocardial infarction.* N Engl J Med, 2013. **368**(15): p. 1379-87.

159. Oger, E., *Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale.* *Thromb Haemost*, 2000. **83**(5): p. 657-60.
160. Lapostolle, F., et al., *Role of pulmonary embolism in cardiac arrest after air travel: clot examination in survivors.* *Resuscitation*, 2009. **80**(2): p. 155-6.
161. Torbicki, A., et al., *Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC).* *Eur Heart J*, 2008. **29**(18): p. 2276-315.
162. Goldhaber, S.Z., et al., *Acute pulmonary embolism treated with tissue plasminogen activator.* *Lancet*, 1986. **2**(8512): p. 886-9.
163. Konstantinides, S. and S.Z. Goldhaber, *Pulmonary embolism: risk assessment and management.* *Eur Heart J*, 2012. **33**(24): p. 3014-22.
164. Kucher, N. and S.Z. Goldhaber, *Management of massive pulmonary embolism.* *Circulation*, 2005. **112**(2): p. e28-32.
165. Wan, S., et al., *Thrombolysis compared with heparin for the initial treatment of pulmonary embolism: a meta-analysis of the randomized controlled trials.* *Circulation*, 2004. **110**(6): p. 744-9.
166. Yamasawa, F., et al., *The role of recombinant human tissue-type plasminogen activator in the treatment of acute pulmonary thromboembolism.* *Intern Med*, 1992. **31**(7): p. 885-8.
167. Meyer, G., et al., *Fibrinolysis for patients with intermediate-risk pulmonary embolism.* *N Engl J Med*, 2014. **370**(15): p. 1402-11.
168. Berman, C.L., et al., *A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein.* *J Clin Invest*, 1986. **78**(1): p. 130-7.
169. McEver, R.P., et al., *GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies.* *J Clin Invest*, 1989. **84**(1): p. 92-9.
170. Merten, M. and P. Thiagarajan, *P-selectin in arterial thrombosis.* *Z Kardiol*, 2004. **93**(11): p. 855-63.
171. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies.* *Blood*, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
172. Ley, K., *The role of selectins in inflammation and disease.* *Trends Mol Med*, 2003. **9**(6): p. 263-8.
173. Leeuwenberg, J.F., et al., *E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro.* *Immunology*, 1992. **77**(4): p. 543-9.
174. Dunlop, L.C., et al., *Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein.* *J Exp Med*, 1992. **175**(4): p. 1147-50.
175. Hartwell, D.W., et al., *Role of P-selectin cytoplasmic domain in granular targeting in vivo and in early inflammatory responses.* *J Cell Biol*, 1998. **143**(4): p. 1129-41.
176. Frenette, P.S., et al., *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(16): p. 7450-4.
177. Mayadas, T.N., et al., *Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice.* *Cell*, 1993. **74**(3): p. 541-54.

178. Singbartl, K., S.A. Green, and K. Ley, *Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure*. FASEB J, 2000. **14**(1): p. 48-54.
179. Dong, Z.M., A.A. Brown, and D.D. Wagner, *Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. Circulation, 2000. **101**(19): p. 2290-5.
180. Huo, Y., et al., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. Nat Med, 2003. **9**(1): p. 61-7.
181. Manka, D., et al., *Absence of p-selectin, but not intercellular adhesion molecule-1, attenuates neointimal growth after arterial injury in apolipoprotein e-deficient mice*. Circulation, 2001. **103**(7): p. 1000-5.
182. Gross, P.L., et al., *Leukocyte-versus microparticle-mediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(6): p. 1318-26.
183. Polgar, J., J. Matuskova, and D.D. Wagner, *The P-selectin, tissue factor, coagulation triad*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1590-6.
184. Gould, T.J., et al., *Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(9): p. 1977-84.
185. McEver, R.P. and R.D. Cummings, *Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S97-103.
186. Mehta, P., R.D. Cummings, and R.P. McEver, *Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32506-13.
187. Vestweber, D. and J.E. Blanks, *Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 181-213.
188. Hiramatsu, Y., H. Tsujishita, and H. Kondo, *Studies on selectin blocker. 3. Investigation of the carbohydrate ligand sialyl Lewis X recognition site of P-selectin*. J Med Chem, 1996. **39**(23): p. 4547-53.
189. Gestwicki, J.E., et al., *Selective immobilization of multivalent ligands for surface plasmon resonance and fluorescence microscopy*. Anal Biochem, 2002. **305**(2): p. 149-55.
190. Koenig, A., et al., *Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 877-89.
191. Li, B., et al., *Fucoxanthin: structure and bioactivity*. Molecules, 2008. **13**(8): p. 1671-95.
192. Kylin, H., *Zur Biochemie der Meeresalgen.*, Zeitschrift für Physiologische Chemie 83. 1913: p. 171-197.
193. Senthilkumar, K., et al., *Brown seaweed fucoxanthin: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer*. Int J Biol Macromol, 2013. **60**: p. 366-74.
194. Ale, M.T., J.D. Mikkelsen, and A.S. Meyer, *Important determinants for fucoxanthin bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucoxanthin-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds*. Mar Drugs, 2011. **9**(10): p. 2106-30.
195. Athukorala, Y., et al., *Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea*. Bioresour Technol, 2007. **98**(9): p. 1711-6.
196. Min, S.K., et al., *An antithrombotic fucoxanthin, unlike heparin, does not prolong bleeding time in a murine arterial thrombosis model: a comparative study of*

- Undaria pinnatifida* sporophylls and *Fucus vesiculosus*. *Phytother Res*, 2012. **26**(5): p. 752-7.
197. Lee, S.H., et al., *Anti-inflammatory effect of fucoidan extracted from Ecklonia cava in zebrafish model*. *Carbohydr Polym*, 2013. **92**(1): p. 84-9.
  198. Lee, J.B., et al., *Novel antiviral fucoidan from sporophyll of Undaria pinnatifida (Mekabu)*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2004. **52**(9): p. 1091-4.
  199. Wang, J., et al., *Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol*, 2008. **42**(2): p. 127-32.
  200. Haneji, K., et al., *Fucoidan extracted from Cladosiphon okamuranus Tokida induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells*. *Nutr Cancer*, 2005. **52**(2): p. 189-201.
  201. Teruya, T., et al., *Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured Cladosiphon okamuranus TOKIDA in U937 cells*. *Int J Biol Macromol*, 2007. **41**(3): p. 221-6.
  202. Bachelet, L., et al., *Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1790**(2): p. 141-6.
  203. Rouzet, F., et al., *Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation*. *J Nucl Med*, 2011. **52**(9): p. 1433-40.
  204. Bonnard, T., et al., *Abdominal aortic aneurysms targeted by functionalized polysaccharide microparticles: a new tool for SPECT imaging*. *Theranostics*, 2014. **4**(6): p. 592-603.
  205. Day, S.M., et al., *Murine thrombosis models*. *Thromb Haemost*, 2004. **92**(3): p. 486-94.
  206. Westrick, R.J., M.E. Winn, and D.T. Eitzman, *Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series)*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(10): p. 2079-93.
  207. Carmeliet, P., L. Moons, and D. Collen, *Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis*. *Cardiovasc Res*, 1998. **39**(1): p. 8-33.
  208. Pierangeli, S.S., et al., *Effect of human IgG antiphospholipid antibodies on an in vivo thrombosis model in mice*. *Thromb Haemost*, 1994. **71**(5): p. 670-4.
  209. Pierangeli, S.S., et al., *Induction of thrombosis in a mouse model by IgG, IgM and IgA immunoglobulins from patients with the antiphospholipid syndrome*. *Thromb Haemost*, 1995. **74**(5): p. 1361-7.
  210. Dubois, C., et al., *Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo*. *Blood*, 2006. **107**(10): p. 3902-6.
  211. Eckly, A., et al., *Mechanisms underlying FeCl<sub>3</sub>-induced arterial thrombosis*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(4): p. 779-89.
  212. Barr, J.D., et al., *Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model*. *Blood*, 2013. **121**(18): p. 3733-41.
  213. Farrehi, P.M., et al., *Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice*. *Circulation*, 1998. **97**(10): p. 1002-8.
  214. Ni, H., et al., *Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(3): p. 385-92.
  215. Vandeplassche, G., et al., *Singlet oxygen and myocardial injury: ultrastructural, cytochemical and electrocardiographic consequences of photoactivation of rose bengal*. *J Mol Cell Cardiol*, 1990. **22**(3): p. 287-301.
  216. Perez, P., et al., *Thrombus formation induced by laser in a mouse model*. *Exp Ther Med*, 2014. **8**(1): p. 64-68.

217. Arfors, K.E., et al., *In vivo quantitation of platelet activity using biolaser-induced endothelial injury*. *Bibl Anat*, 1969. **10**: p. 502-6.
218. Rosen, E.D., et al., *Laser-induced noninvasive vascular injury models in mice generate platelet- and coagulation-dependent thrombi*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(5): p. 1613-22.
219. Gachet, C., et al., [*Atherothrombosis: transposition of the models to the clinic and reciprocally*]. *Therapie*, 2006. **61**(5): p. 389-94.
220. Hechler, B., et al., *Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(1): p. 173-84.
221. Falati, S., et al., *Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse*. *Nat Med*, 2002. **8**(10): p. 1175-81.
222. Diaz, J.A., et al., *Critical review of mouse models of venous thrombosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(3): p. 556-62.
223. Konstantinides, S., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice*. *Circulation*, 2001. **103**(4): p. 576-83.
224. Kurz, K.D., B.W. Main, and G.E. Sandusky, *Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride*. *Thromb Res*, 1990. **60**(4): p. 269-80.
225. Zhu, Y., P. Carmeliet, and W.P. Fay, *Plasminogen activator inhibitor-1 is a major determinant of arterial thrombolysis resistance*. *Circulation*, 1999. **99**(23): p. 3050-5.
226. Eitzman, D.T., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice*. *Blood*, 2000. **95**(2): p. 577-80.
227. Saniabadi, A.R., et al., *Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction*. *Thromb Haemost*, 1995. **73**(5): p. 868-72.
228. Longstaff, C., et al., *The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies*. *Blood*, 2011. **117**(2): p. 661-8.
229. Willemse, J.L., et al., *Carboxypeptidase U (TAFIa): a new drug target for fibrinolytic therapy?* *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(12): p. 1962-71.
230. Crescente, M., et al., *ADAMTS13 exerts a thrombolytic effect in microcirculation*. *Thromb Haemost*, 2012. **108**(3): p. 527-32.
231. Korninger, C. and D. Collen, *Studies on the specific fibrinolytic effect of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in human blood and in various animal species in vitro*. *Thromb Haemost*, 1981. **46**(2): p. 561-5.
232. Zhu, H., et al., *Annexin A2 combined with low-dose tPA improves thrombolytic therapy in a rat model of focal embolic stroke*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010. **30**(6): p. 1137-46.
233. Jiang, Y., et al., *Combination Low-Dose Tissue-Type Plasminogen Activator Plus Annexin A2 for Improving Thrombolytic Stroke Therapy*. *Front Cell Neurosci*, 2015. **9**: p. 397.
234. Absar, S., et al., *Engineering of plasminogen activators for targeting to thrombus and heightening thrombolytic efficacy*. *J Thromb Haemost*, 2015. **13**(9): p. 1545-56.
235. Lapergue, B., et al., *High-density lipoprotein-based therapy reduces the hemorrhagic complications associated with tissue plasminogen activator treatment in experimental stroke*. *Stroke*, 2013. **44**(3): p. 699-707.



## **ANNEXE : BREVET**