

Interactions Plaquettes-Bactéries

1. Généralités

Les plaquettes sont à l'interface entre hémostasie et immunité. En effet, elles sont un composant clé du système immunitaire inné, supporté notamment par la présence des Toll Like Receptor (TLR) à leur surface. Toutefois, elles exercent également un rôle majeur au sein de l'hémostasie primaire afin de réparer les brèches vasculaires à travers la formation du clou plaquettaire. Ce mécanisme a deux fonctions : éviter une perte sanguine importante, mais aussi bloquer l'accès aux potentiels pathogènes à l'intérieur du système vasculaire.

De plus, l'interaction plaquettes-bactéries joue un rôle crucial dans la pathogenèse des infections cardiovasculaires dont l'EI, et l'agrégation plaquettaire induite par les bactéries possède un rôle particulier dans la pathogenèse de l'EI.

Lorsque les plaquettes sont activées, elles sécrètent le contenu de leurs granules, qui est connu pour contenir plus de 300 protéines, telles que des molécules bioactives comme l'ADP et la sérotonine. L'ADP agit pour recruter plus de plaquettes dans le thrombus croissant, tandis que la sérotonine provoque une vasoconstriction pour réduire la perte sanguine. Enfin, les cytokines et chimiokines sécrétées vont recruter les leucocytes pour gérer une potentielle infection, et les peptides antimicrobiens sécrétés agissent pour tuer le pathogène.

Néanmoins, les plaquettes peuvent également être activées dans des localisations autres que des blessures, ce qui peut mener à des conséquences graves telles que l'EI ou la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Ainsi, des études ont montré que certaines bactéries ont la capacité d'induire une agrégation plaquettaire *in vitro*, et que cette capacité corrèle avec leur capacité à induire une EI (38). L'agrégation plaquettaire joue donc un rôle majeur dans la pathogenèse de l'EI.

Trois mécanismes existent alors pour la médiation des interactions entre pathogènes et plaquettes :

- **Un mécanisme indirect** : Liaison de la bactérie à une protéine plasmatique qui est un ligand pour un récepteur plaquettaire ;
- **Un mécanisme direct** : Liaison directe de la bactérie à un récepteur plaquettaire ;
- **La sécrétion de produits bactériens** tels que les toxines qui interagissent avec les plaquettes.

Il existe également des interactions qui n'activent pas les plaquettes, et celles-ci sont généralement de haute affinité et jouent probablement un rôle dans le support de l'adhésion plaquettaire sous des conditions de flux sanguin turbulent. On pourrait ainsi supposer que les protéines bactériennes qui induisent l'agrégation sont différentes de celles qui induisent l'adhésion. De même, l'adhésion et l'activation des plaquettes peuvent résulter de mécanismes indépendants médiés par différents composants bactériens ainsi que différents récepteurs plaquettaires (39). Ainsi, une bactérie peut avoir un phénotype d'activation, d'adhésion, les deux ou aucun des deux, et ces différents phénotypes peuvent être spécifiques pour différentes maladies

Plusieurs études sur l'agrégation plaquettaire *in vitro* induite par les bactéries ont été menées et il apparaît qu'elle est souvent caractérisée par la présence d'un temps de latence, très variable en fonction des espèces bactériennes. Une augmentation de la concentration de bactéries utilisée peut réduire ce temps de latence mais ne le fait jamais totalement disparaître (40,41). Le mécanisme est donc différent de l'agrégation plaquettaire classiquement induite par les agonistes plaquettaires solubles pour lesquels il n'existe pas de temps de latence. De plus, l'agrégation induite par les bactéries suit un processus tout ou rien, contrairement à l'agrégation induite par les agonistes plaquettaires habituels qui peuvent ne provoquer qu'une agrégation partielle ou réversible.

Comprendre les interactions plaquettes-bactéries offre alors la possibilité de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans les infections vasculaires. *S. aureus* et *S. sanguinis* sont connus pour être parmi les espèces bactériennes les plus fréquemment impliquées dans les événements emboliques dans l'EI, c'est pourquoi nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à ces deux pathogènes.

2. Interactions Plaquettes - *Staphylococcus aureus*

S. aureus est une bactérie extrêmement bien équipée en facteurs pathogéniques, incluant les adhésines de surface qui favorisent la colonisation des tissus, et les exo-enzymes et toxines qui favorisent les dommages tissulaires et la propagation de la maladie (7). L'équipe de Sullam a mis en évidence en 1996, grâce à l'utilisation d'une souche mutante dépourvue de capacité de liaison dans un modèle lapin d'EI, que la liaison directe de *S. aureus* aux plaquettes est bien un déterminant majeur de sa virulence dans la pathogénèse de l'EI (42). En effet, les animaux qui

ont été infectés avec la souche mutante développent significativement moins fréquemment d'EI et la densité des micro-organismes au sein des végétations est significativement moins importante qu'avec la souche sauvage de *S. aureus*. Une incidence réduite de la dissémination métastatique dans les reins ainsi qu'une diminution des concentrations de bactéries dans le parenchyme rénal ont également été observées avec la souche mutante (42).

Les interactions directes avec *S. aureus* se produisent notamment lorsque les protéines de la paroi cellulaire de la bactérie se lient directement aux récepteurs de l'hôte exposés. Les molécules bactériennes exposent ainsi typiquement des propriétés agonistes-like vis-à-vis du récepteur de l'hôte, et la liaison aboutit le plus souvent à l'activation des cellules de l'hôte.

Les interactions indirectes nécessitent quant à elles une molécule accessoire, qui correspond généralement à une protéine plasmatique qui est un ligand naturel pour le récepteur de l'hôte, et qui va permettre de lier *S. aureus* avec la cellule hôte : c'est notamment le cas du fibrinogène et de la fibronectine.

Enfin, une interaction alternative se produit lorsque *S. aureus* sécrète une protéine ou une toxine capable de se lier directement au niveau des cellules de l'hôte.

Une des particularités de *S. aureus* est qu'il est capable à lui seul d'induire l'expression de Facteur Tissulaire (FT) par les cellules endothéliales, contrairement aux streptocoques et à *S. epidermidis*, qui ont toujours besoin de monocytes sécrétant de l'interleukine 1 et donc d'une lésion endothéliale. Ceci explique l'implication importante de *S. aureus* dans les EI sur valves natives saines (9).

Toutes ces interactions se font par l'intermédiaire des principaux récepteurs plaquettaires que sont l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, la $\text{GpIb}\alpha$ et le $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$. La liaison initiale de *S. aureus* à la surface plaquettaire est un processus rapide et saturable, mais également réversible, qui dépend du nombre de récepteurs disponibles à la surface des plaquettes pour les bactéries, et donc du nombre de cellules de *S. aureus* qui vont pouvoir s'y fixer (38).

1- Rôle de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est la glycoprotéine membranaire la plus abondante présente à la surface des plaquettes. Elle fait partie de la famille des récepteurs homodimériques des intégrines qui

régulent l'adhésion plaquettaire et la signalisation. Il existe également un pool additionnel localisé dans les granules alpha et le système canaliculaire ouvert des plaquettes. Lors de l'activation plaquettaire, son expression peut être augmentée jusqu'à 50%. L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ correspond en fait au récepteur plaquettaire du fibrinogène et régule la liaison des plaquettes avec le fibrinogène, ce qui va finalement aboutir à la formation des agrégats plaquettaires (43).

Plusieurs études ont montré que *S. aureus* était capable d'adhérer aux plaquettes d'une manière augmentée par le fibrinogène (Figure 7) (44). Ainsi, les MSCRAMMs (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) regroupent de nombreuses protéines de *S. aureus* hautement similaires entre elles, 24 au total, permettant à la bactérie d'adhérer aux tissus, ce qui représente une étape critique dans l'établissement des infections. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine riche en répétitions serine aspartate.

Parmi ces MSCRAMMs, les plus importantes sont les Clumping Factor A (45) et B (46) (ClfA et ClfB), ainsi que les Fibronectin Binding Protein A et B (FnBPA et FnBPB) (47). Ce sont des protéines de liaison au fibrinogène pour la plupart, mais également à la fibronectine pour les FnBP.

Table 1 Staphylococcus aureus adhesins*		
Cell wall-anchored proteins		
Adhesin	Binding ligand	Role in sepsis/endocarditis
Secreted proteins		
Clumping factor A (ClfA)	Fibrinogen γ -chain Complement factor I	Adhesion to fibrin(ogen), clumping and immune evasion, platelet aggregation Immune evasion
Clumping factor B (ClfB)	Fibrinogen γ -chain	Minor, mostly implicated in colonization
Fibronectin binding proteins (FnBPA and FnBPB)	Fibrinogen γ -chain Fibronectin Elastin Plasminogen	Adhesion to fibrin(ogen), clumping and immune evasion, platelet aggregation Adhesion, endothelial cell invasion Unknown
Protein A (SpA)	IgG Fc, IgM Fab VH3 subclass, TNFR1 von Willebrand factor	Breaking free from biofilms Immune evasion Adhesion, platelet aggregation
Collagen adhesin (Cna)	Collagen Complement protein C1q	Adhesion Immune evasion
Bone sialoprotein-binding protein	Fibrinogen α -chain Complement regulator C4BP	Unknown
Serine-rich adhesin for platelets (SraP)	N-acetylneuraminic acid, unknown platelet ligand	Platelet binding, implicated in endocarditis
<i>S. aureus</i> iron-regulated surface determinant B (IsdB)	Haem β3 integrins	Iron acquisition Endothelial cell invasion, platelet activation

Secreted proteins		
Staphylocoagulase	Thrombin, fibrinogen	Coagulase activity: immune evasion, growing of endocarditis lesions, platelet activation
von Willebrand factor binding protein (VWbp)	Thrombin, fibrinogen von Willebrand factor	Coagulase activity: immune evasion, growing of endocarditis lesions, platelet activation Adhesion under shear stress
Staphylokinase	Plasmin(ogen)	Activation of fibrinolysis, spreading trough tissue barriers, immune evasion
Extracellular fibrinogen binding protein (Efb)	Fibrinogen, complement C3	Immune evasion
Extracellular matrix binding protein (Emp)	Fibronectin, fibrinogen, collagen and vitronectin	Adhesion
Extracellular adherence proteins (Eap)	Prothrombin, fibrinogen, fibronectin, thrombospondin-1, bone sialoprotein, vitronectin Osteopontin Homophilic interactions	Adhesion, immune evasion, platelet and endothelial cell activation Bacterial clustering
Alfa-toxin	ICAM-1 ADAM-10	Endothelial cell binding, immune evasion Cytotoxicity, neutrophil killing, platelet activation, endothelial cell activation and VWF release
Beta toxin		Biofilm ligase, sphingomyelinase activity: cytotoxicity, platelet aggregation, endothelium disruption
Staphylococcal superantigen-like 5 (SSL5)	PSGL-1	Immune evasion, platelet activation

Tableau 1 : Adhésines de *S. aureus*

D'après Liesenborghs et al. (48)

a) ClfA et FnBP

Le ClfA se lie au fibrinogène par l'intermédiaire de la région C-terminale de la chaîne gamma du fibrinogène, comme c'est également le cas pour la FnBPA et la FnBPB. Il contient environ 500 résidus de domaine de liaison au fibrinogène à sa surface (39). Le fibrinogène lié à la bactérie régule alors l'activation plaquettaire de manière similaire aux autres surfaces recouvertes de fibrinogène.

Les interactions médiées par les FnBP impliquent principalement la fibronectine. La FnBPA peut ainsi interagir avec deux molécules de fibronectine sur chacun de ses domaines de liaison à la fibronectine, qui sont répétés en tandem et situés sur le domaine C-terminal de la molécule. Toutefois, elles peuvent également lier l'intégrine α IIb β 3 par l'intermédiaire du fibrinogène (49). En effet, les FnBPA et FnBPB possèdent un domaine A N-terminal ayant une similarité de séquence avec le ClfA, et qui interagit donc avec la même région du fibrinogène que le ClfA. La liaison avec la fibronectine réduit toutefois l'affinité de la FnBP pour le fibrinogène et c'est donc cette liaison qui prédomine de manière générale car la fibronectine est omniprésente dans le plasma et la matrice extracellulaire (50).

Ainsi, les MSCRAMMs liées au fibrinogène et à la fibronectine peuvent interagir avec l'intégrine α IIb β 3, ce qui génère un « outside » signal capable de déclencher l'activation plaquettaire.

L'agrégation plaquettaire induite par le ClfA et la FnBP via le fibrinogène et la fibronectine est une agrégation rapide, et peut alors expliquer l'importance de l'incidence de *S. aureus* dans l'EI et la puissance de cette bactérie à déclencher la formation d'agrégats en présence d'anticorps dirigés contre elle.

Des études d'interactions plaquettes-bactéries *in vivo* ont été menées pour appuyer ces constatations, notamment avec des modèles de souris infectées par *S. aureus*. Il a ainsi été mis en évidence que celles-ci développent effectivement des thrombus riches en plaquettes selon un processus dépendant du ClfA, car l'administration d'un domaine bloquant le site du fibrinogène du ClfA empêche la formation de ces thrombus (51). De plus, l'utilisation d'une souche de *Lactococcus lactis* par Que et al., normalement dépourvue de toute virulence, modifiée pour exprimer soit le ClfA soit la FnBPA a permis de montrer que l'expression de ces adhésines lui confère des capacités d'adhérence, et que les deux adhésines sont des facteurs de virulence critiques (52). La même équipe a ensuite distingué 4 ans plus tard les rôles respectifs du ClfA et de la FnBPA avec le même modèle expérimental. En effet, le ClfA apparaît nécessaire à la colonisation précoce des valves endommagées mais non suffisant à la persistance de l'infection, car la bactérie n'exprimant que cette adhésine est éradiquée en 48 heures. Au contraire, la FnBPA permet l'augmentation progressive des titres de la bactérie dans la végétation et dans la rate, ainsi que l'atteinte de l'endothélium adjacent, et favorise donc à la fois la colonisation et la persistance de l'infection (53).

Les résultats obtenus par Veloso et al. sont en accord avec ces précédentes observations et suggèrent que le fibrinogène est le médiateur principal de l'agrégation plaquettaire induite par *S. aureus*, et que la liaison de la fibronectine n'est pas nécessaire à l'infection de la valve mais elle contribue à la sévérité et à la progression de la maladie (54).

Ainsi, fibrinogène et fibronectine coopèrent pour la colonisation de la valve par *S. aureus* et l'invasion endothéliale *in vivo*.

L'utilisation de souches déficientes en Clf dans des modèles rats d'EI a également montré que ces mutants étaient au moins 100 fois moins efficaces que le type sauvage pour se lier au fibrinogène et étaient par conséquent moins adhérents aux caillots fibrino-plaquettaires (55).

Le taux de ClfA à la surface des bactéries est néanmoins un paramètre crucial pour que l'activation plaquettaire puisse se produire (40).

L'interaction de *S. aureus* lié au fibrinogène avec l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ nécessite également la présence d'anticorps spécifiques anti-ClfA, permettant de créer un pont entre le fibrinogène et l'intégrine, pour déclencher par la suite l'activation et l'agrégation plaquettaires (40).

Le ClfA est une molécule qui est exprimée par la bactérie principalement pendant la phase de croissance stationnaire et correspond ainsi au médiateur de l'agrégation plaquettaire principal à ce stade de croissance. Au contraire, en phase de croissance exponentielle l'agrégation plaquettaire rapide est plutôt médiée par les FnBPA et FnBPB. Ceci corrèle avec la régulation de l'expression des gènes qui codent pour ces protéines : *fnbpA* et *fnbpB*, qui sont uniquement transcrits lors de la phase de croissance exponentielle (56), tandis que *clfA* est transcrit très faiblement pendant la phase de croissance exponentielle, et est stimulé d'une façon sigB dépendante lors de la phase de croissance stationnaire (53).

De manière identique au ClfA, la présence d'anticorps spécifiques est nécessaire pour l'activation et l'agrégation plaquettaire médiée par les FnBP, ces dernières pouvant se lier au fibrinogène via leur domaine A ou à la fibronectine via leur domaine BCD et ainsi interagir avec l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$.

Enfin, la FnBPA semble induire la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales, telles que l'IL-6 et l'IL-1 β , et est donc un acteur majeur responsable à la fois de réponses pro-inflammatoires et pro-coagulantes de l'endothélium au cours des infections endovasculaires à *S. aureus* (53). Ces résultats supportent donc la possibilité qu'une réponse inflammatoire augmentée favorise le développement de l'EI.

b) ClfB

Le ClfB provoquerait également une agrégation plaquettaire selon un mécanisme dépendant du fibrinogène, mais les bactéries exprimant le ClfB agrègent les plaquettes avec un temps de latence plus long que celles exprimant le ClfA, la FnBPA ou encore la FnBPB (57).

Il est plus fortement exprimé par la bactérie dans la phase précoce de la croissance exponentielle (40). Contrairement au ClfA et aux FnBP, le ClfB se lie au fibrinogène par l'intermédiaire de sa chaîne alpha. À nouveau, un niveau minimum d'expression du ClfB par les bactéries est nécessaire pour pouvoir déclencher l'activation plaquettaire. Le mécanisme d'agrégation induit

par le ClfB semble donc très proche de celui induit par le ClfA et les FnBP mais la principale différence entre ces molécules réside dans le temps de latence. Miajlovic et al. expriment quelques hypothèses quant à ce phénomène : l'implication de la chaîne alpha du fibrinogène par le ClfB et non de la chaîne gamma, cette dernière pouvant potentiellement orienter le fibrinogène dans une conformation plus appropriée pour sa liaison à l'intégrine α IIb β 3 que lorsque la chaîne alpha est engagée ; une moins bonne affinité du ClfB pour lier le fibrinogène ; ou encore une sensibilité augmentée de la chaîne alpha au clivage par les protéases (57).

Le ClfB semble donc posséder une importance mineure dans la pathogénèse du sepsis et de l'EI par rapport aux MSCRAMMs citées précédemment (58).

c) Liaison directe à l'intégrine α IIb β 3

Certaines bactéries expriment des protéines qui peuvent également se lier directement à l'intégrine α IIb β 3 en l'absence d'une molécule de pontage : c'est ce qui se produit pour *S. aureus* par l'intermédiaire d'une de ses protéines liant l'hème, l'iron-regulate surface determinant B (IsdB) capable de supporter l'adhésion plaquettaire et induisant l'agrégation plaquettaire (59), mais aussi pour d'autres espèces telles que *Staphylococcus epidermidis* avec la SdrG (serine-aspartate repeat-containing protein G). Ainsi, l'IsdB se lie à l'intégrine α IIb β 3 plaquettaire avec une haute affinité et l'agrégation plaquettaire qui suit l'adhésion est dépendante de l'expression de l'IsdB.

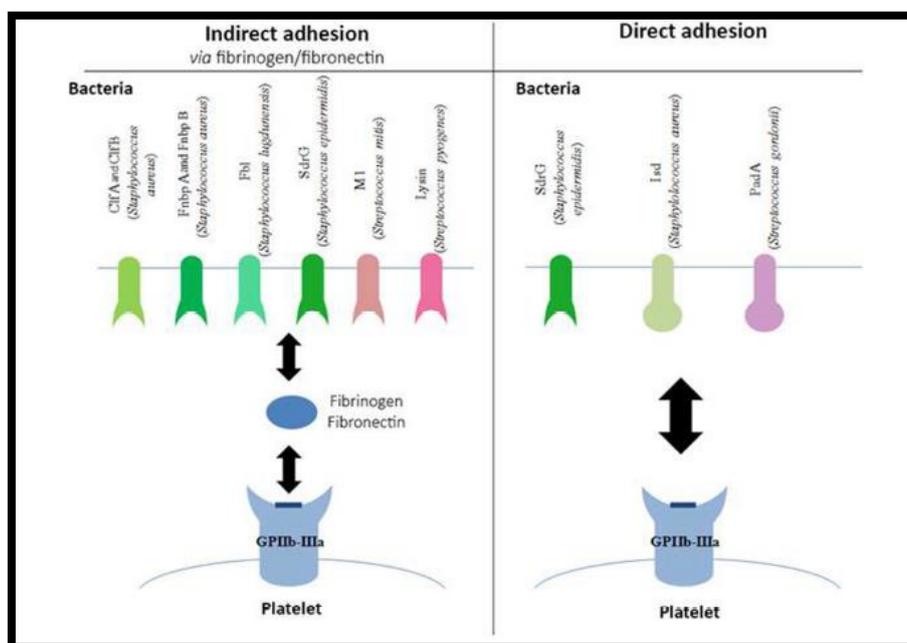


Figure 7 : Rôle de l'intégrine α IIb β 3 dans l'adhésion des bactéries aux plaquettes

D'après Hamzeh-Cognasse et al. (60)

2- Rôle de la GpIb α

La GpIb α est une glycoprotéine membre de la famille des protéines riches en répétition leucine, et elle est exclusivement exprimée sur les plaquettes et leurs précurseurs, les mégacaryocytes. Il s'agit d'une molécule capable de lier différents ligands, mais son rôle crucial prend principalement place dans l'hémostase primaire, par sa capacité à interagir avec le facteur Von Willebrand. La GpIb α fait en réalité partie intégrante d'un complexe : la GpIb-IX-V, selon un ratio de 2 :2 :2 :1 (61) et les plaquettes expriment environ 25 000 copies de GpIb α , qui médient la liaison des plaquettes au facteur Von Willebrand exposé en surface de différents supports, et supporte l'activation plaquettaire en condition de fortes forces de cisaillement dans la circulation sanguine (62).

S. aureus est alors capable de se lier à cette GpIb α via le facteur Von Willebrand, et au contraire du facteur Von Willebrand soluble ou immobilisé, cette bactérie est capable de provoquer l'agrégation plaquettaire en l'absence de forces de cisaillement. Cette interaction peut se faire par l'intermédiaire du ClfA et le rôle de la GpIb α dans l'agrégation plaquettaire induite par *S. aureus* est non négligeable car la délétion de cette protéine entraîne une inhibition complète de l'agrégation plaquettaire (63).

L'interaction des bactéries avec la GpIb α peut également se faire par l'intermédiaire de la protéine A de *S. aureus*, qui se lie au facteur Von Willebrand, celui-ci pouvant à son tour interagir avec la GpIb α (64).

3- Rôle du complément

Lorsque la bactérie pénètre dans le sang, elle déclenche fréquemment la génération des protéines du complément, et les bactéries alors recouvertes de complément sont capables d'induire une agrégation plaquettaire. Les plaquettes sont donc capables d'interagir avec le système du complément, particulièrement lorsqu'elles sont dans leur état activé, ou lorsqu'elles se trouvent dans un environnement pathologique. En effet, elles expriment le gC1qR qui est le récepteur de la protéine C1q du complément, qui peut alors servir de récepteur pour les bactéries qui sont recouvertes de complément. L'activation des plaquettes induit une expression significativement augmentée de gC1qR à leur surface, ainsi qu'une augmentation de l'expression du CD62P, ou P-sélectine, à la membrane, cette dernière ayant été montrée comme capable de lier le C3b, une autre molécule du complément (65). Les voies classique et alterne

sont les voies du complément communément impliquées dans les interactions avec les bactéries (66).

L'interaction des plaquettes avec le complément a été décrite comme bivalente. En effet, d'une part les plaquettes jouent un rôle dans la destruction des bactéries, par la stimulation de l'activité du complément, d'autre part, elles peuvent elles-mêmes devenir la cible de l'activité lytique du complément lorsqu'elles se lient aux protéines du complément. Cette dernière interaction a entre autre été décrite comme se produisant particulièrement dans les cas de purpura thrombopénique immunologique (67). Toutefois, les plaquettes possèdent à l'intérieur de leurs granules α un inhibiteur de la molécule du complément C1, qui permet la modulation de l'activation du complément lorsqu'elles sont activées.

Les interactions plaquettes-bactéries mettant en jeu le complément impliquent ainsi un mécanisme plus immunologique qu'hémostatique, soulignant une nouvelle fois la dualité de la fonction plaquettaire.

Le complément peut également lui-même activer les plaquettes à travers l'induction de facteurs pro-coagulants comme les facteurs du complexe prothrombinase à la surface des cellules (67).

Enfin, pour confirmer le rôle du complément dans l'agrégation plaquettaire induite par *S. aureus*, certaines études ont mis en évidence un apparent bénéfice du blocage du récepteur du complément gC1qR dans l'EI à *S. aureus* (68).

De plus, il apparaît que les ClfA et ClfB de *S. aureus* sont capables d'induire une agrégation plaquettaire de manière dépendante du complément et d'anticorps spécifiques, indépendamment de l'agrégation induite via le fibrinogène (57). L'agrégation générée est alors plus lente.

4- Rôle du Fc γ RIIa

Le fragment Fc des immunoglobulines exerce ses effets à travers une famille de récepteurs connus sous le nom de Récepteurs au fragment Fc. Ainsi, chaque type d'anticorps possède une sous-famille de récepteurs au fragment Fc, les IgG interagissant alors avec la sous-famille gamma (γ) des Fc récepteurs. Dans cette sous-famille, le Fc γ RIIa est le récepteur le plus répandu dans la nature. Il est exprimé de manière prédominante sur les polynucléaires neutrophiles (PNN), les monocytes, les macrophages et les plaquettes, qui sont des cellules connues pour

leur activité de phagocytose. Il possède un domaine transmembranaire unique, qui est un domaine C-terminal contenant le site de liaison à l'IgG, ainsi qu'un domaine cytoplasmique. Ce récepteur peut alors lier et internaliser les complexes immuns impliquant les IgG, qu'ils soient solubles ou cellulaires, et ce mécanisme est régulé par le fait que les IgG complexées ont une très forte affinité pour le Fc γ RIIa, tandis que cette affinité est très faible pour les IgG monomériques.

Du fait de son expression à la surface des plaquettes, le Fc γ RIIa joue également un rôle critique dans l'agrégation plaquettaire induite par les bactéries (69). Il n'agit donc pas seulement comme un simple récepteur aux immunoglobulines mais possède également un rôle important dans la fonction plaquettaire (70). En effet, les bactéries qui vont être reconnues par les IgG et être incluses dans un complexe immun avec ces immunoglobulines sont alors capables d'être reconnues par le Fc γ RIIa plaquettaire et le complexe immun peut ainsi être internalisé par les plaquettes (71). Les plaquettes expriment ainsi environ 5000 copies de Fc γ RIIa (63), et constituent finalement le plus grand réservoir de Fc γ RIIa dans l'organisme du fait de leur grand nombre dans la circulation sanguine.

De plus, il apparaît que la stimulation des autres récepteurs plaquettaires par les bactéries engage très fréquemment le Fc γ RIIa de manière simultanée, pour permettre une réponse plaquettaire efficace. Ceci souligne donc précisément le lien entre le Fc γ RIIa et les mécanismes d'agrégation plaquettaire. Ainsi, l'interaction de *S. aureus* lié au fibrinogène ou à la fibronectine avec l'intégrine α IIb β 3 plaquettaire induit également une agrégation plaquettaire de manière dépendante des anticorps.

En effet, l'agrégation médiée par le ClfA nécessite la liaison du fibrinogène mais aussi des anticorps spécifiques de *S. aureus* au ClfA, qui vont à leur tour se lier à l'intégrine α IIb β 3 et au Fc γ RIIa (40). Également, la protéine A de *S. aureus* peut être reconnue par des anticorps anti-*S. aureus* et les complexes immuns ainsi formés peuvent se lier au Fc γ RIIa plaquettaire, induisant la libération de sérotonine et une agrégation plaquettaire. Cette réaction est toutefois dépendante du moment où se produit la stimulation ainsi que de la quantité de complexes immuns formés (72). Une étude plus récente semble préciser que la protéine A ne serait en fait pas capable d'induire une agrégation par elle-même, mais elle est capable de maintenir une agrégation déclenchée par un autre mécanisme (39).

Le FcγRIIIa plaquettaire n'est finalement pas capable d'induire une agrégation plaquettaire via *S. aureus* à lui seul, mais il constitue un pont indispensable à des nombreuses interactions entre plaquettes et bactéries aboutissant à une agrégation plaquettaire, et a un rôle majeur dans l'optimisation de la fonctionnalité de l'intégrine αIIbβ3 (41).

De manière similaire à l'agrégation médiée par le complément, l'agrégation plaquettaire faisant intervenir les anticorps spécifiques est une agrégation lente.

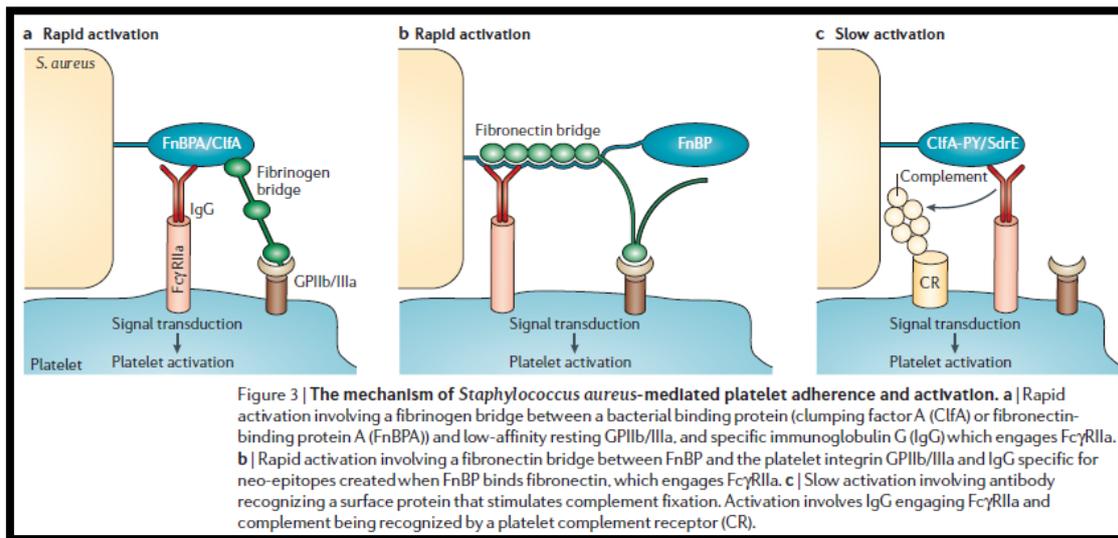


Figure 8 : Mécanismes d'adhérence et d'activation plaquettaires médiés par *S. aureus*

D'après Fitzgerald et al. (39)

5- Toxines

En complément de leur interaction avec les plaquettes à travers les protéines de surface, les bactéries peuvent sécréter des toxines capables d'activer les plaquettes (73,74).

Ainsi, *S. aureus* sécrète une toxine de 34 kDa capable de former des pores appelée l'alpha (α)-toxine, qui est produite par la quasi-totalité des souches de *S. aureus*. L'α-toxine se lie à la bicouche lipidique des plaquettes, créant un pore transmembranaire et par conséquent un influx calcique à l'intérieur des plaquettes (75), ce qui provoque à son tour une activation plaquettaire de manière analogue au ionophore calcique A23187 (76). Elle est également capable d'initier la formation du complexe prothrombinase sur les plaquettes (75), car elle induit la sécrétion des produits contenus dans les granules plaquettaires donc le facteur 4 plaquettaire (PF4) et d'autres médiateurs pro-coagulants (73). L'équipe de Powers et al. a également mis en évidence un rôle

de l' α -toxine dans la protéolyse de la GpVI induite par l'ADAM10, qui entraîne alors une réduction de la liaison des protéines au collagène et au fibrinogène, induisant en conséquence une altération de la réparation endothéliale par les plaquettes (77). En effet, l'interaction entre l' α -toxine et ADAM10 aboutit à l'activation d'ADAM10, ce qui entraîne un clivage pathologique des différents substrats d'ADAM10, notamment la E-cadhérine exprimée sur les cellules épithéliales, et la VE-cadhérine exprimée sur les cellules endothéliales. Le complexe α -toxine-ADAM10 participe donc à la lésion vasculaire à travers l'initiation de la lésion endothéliale, mais également la perturbation de la réparation endothéliale habituellement médiée par les plaquettes, et enfin l'activation synergique de voies pro-inflammatoires par infiltration des cellules du système immunitaire.

De plus, l' α -toxine est impliquée dans la pathogenèse d'autres infections telles que des pneumonies à SARM (*S. aureus* résistant à la méticilline), en favorisant la formation d'agrégats plaquettes-neutrophiles, provoquant une destruction tissulaire avec des hémorragies intra-alvéolaires et une nécrose extensive du poumon (78).

Enfin, l' α -toxine induit paradoxalement la production de protéines microbicides par les plaquettes et par conséquent la lyse des bactéries (79), et une expression augmentée d' α -toxine par *S. aureus* conduirait finalement à une virulence réduite de la bactérie (80).

S. aureus est également capable de produire une superfamille de toxines, connues comme les toxines superantigènes et superantigènes-like (SSL) (81), dont la SSL5 peut interagir directement avec la GpIba via ses résidus sialyl-lactosamines qui terminent les chaînes glycanes (82), et peut également se lier directement à la GpIV (63). Finalement, la liaison de SSL5 aux plaquettes déclenche l'activation et l'agrégation plaquettaire.

6- Autres protéines de *S. aureus*

D'autres adhésines mineures de *S. aureus* ont également été décrites. Ainsi, la protéine d'adhérence extracellulaire ou Eap est une adhésine de *S. aureus* qui est ancrée de manière non covalente à la surface cellulaire. Elle existe sous forme d'oligomère et est capable de se lier directement aux glycosaminoglycanes des plaquettes. La thiol-isomérase plaquettaire est alors stimulée, ce qui produit une activation plaquettaire allant de la stabilisation de la liaison au fibrinogène à l'expression membranaire de molécules d'activation plaquettaires telles que le CD62P, CD63 et CD40L. De plus, l'Eap est capable d'interagir avec la prothrombine, le

fibrinogène, la fibronectine, la thrombospondine-1, la sialoprotéine osseuse, ainsi que la vitronectine et l'ostéopontine. Elle a ainsi été décrite comme impliquée dans l'adhérence et l'invasion des cellules eucaryotes par *S. aureus*, et semble également jouer un rôle important dans la modulation de la réponse immune à l'infection par interférence avec le recrutement des PNN, mais aussi en inhibant la réponse d'hypersensibilité retardée et enfin en induisant la mort des cellules T.

L'Emp (extracellular matrix protein) fait également partie des adhésines de *S. aureus* mais son rôle exact dans les infections n'a pas encore été établi. Néanmoins, il a été montré qu'elle est capable de se lier à la fibronectine, au fibrinogène, au collagène et à la vitronectine.

Une autre adhésine de *S. aureus*, la SraP (serin-rich adhesin for platelets), est une protéine glycosylée de la paroi cellulaire qui peut médier la liaison directe de la bactérie aux plaquettes par une interaction de type ligand-récepteur (83). Cette liaison est rapide et saturable *in vitro*, et il semble que SraP pourrait lier un ou plusieurs récepteurs à la surface des plaquettes, mais son ligand plaquettaire spécifique n'a pas été identifié à l'heure actuelle. De plus, il s'agit d'une protéine homologue de la protéine GspB de *Streptococcus gordonii*, qui est une protéine de liaison à la GpIb. Toutefois, SraP ne semble pas se lier à la GpIb (83). Son expression apparaît également être un facteur de virulence dans les infections endovasculaires

Enfin, les protéines Sdr (SdrC, SdrD et SdrE) semblent capables d'induire une agrégation plaquettaire malgré l'absence d'interaction avec le fibrinogène et la fibronectine (72).

La protéine A de *S. aureus* est une protéine intracellulaire distribuée de manière ubiquitaire et qui est multifonctionnelle. Cette protéine n'est cependant exposée à la surface des bactéries que lorsque celles-ci sont activées. Elle représente alors une protéine de surface majeure et comprend 4 ou 5 domaines de répétition homologues de 56 à 61 résidus, suivis d'une région de répétition de polymorphisme variable X, ainsi qu'une région conservée Xc qui contient la séquence d'attachement à la paroi cellulaire (64).

Elle est ainsi capable d'interagir spécifiquement avec le gC1qR/p33 plaquettaire, ce qui suggère un mécanisme supplémentaire pour l'adhérence des bactéries sur les sites de lésion vasculaire et de thrombose (84). Elle est également capable de se lier par ses 5 domaines au domaine A1 du facteur Von Willebrand avec une forte affinité en conditions de fortes forces de cisaillement, et va servir de pont entre le facteur Von Willebrand et l'intégrine α IIb β 3.

La staphylothrombine fait donc partie intégrante des facteurs de virulence de *S. aureus*, et pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante.

Enfin, la staphylokinase est une petite molécule sécrétée par la plupart de souches de *S. aureus* qui est également capable d'induire la fibrinolyse. Elle possède une faible affinité pour le fibrinogène et elle ne peut pas être activée directement mais elle se lie aux petites traces de plasmine pour former des complexes staphylokinase-plasmine capable de cliver le plasminogène et de générer une quantité supplémentaire de plasmine (88). Une des particularités de cette molécule est qu'elle a une forte spécificité pour la plasmine humaine tandis qu'elle est inactive sur les autres espèces, contrairement aux coagulases. Du fait de son mode d'action, elle peut participer à la fragmentation suivie de l'embolisation des végétations riches en fibrine dans l'EI, et explique en partie la grande capacité des végétations de l'EI à *S. aureus* à emboliser.

7- Protéines régulatrices

L'expression des gènes de virulence du staphylocoque est contrôlée par un réseau régulateur complexe. La molécule agr (accessory gene regulator) fait ainsi partie des régulateurs globaux de l'expression des gènes de *S. aureus*. Il s'agit d'un régulateur agissant comme quorum sensing, formé d'un opéron de 4 gènes :

- agrB, qui est une protéase associée à la membrane,
- agrD, produisant le pré-pro-peptide modifié par agrB et sécrété comme un peptide thiolactone de 7 à 9 résidus d'acides aminés, dans lequel le résidu central cystéine est lié de manière covalente à l'acide carboxylique C-terminal formant ainsi un cycle thioester,
- agrC, constituant une « kinase sensor » associée à la membrane,
- agrA, qui est le régulateur cytoplasmique activé par agrC (89).

Le locus agr agit sur la transcription mais aussi sur la translation des gènes dans le but de réguler la production de nombreuses enzymes, toxines et protéines de la surface cellulaire. Il est finalement composé de 2 transcrits divergents RNAII et RNAIII, eux-mêmes initiés respectivement à partir des promoteurs P2 et P3.

De plus, le locus sar (staphylococcal accessory regulator) code pour une seule protéine de liaison à l'ADN qu'est sarA et est essentiel à la régulation agr-dépendante. Toutefois, 3

transcrits distincts (sarA, sarB et sarC) sont produits par 3 promoteurs distincts en amont de sarA, sarA et sarB, étant exprimés de manière préférentielle lors de la phase exponentielle de la croissance, tandis que l'expression maximale du transcrit sarC est retrouvée lors de la phase stationnaire. Il existe de nombreux homologues de sarA constituant la famille de protéines sarA, tous étant impliqués dans l'expression de sarA.

Ainsi, sarA régule l'expression du transcrit RNAIII en se liant au promoteur P2 d'agr, ce qui augmente en conséquence la transcription de RNAII et du RNAIII correspondant (90).

Sar et agr constituent donc un système régulateur global à deux composants majeur de *S. aureus*, impliqué dans la régulation des protéines Emp et Eap. Ces deux régulateurs organisent le métabolisme cellulaire de *S. aureus* lors de la phase exponentielle de sa croissance afin d'assurer un taux de croissance efficace, et favorisent l'expression des adhésines pendant cette même phase de croissance exponentielle, mais stimulent plutôt celles des facteurs solubles lors de la phase de croissance post-exponentielle *in vitro* (91).

Un autre système régulateur est sigmaB correspondant également à un opéron de 4 gènes : rsbU, rsbV, rsbW et sigB.

Enfin, le locus sae (*S. aureus* exoprotein expression) constitue également un important régulateur de l'expression des gènes de virulence. Il est composé de 4 ORFs, dont 2 codent pour un système classique à 2 composants. Sae est lui-même activé par agr mais le mécanisme est inconnu actuellement. Il est indispensable à la transcription des protéines Emp et Eap et capable de moduler leur expression en fonction des conditions environnementales : il s'agit donc d'un régulateur crucial pour l'adaptation de *S. aureus* à son environnement, contribuant à la survie intracellulaire de *S. aureus* (89).

8- Impact des contraintes de cisaillement

La fonction plaquettaire est sensible aux contraintes de cisaillement existant dans le flux sanguin. C'est le cas notamment de l'interaction entre le facteur Von Willebrand et la GpIb α qui ne peut se produire que sous de fortes conditions de cisaillement. Ceci complique donc les études sur l'agrégation plaquettaire et l'adhésion statique qui impliquent des systèmes artificiels qui ne reflètent donc pas réellement la nature dynamique du système circulatoire.

Dans le cas des interactions avec *S. aureus*, les études sur les conditions de cisaillement montrent que la formation du thrombus ne peut se produire que sous des conditions de fortes contraintes de cisaillement ($>800 \text{ s}^{-1}$) et que ceci est entièrement dépendant du ClfA (69). Comme l'agrégation plaquettaire, la formation du thrombus est dépendant de l'interaction anticorps-Fc γ RIIa et fibrinogène-intégrine α IIb β 3.

Les forces de cisaillement sont nécessaires pour la modification de la conformation du fibrinogène, et le rendre alors plus à même d'interagir avec l'intégrine α IIb β 3 et d'aboutir à la formation d'un thrombus.

9- Inhibition des plaquettes

Certaines protéines de *S. aureus* ont en revanche été montrées paradoxalement inhibitrices de la fonction hémostatique des plaquettes. C'est le cas de l'acide lipotechoïque, qui utilise le récepteur du facteur d'activation plaquettaire (PAF) pour augmenter les taux d'AMPc dans les plaquettes. L'activité de phosphorylation sur la protéine VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) est alors augmentée et va inhiber l'agrégation plaquettaire et la formation consécutive du thrombus (92). L'acide lipotechoïque inhibe également l'agrégation plaquettaire par prévention de la mobilisation du calcium intracellulaire (92).

La protéine de liaison du fibrinogène extracellulaire (Efb) semble également exercer un effet antithrombotique. Il s'agit d'une protéine produite pendant la phase de croissance post-exponentielle, décrite *in vitro* comme capable d'adhérer directement aux plaquettes et également capable de recruter le fibrinogène dans une forme non conventionnelle qui est plutôt amené à inhiber l'activation plaquettaire, et ceci a été confirmé *in vivo* (93). L'Efb augmente cependant la liaison du fibrinogène aux plaquettes d'une manière indépendante de l'intégrine α IIb β 3.

Enfin, la staphylokinase possède également une activité inhibitrice sur les plaquettes au travers de la dégradation de la plasmine et du fibrinogène, ce qui empêche l'agrégation plaquettaire.

3. Interactions Plaquettes - *S. sanguinis*

Les études sur les interactions entre plaquettes et *S. sanguinis* sont très anciennes mais finalement moins bien documentées que pour *S. aureus*. Les mêmes récepteurs plaquettaires ont cependant été rapportés comme impliqués dans ces interactions. De plus, plusieurs articles soulignent l'existence d'une importante variabilité dans la capacité des souches de *S. sanguinis* à induire une agrégation plaquettaire (94). Kerrigan et al. ont ainsi décrit 3 phénotypes de souches (95) :

- **Type I** : adhésion forte et agrégation rapide des plaquettes,
- **Type II** : temps de latence plus long pour l'activation plaquettaire, pas d'adhésion bactérienne des plaquettes au repos,
- **Type III** : pas d'adhésion ni agrégation plaquettaire.

Il existe également probablement un type IV, capable de supporter l'adhésion bactérienne mais pas l'agrégation plaquettaire qui en découle habituellement. Ceci suggère donc une distinction entre la capacité à supporter l'adhésion plaquettaire et à induire l'agrégation plaquettaire, d'autant que ces deux étapes sont probablement médiées par des protéines bactériennes et des récepteurs plaquettaires différents.

Herzberg et al. ont aussi mis en évidence, grâce à un modèle lapin d'EI expérimentale, une différence dans la capacité des différentes souches de *S. sanguinis* à induire une agrégation plaquettaire, et ont montré une virulence plus importante des souches capables d'induire une agrégation par rapport à celles qui ne le sont pas (96), malgré une densité bactérienne identique dans les végétations.

Enfin, les adhésines mais aussi les exopolysaccharides composant le glycocalyx de *S. sanguinis* contribuent à son infectivité.

1- Rôle de la GpIb α

Les interactions directes des streptocoques avec la GpIb α sont médiées par des serin-rich protein (Srp), et notamment la SrpA pour *S. sanguinis* (97). Elles correspondent à des protéines hautement glycosylées, riches en sérine qui se lient aux résidus acide sialique sur les récepteurs de l'hôte. L'interaction entre la SrpA et la GpIb α plaquettaire se produit au niveau du domaine N-terminal de la GpIb α et supporte l'adhésion plaquettaire qui sera suivie du déclenchement de l'agrégation plaquettaire (95,97). Elle est toutefois dépendante des forces de cisaillement : au

contraire de ce qui se produit pour le roulement des plaquettes sur le facteur Von Willebrand immobilisé nécessitant d'importantes forces de cisaillement, les plaquettes sont capables de rouler sur le streptocoque dans des conditions de faible cisaillement. En effet, la SrpA doit être présente sur la surface bactérienne dans une conformation adéquate pour son interaction avec la GpIb α et il apparaît que cette conformation ne peut être appropriée qu'en conditions de forces de cisaillement modérées. Cette interaction serait également dépendante de l'acide sialique (97).

Après stimulation par *S. sanguinis* via la GpIb α , il se produit l'induction d'une signalisation transmembranaire et les plaquettes libèrent le contenu de leurs granules denses, constitué par des substances vasoactives dont l'ATP et l'ADP (98). De plus, *S. sanguinis* exprime une ectoATPase capable d'hydrolyser l'ATP plaquettaire libérée en ADP. L'ADP, qui est un agoniste plaquettaire habituel, va alors se lier à ses récepteurs plaquettaires, P₂Y₁₂ et P₂Y₁, ce qui servira d'étape d'amplification, essentielle à la formation d'un agrégat stable (63).

De plus, le signal induit par *S. sanguinis* est cyclo-oxygénase (COX) et Thromboxane A2 (TXA2) dépendant (95) car l'utilisation d'aspirine pendant l'adhésion de *S. sanguinis* aux plaquettes inhibe totalement l'agrégation plaquettaire. Les plaquettes exposées à *S. sanguinis* produisent donc du TXA2, et le récepteur TP α peut alors amplifier l'activation plaquettaire en se liant au TXA2 nouvellement libéré.

C'est cette interaction directe entre la GpIb α et la bactérie qui se produit pour les souches dites de type I (95).

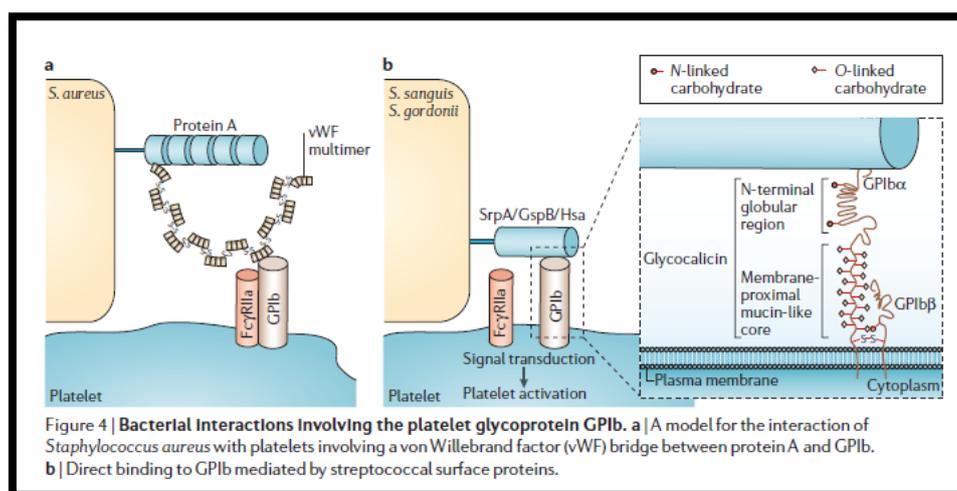


Figure 10 : Interactions bactériennes impliquant la GpIb plaquettaire

D'après Fitzgerald et al. (39)

2- Rôle du complément

Certaines souches de *S. sanguinis* sont également capables d'induire une agrégation plaquettaire selon un processus impliquant le complément, mais nécessitant la liaison d'un anticorps spécifique (99). Le gC1qR humain permet de lier des protéines au premier composant de la cascade du complément : le C1q, et va ainsi pouvoir servir de récepteur pour *S. sanguinis* recouvert de molécules du complément. L'agrégation plaquettaire médiée par le complément semble se faire principalement via la voie alterne et nécessite la présence d'IgG, qui fournirait un site de liaison au C3b (100).

Comme pour *S. aureus*, l'agrégation plaquettaire induite par *S. sanguinis* médiée par le complément est un processus lent.

3- Rôle du FcγRIIa

FcγRIIa joue un rôle critique dans l'agrégation plaquettaire induite par les bactéries dont *S. sanguinis*. En présence d'IgG, *S. sanguinis* va provoquer la tyrosine phosphorylation très rapide du FcγRIIa plaquettaire, suivie de la phosphorylation de la PLCγ2, de Syk et LAT (101). Ces événements précoces sont dépendants de protéines kinases de la famille Src mais indépendants du thromboxane A2 ou de l'engagement de l'intégrine αIIbβ3. Pendant la phase de latence qui précède l'agrégation plaquettaire, une déphosphorylation de FcγRIIa, PLCγ2, de Syk et LAT se produit. Cette voie de signalisation est régulée par la SHP-I qui est liée à PECAM-I, récepteur contenant un motif ITIM, car cette protéine tyrosine phosphatase est ainsi phosphorylée lors de la phase de latence, et PECAM-I co-précipite avec elle (101).

L'engagement secondaire de l'intégrine αIIbβ3 va provoquer la déphosphorylation de SHP-I, permettant alors à son tour une seconde vague de phosphorylation de FcγRIIa, PLCγ2, de Syk et LAT.

Les plaquettes sont alors capables de libérer le thromboxane A2 et le contenu de leurs granules denses dont RANTES, PF4, CD40L soluble et PDGF-αβ, qui vont amplifier et stabiliser l'agrégat plaquettaire (101,102). Le PF4 peut se lier aux bactéries et former un nouveau site de reconnaissance pour les IgG et les cellules immunes effectrices, ce qui peut permettre de réduire le temps de latence, mais ceci est particulièrement vrai pour les bactéries gram négatif (103).

De plus, Sullam et al. ont mis en évidence la colocalisation de la GpIb α et du Fc γ RIIa au niveau de la membrane plaquettaire, et que cette association n'est pas aléatoire (104). Ceci permet d'obtenir une signalisation médiée par Fc γ RIIa et la GpIb α qui est indépendante des IgG (104).

4- Rôle des MAP kinases

L'activation plaquettaire par *S. sanguinis* diffère tout de même sur certains points de celle induite par *S. aureus*. En effet, contrairement à *S. aureus*, *S. sanguinis* peut également impliquer la voie des MAP kinases. L'épinéphrine libérée à la suite du stress va agir via la protéine Gz pour upréguler la voie impliquant la PLC γ 2, PI3k et Erk. Les MAP kinases Erk2 et p38 subissent des étapes triphasiques de phosphorylation/déphosphorylation comme cela peut se produire avec d'autres phosphoprotéines, et ceci aboutit à une augmentation de l'agrégation plaquettaire induite par *S. sanguinis* (105,106).

5- Rôle de la PAAP

De manière distincte de ce qui se produit avec *S. aureus*, *S. sanguinis* est capable d'induire une agrégation plaquettaire directe par l'intermédiaire d'un composant collagène-like spécifique du streptocoque : la PAAP (platelet aggregation associated protein). Il s'agit d'une protéine de 115 kDa, exprimée sur les parois cellulaires du streptocoque, riche en rhamnose qui contient un domaine collagène-like d'interaction avec les plaquettes comprenant des résidus Pro-Gly-Glu-Gln-Gly-Pro-Lys (107,108). La PAAP est impliquée dans la CbpA (Collagen-binding protein A) qui contient 2 séquences PAAP collagen-like octapeptide (109).

Sur les valves cardiaques lésées, la PAAP augmente l'accumulation des plaquettes dans le thrombus de fibrine et va permettre la colonisation par la bactérie (110). Elle correspond donc à un facteur de virulence important de *S. sanguinis* car son absence ou blocage d'expression entraîne une inhibition de l'agrégation plaquettaire *in vitro* (109), et une réduction de la taille des végétations dans les modèles d'EI expérimentales (110).

Cependant, plusieurs études ont mis en évidence que cette agrégation induite par PAAP est donneur-spécifique, et que son expression est restreinte à certaines souches de *S. sanguinis* et est absente des autres espèces de streptocoques (109).

6- Libération de médiateurs solubles et autres facteurs de virulence

a) Médiateurs solubles

En dehors de ses interactions directes avec les plaquettes provoquant une réponse plutôt pro-thrombotique, *S. sanguinis* induit également une réponse pro-inflammatoire et immunomodulatrice des plaquettes (105). En effet, les plaquettes sont capables de libérer de nombreux modulateurs immuns et inflammatoires en réponse à une infection par *S. sanguinis*, parmi lesquels on retrouve des facteurs de croissance, chémokines et cytokines, certains existant à l'état préformé dans les mégacaryocytes et d'autres étant synthétisés de novo (111). Cette libération de médiateurs de l'inflammation à partir des plaquettes se produit toutefois de façon souche et donneur-spécifique (105), et constitue un phénomène indépendant de l'agrégation plaquettaire, suggérant un mécanisme pro-athérogène potentiel en l'absence d'une réponse plaquettaire pro-thrombotique aiguë.

À noter qu'il existe un effet inhibiteur paradoxal de l'épinéphrine sur la libération des médiateurs solubles par les plaquettes stimulées, aussi bien avec les souches de *S. sanguinis* induisant une agrégation qu'avec celles qui ne l'induisent pas. Ceci met en évidence une dissociation entre l'exocytose et l'agrégation qui sont provoquées en réponse à la bactérie (105).

Enfin, lors de la bactériémie transitoire, *S. sanguinis* est également capable d'activer les monocytes et d'induire leur production de FT et de cytokines, ce qui déclenche la cascade de la coagulation. La libération de cytokine peut également découler de l'effet de l'ATP extracellulaire libérée des plaquettes sur les monocytes.

b) Facteurs de virulence

L'analyse du génome de *S. sanguinis* par Fan et al. a permis de distinguer la présence d'une ecto-5' nucléotidase de surface cellulaire (Nt5e), capable d'hydrolyser l'ATP extracellulaire libérée notamment depuis les granules denses des plaquettes pour générer de l'adénosine. Cette dernière est une molécule immunosuppressive pouvant inhiber la phagocytose par les macrophages/monocytes associés aux végétations valvulaires (112). Elle inhibe également la production d'IL-12 et augmente celle de l'IL-10 (113). L'utilisation d'un modèle lapin d'EI expérimental a alors mis en évidence des végétations ayant une masse significativement diminuée lorsqu'ils sont infectés avec des souches délétées en Nt5e.

4. Rôle des plaquettes

1- Généralités sur les plaquettes

Les plaquettes régulent l'hémostase et l'inflammation, et ont un rôle dans l'immunité. Ce sont des éléments anucléés de petite taille (2-4 μm) discoïdes qui proviennent de la lignée des mégacaryocytes. Leur durée de vie dans la circulation sanguine périphérique est de 5 à 10 jours et ces cellules anucléées peuvent effectuer la translation des protéines en utilisant des modèles d'ARNm stable provenant de leurs précurseurs mégacaryocytaires.

Les plaquettes possèdent 3 types distincts de granules cytoplasmiques :

- **Les granules denses**, riches en médiateurs du tonus vasculaire = sérotonine, ADP, calcium et phosphate ;
- **Les granules α** , contenant des protéines spécialisées dans les fonctions hémostatiques dont l'adhésion (fibrinogène, thrombospondine, vitronectine, laminine et facteur Von Willebrand), la coagulation (plasminogène et α 2-plasmine inhibiteur), et la réparation des cellules endothéliales (PDGF (platelet derived growth factor), facteur de perméabilité et TGF- α (transforming growth factor) et TGF- β). Ces granules peuvent également contenir des protéines microbicides ;
- **Les granules lysosomales**, contenant des enzymes qui modulent la dissolution du thrombus.

Lorsque les plaquettes sont activées, elles voient leur statut métabolique s'activer, ainsi que leur forme discoïde devenir amiboïde et vont exprimer des récepteurs permettant de médier une adhésion augmentée aux tissus lésés ou infectés, et produire des espèces réactives de l'oxygène incluant radicaux superoxyde, peroxyde et hydroxyles. Enfin, leurs pseudopodes vont s'étendre pour interagir avec les pathogènes microbiens ainsi qu'avec les autres cellules de l'hôte et les plaquettes vont remodeler leur cytosquelette pour faciliter la mobilisation des granules ainsi que la libération de leur contenu. Les plaquettes jouent donc un rôle important dans la défense de l'hôte contre les infections endovasculaires, et leurs effets peuvent être amplifiés par la présence concomitante d'antibiotiques (114).

Il existe également une capacité des bactéries à générer des signaux intracellulaires sur la liaison des plaquettes mais nous disposons de peu de données jusqu'à présent car ces interactions sont complexes et de nature multi-composants. Concernant les signaux induits par *S. aureus*, les

publications actuelles laissent savoir qu'il s'agit de mécanismes cyclooxygénase et thromboxane dépendants (72).

2- Toll Like Receptors

Les Toll like receptors (TLR) sont des récepteurs de l'immunité innée qui régulent la réponse de l'hôte à une infection. Ils reconnaissent les PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) présents sur différentes classes d'agents infectieux (115). En tant que médiateurs de l'immunité, les plaquettes expriment fortement à leur surface les TLR2, TLR4 et TLR9, et n'ont qu'une très faible expression des TLR1, TLR6 et TLR8 (116).

Le ligand du TLR4 est ainsi le LPS (lipopolysaccharide) des bactéries gram négatives, qui seraient également capables de déclencher une agrégation plaquettaire d'après certaines études (117,118), mais pas pour d'autres (119), et seraient même au contraire responsables d'une inhibition des plaquettes pour certaines équipes (120).

L'acide lipoteichoïque est quant à lui un ligand du TLR2, avec des effets variables sur l'agrégation plaquettaire car il peut inhiber l'agrégation plaquettaire comme c'est le cas lorsqu'il dérive de *S. aureus* (121), cependant il supporte l'adhésion plaquettaire de *Staphylococcus epidermidis*.

Généralement, la stimulation des TLR induit la sécrétion de molécules immunomodulatrices et l'activation d'autres cellules telles que les PNN et les cellules endothéliales, plutôt que la formation d'un thrombus, ce qui signifie que les plaquettes agissent en ce sens plutôt comme des acteurs du système immunitaire inné que comme des acteurs de l'hémostase primaire car elles sont capables de détecter la présence des agents infectieux et de coordonner la réponse au pathogène.

3- Phagocytose

La présence du FcγRIIa à la surface des plaquettes laisse entendre que ces dernières ont une capacité de phagocytose. En effet, elles peuvent phagocyter les complexes immuns via le FcγRIIa, mais elles peuvent elles-mêmes être phagocytées (122).

De plus, elles ont la possibilité d'augmenter la phagocytose des pathogènes par les PNN (123) mais peuvent également phagocyter directement certaines bactéries comme *S. aureus* (124). Toutefois, cette phagocytose résulte rarement de la mort de la bactérie car les plaquettes ne possèdent pas de phagolysosomes, et elle peut alors avoir l'effet inverse de l'effet escompté puisqu'elle induit la formation d'un pool de bactéries viables présentes en intracellulaire, ainsi que dans le thrombus, où elles sont alors protégées de l'effet du système immunitaire. Ceci peut jouer un rôle dans la pathogénèse de certaines maladies telles que l'EI puisque cela permet notamment la persistance de la maladie (125–127).

4- Plaquettes et PNN

Les plaquettes possèdent également un rôle essentiel dans la formation des NETs (neutrophil extracellular traps) par les PNN, qui permettent la clairance des bactéries piégées et la concentration des facteurs antibactériens, mais possèdent également des effets délétères car ils peuvent augmenter le risque de thrombose (128). De plus, plaquettes et PNN sont connus pour adhérer les uns aux autres et former des complexes plaquettes-PNN (PNC). La formation de ces PNC est régulée par la P-sélectine plaquettaire et le complexe Mac-1 des PNN, et tient une place importante dans le développement des défaillances multiviscérales.

5- Libération de molécules microbicides

Kraemer et al. ont montré que les plaquettes incubées avec *S. aureus* limitent la croissance de la bactérie (129). Cette observation a permis de mettre en évidence l'existence de molécules plaquettaires antibactériennes : les PMP (platelets microbicidal proteins), qui sont libérées sous l'effet de la thrombine (tPMP) et/ou des bactéries. Elles diffèrent des défensines classiquement décrites par leur masse moléculaire, leur séquence, et l'enchaînement de résidus lysine et arginine qui leur donne leur charge cationique. Ce sont donc des petits peptides cationiques à activité microbicide rapide et puissante contre les pathogènes retrouvés dans les bactériémies tels que *S. aureus* ou les streptocoques du groupe viridans (130).

Pour être fonctionnelles, ces molécules doivent être clivées par la thrombine, libérant deux sous-unités qui vont agir indépendamment mais de manière néanmoins complémentaire en altérant la perméabilité de la paroi bactérienne (79).

La libération des PMP se fait à travers des voies de signalisation plaquettaire qui dépendent de l'ATP/ADP et de leurs récepteurs P₂Y. Ce signal est alors lui-même amplifié par la libération d'ADP, et une activation autocrine des plaquettes se produit, qui va ensuite pouvoir s'étendre aux plaquettes voisines. De plus, les plaquettes activées par l'inflammation vont recruter des plaquettes supplémentaires à travers la signalisation des récepteurs PAR-1 et PAR-4 (protease-activated receptor) médiée par la thrombine, ainsi que par l'activation de l'intégrine α IIb β 3 et la libération de facteur Von Willebrand par les cellules endothéliales activées.

Parmi les tPMP libérées des plaquettes sont retrouvées les chimiokines classiques qui ont un effet bactéricide direct : les kinocidines. Elles sont alors divisées en 2 groupes : les α -kinocidines, incluant les cytokines CXC (PF4, PBP (platelet basic proteins), connective tissue activating peptide (CTAP-3) et neutrophil activating peptide (NAP2)), et les β -kinocidines qui sont des cytokines de type CC, dont fait partie RANTES. Font partie également des kinocidines le fibrinopeptide B et la thymosine β 4.

Ces molécules ont un effet synergique entre elles, leur rôle primaire étant la chimio-attraction des leucocytes, permettant la coopération entre facteurs plaquettaires et leucocytaires dans la clairance bactérienne (131).

Les β -défensines humaines 1 (h β D-1) sont également présentes dans les mégacaryocytes et les plaquettes, au niveau de l'ARNm et des peptides (129).

Les tPMP exercent de manière directe les effets anti-staphylocoques précoces des plaquettes dans la défense contre l'EI. Toutefois, les PMP ne sont pas toutes identiques entre elles, et possèdent notamment des différences sur leurs propriétés biochimiques et leur activité microbienne puisqu'elles peuvent exercer une activité seulement microbistatique, ou plutôt microbicide, et ceci est influencé par leur concentration et le pH du milieu dans lequel elles se trouvent (132).

Toutes les souches de *S. aureus* ne sont pas sensibles de la même manière aux tPMP et il apparaît que les souches résistantes aux tPMP *in vitro* sont plus virulentes dans les modèles d'EI expérimentales que les souches sensibles (133,134). Kupferwasser et al. ont en effet montré sur des modèles lapins d'EI expérimentales des bactériémies plus faibles, une réduction de la croissance et de la taille des végétations et de leur densité bactérienne, l'apparition plus tardive de régurgitation valvulaire aortique, ainsi qu'une réduction des dommages des tissus valvulaires et de l'inflammation péri-valvulaire, et une réduction de la fréquence des

évènements emboliques extracardiaques avec les souches sensibles aux tPMP par rapport aux souches résistantes (135).

Enfin, Yeaman et al. ont observé que les souches issues d'EI sont plus fréquemment résistantes aux PMP que les souches qui sont issues d'autres infections (134), ce qui laisse penser que cette résistance fournit un avantage sélectif de survie au pathogène *in vivo* impliqué dans la pathogénèse de l'EI.

Également, la présence d'une thrombopénie a été montrée comme facteur aggravant dans les EI à streptocoques sur des modèles lapin ou rat (136). Les PMP ont donc un rôle majeur dans la limitation de l'induction et de la progression des infections endovasculaires, avec des conséquences sur de nombreux paramètres associés à la sévérité et au pronostic de l'EI.

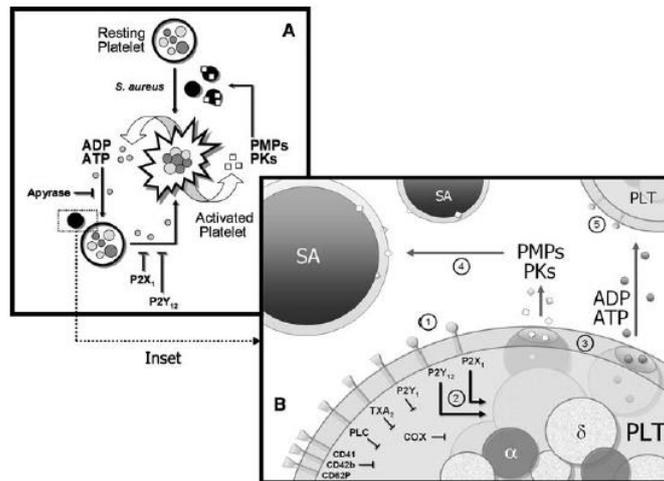


Figure 11 : Interactions des plaquettes avec *S. aureus*

D'après Yeaman et al. (79)

5. Conclusion

S. aureus et *S. sanguinis* sont deux pathogènes majeurs responsables d'EI et des évènements emboliques qui y sont associés. Nous avons mis en évidence de nombreuses interactions de ces bactéries avec les plaquettes à travers différents mécanismes impliquant les récepteurs plaquettaire. Des mécanismes communs sont retrouvés pour les deux germes mais il apparaît également que chacun a des spécificités, pouvant expliquer quelques différences dans leur pathogénicité et les complications qu'ils induisent.

L'agrégation plaquettaire induite par *S. aureus* semble dépendante, au moins en partie, des voies de la COX et du TXA2 (72), et le rôle central de l'intégrine α IIb β 3 dans l'interaction avec les

adhésines de cette bactérie n'est pas retrouvé aussi marqué pour *S. sanguinis*, bien que la présence de cette intégrine soit nécessaire pour les interactions impliquant notamment le FcγRIIIa. Enfin, il semblerait que le polymorphisme des patients sur les récepteurs plaquettaires influe sur le potentiel pro-agrégant de ces bactéries.

D'autre part, les plaquettes en elles-mêmes jouent également un rôle central dans la lutte contre l'infection à travers la libération de petites molécules microbicides au niveau du site de l'infection induite notamment par la thrombine, les tPMP.

Finalement, le rôle des plaquettes en situation d'infection laisse donc place à des effets à la fois bénéfiques et délétères sur le contrôle de cette infection qui donne naissance au « paradoxe plaquettaire ». Dans l'EI, notamment lorsqu'elle est provoquée par *S. aureus*, il existe un équilibre entre les effets pro-agrégants plaquettaires induits, entretenant le développement de la végétation, et les effets antibactériens associés aux interactions plaquettes-PNN et à l'activation du complément. Il semblerait alors que l'utilisation d'antiplaquettaires dans le contexte d'une EI serait inutile voire délétère car elle diminuerait les fonctions antibactériennes des plaquettes. Cependant, il semble que limiter l'adhésion et l'agrégation plaquettaires est indispensable pour diminuer le risque embolique associé à l'EI puisque les plaquettes font partie intégrante de la végétation. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier l'impact des antiplaquettaires sur les interactions plaquettes-bactéries.

Platelet receptor	Bacteria	Bacterial protein	Bridging protein
GPIIb-IIIa	<i>S. epidermidis</i>	SdrG	Fibrinogen
	<i>S. aureus</i>	FnbpA/B	Fibronectin
	<i>S. aureus</i>	FnbpA/B	Fibrinogen
	<i>S. aureus</i>	ClfA	Fibronectin
	<i>S. aureus</i>	ClfA	Fibrinogen
	<i>S. aureus</i>	IsdB	Direct
	<i>S. pyogenes</i>	M1	Fibrinogen
	<i>S. gordonii</i>	PadA	Direct
	<i>S. lugdunensis</i>	Fbl	Fibrinogen
	GPIIb	<i>S. sanguis</i>	SrpA
<i>S. gordonii</i>		GspB/Hsa	Direct
<i>S. aureus</i>		Protein A	VWF
<i>Helicobacter pylori</i>		?	VWF
FcγRIIIa	<i>S. aureus</i>	FnbpA/B	IgG
	<i>S. aureus</i>	ClfA	IgG
TLR2	<i>S. pneumoniae</i>	?	Direct
TLR4	?	Lipoprotein	Direct
	<i>Escherichia coli</i>	LPS	Direct
gC1q-R	<i>S. sanguinis</i>	?	C1

ClfA, clumping factor A; Fnbp, fibronectin-binding protein; GspB, glycosylated streptococcal protein B; Hsa, hemagglutinin salivary antigen; IsdB, iron-regulated surface determinant B; LPS, lipopolysaccharide; PadA, platelet adhesion binding protein A; SdrG, serine-aspartate repeat G; SrpA, serine-rich protein A; TLR, Toll-like receptor; VWF, von Willebrand factor.

Platelet receptor	Bacteria	Bacterial toxin
PAR1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Gingipains
GPIIb	<i>S. aureus</i>	SSL-5
GPVI	<i>S. aureus</i>	SSL-5
Phospholipids	<i>S. pneumoniae</i>	Pneumolysin
	<i>S. aureus</i>	α-Toxin
	<i>S. aureus</i>	Leukocidin
	<i>S. pyogenes</i>	Streptolysin-O

GP, glycoprotein; PAR1, protease-activated receptor 1; SSL, staphylococcal superantigen-like.

Tableau 2 : Interactions ligands-récepteurs D'après Cox et al. (63)