

## EFFET DES GLYCOSYL-DIPHOSPHONUCLÉOSIDES SUR L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE\*

M MESTER, J GOROG ET L MESTER

*Institut de Chimie des Substances Naturelles, Centre National de la Recherche Scientifique, 91-Gif-sur-Yvette (France)*

(Reçu le 17 janvier 1972, accepté après modification le 8 mai 1972)

### ABSTRACT

The effect of the nucleoside 5'-(glycosyl pyrophosphates) on the aggregation of human blood platelets has been studied *in vitro*. Devoid of any aggregating effect, ADP-ribose was shown to act as a moderate inhibitor on the ADP-induced aggregation. After a preincubation without stirring, the inhibitory effect of ADP-ribose increased and total inhibition was reached after 20 min. On the contrary, ADP-mannose caused platelet aggregation in citrated plasma. During the course of a 20-min incubation, ADP-mannose progressively lost the aggregating effect and showed total inhibition. At first, ADP-glucose showed a slight aggregating effect, but after a 20-min incubation it also became inhibitory. The UDP- and GDP-sugars have no effect on aggregation, and thus may be used in the study of glycoprotein biosynthesis by platelets.

### SOMMAIRE

L'effet des glycosyl-diphosphonucléosides sur l'agrégation des plaquettes humaines a été étudié *in vitro*. Sans effet agrégant, l'ADP-ribose s'est révélé modérément inhibiteur dans l'agrégation déclenchée par l'ADP. Après une préincubation sans agitation, l'action inhibitrice de l'ADP-ribose s'accroît, pour atteindre une inhibition totale après 20 min. Au contraire, l'ADP-mannose provoque l'agrégation des plaquettes dans le plasma citraté. Au cours d'une incubation de 20 min, l'ADP-mannose perd progressivement son activité agrégante et montre une inhibition totale. Au départ l'ADP-glucose donne une faible vague d'agrégation, mais après une incubation de 20 min il devient également inhibiteur. Les esters glycosyliques de l'UDP et du GDP sont sans effet sur l'agrégation. Ils peuvent donc être utilisés dans l'étude de la synthèse des glycoprotéines par les plaquettes.

### INTRODUCTION

Nous avons rapporté récemment<sup>1, 2</sup> l'incorporation par les plaquettes de l'acide sialique à partir de l'acide cytidine monophosphate *N*-acétylneuraminique (CMP-NANA) marqué au <sup>14</sup>C. L'enrichissement des plaquettes en acide sialique

\*Dédié au Professeur Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65ème anniversaire

provoque une nette augmentation de l'agrégation<sup>2</sup> sous l'effet de la sérotonine [3-(2-aminoéthyl)-5-hydroxyindole], car l'acide sialique fait partie du complexe récepteur de sérotonine de la membrane<sup>3</sup>. Au contraire, les plaquettes riches en acide sialique montrent une agrégation diminuée sous l'action de l'ADP<sup>2</sup>. L'incorporation d'autres sucres dans les plaquettes nous a paru d'un intérêt particulier pour l'étude du mécanisme de l'agrégation plaquettaire<sup>4</sup>. Pour cela il était nécessaire de nous assurer que les glycosyl-diphosphonucléosides utilisés n'intervenaient pas directement dans l'agrégation. Les esters adénosine 5'-( $\alpha$ -D-glucopyranosyle pyrophosphate) (ADP-glucose) et adénosine 5'-( $\alpha$ -D-mannopyranosyle pyrophosphate) (ADP-mannose) sont particulièrement intéressants en biosynthèse, car ils sont plus actifs que leurs analogues ayant pour base l'uracyle (UDP-glucose et UDP-mannose)<sup>5, 6</sup>.

D'autre part nous avons envisagé l'étude dans l'agrégation du P<sup>1</sup>-5-adénosine P<sup>2</sup>-5-D-ribose pyrophosphate (ADP-ribose) et ceci pour les raisons suivantes (a) Ce produit, ayant pour base l'adénine, contient une deuxième molécule de D-ribose en position terminale, lié en C-5 au groupe diphosphate (b) Par dégradation enzymatique ou hydrolyse, ce produit pourrait fournir de l'ADP ou de l'adénosine et montrer éventuellement dans les conditions physiologiques un effet prolongé dans l'induction ou l'inhibition de l'agrégation (c) La présence de l'ADP-ribose dans les tissus<sup>7-10</sup> sous forme de polymère est de plus en plus souvent évoquée. Par sa dégradation enzymatique<sup>9</sup>, l'ADP-ribose ou son isomère pourrait être libéré.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Plasma riche en plaquettes* — Celui-ci est préparé à partir du sang humain frais mélangé à une solution 0,128M (3,8 %) de citrate trisodique dans une proportion de 9.1, v/v. Après centrifugation à 135 g pendant 10 min à la température ambiante on obtient un plasma contenant en moyenne  $350 \times 10^6$  plaquettes/ml.

*Mesure de l'agrégation directe* — Le plasma riche en plaquettes (0,30 ml) est mélangé avec 0,09 ml de tampon Michaelis (pH 7,3)<sup>11, 12</sup> et agité à 37° pendant 2 min. On ajoute à ce moment l'agent agrégant dans 0,01 ml de tampon soit l'ADP à une concentration 0,1mM pour obtenir une concentration 10  $\mu$ M finale, soit les produits à essayer à une concentration 10 fois plus élevée. On mesure avec un agrégomètre Bryston (Hamilton, Canada) équipé d'un enregistreur « Vitatron » modèle UR 404 les changements dans la transmission de la lumière au cours de l'agrégation à 37° et avec une vitesse de l'enregistreur de 4 cm/min.

*Mesure de l'inhibition de l'agrégation — Sans incubation* Le plasma riche en plaquettes (0,3 ml) est mélangé avec 0,08 ml de tampon Michaelis et 0,01 ml de solution 4mM de l'inhibiteur dans le tampon de Michaelis (pH 7,3), pour obtenir une concentration finale 0,1mM. Après 2 min d'agitation à 37°, on ajoute 0,01 ml de solution d'ADP 0,4mM, pour obtenir une concentration finale 10  $\mu$ M. L'agrégation est enregistrée dans les conditions précisées dans le paragraphe précédent.

*Avec incubation* Le mélange est préparé selon le paragraphe précédent, mais, avant agitation, la solution est gardée à 37° sans agitation pendant 3, 10 et 20 min,

ou pendant plusieurs heures. Après 2 min d'agitation, l'agrégation est enregistrée dans les mêmes conditions.

*Réactifs* — L'adénosine provient de Nutritional Biochemicals Co (Cleveland, Ohio), les nucléoside-diphosphates de Sigma Chemical Co (St Louis, Missouri)

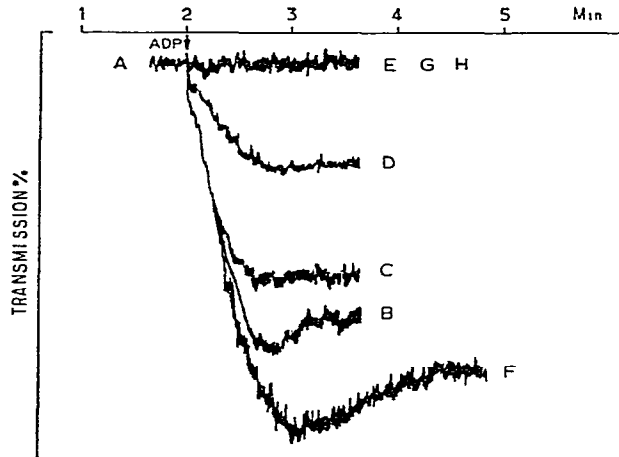


Fig 1 Effet de l'ADP-ribose 0,1mm sur l'agrégation du plasma humain riche en plaquettes. A ADP-ribose seul et sans incubation, B ADP-ribose sans incubation et avec ADP  $10\mu\text{M}$ , C ADP-ribose 3 min d'incubation plus ADP  $10\mu\text{M}$ , D ADP-ribose 10 min d'incubation plus ADP  $10\mu\text{M}$ , E ADP-ribose 20 min d'incubation plus ADP  $10\mu\text{M}$ , F ADP seul, G Adénosine 0,1mm 3 min d'incubation plus ADP  $10\mu\text{M}$ , H ADP-ribose 3 min d'incubation plus adénosine 0,1mm et ADP  $10\mu\text{M}$ .

## RÉSULTATS

Dans les expériences où l'ADP-ribose, l'ADP-glucose et l'ADP-mannose ont été essayés seuls et sans préincubation, à une concentration finale 0,1mm, comme agents agrégants, l'ADP-ribose a été sans effet (Fig 1, A), l'ADP-glucose très faiblement agrégant (Fig 2, A), tandis que l'ADP-mannose a provoqué une agrégation considérable (Fig 3, A) correspondant à celle provoquée par l'ADP à une concentration finale 0,01mm.

En ajoutant à chaque solution après agitation, ou après incubation et agitation, de l'ADP à une concentration finale  $10\mu\text{M}$ , l'ADP-ribose s'est révélé un agent modérément inhibiteur (diminution de 15 à 25%) (Fig 1, B), l'ADP-glucose sans effet (Fig 2, B), tandis que l'ADP-mannose a montré une augmentation de l'agrégation avec l'ADP, correspondant approximativement à celle de l'ADP à une concentration finale  $20\mu\text{M}$  (Fig 3, B). Au cours de la même expérience, mais avec une préincubation de 3 ou 10 min sans agitation à  $37^\circ$ , l'inhibition par l'ADP-ribose s'accroît (Fig 1, C et D), pour atteindre l'inhibition totale après 20 min (Fig 1, E). Après 3, 10 ou 20 min d'incubation, l'ADP-glucose montre toujours une faible vague d'agrégation, mais l'agrégation par l'ADP est progressivement inhibée (Fig 2, C, D et E). Dans

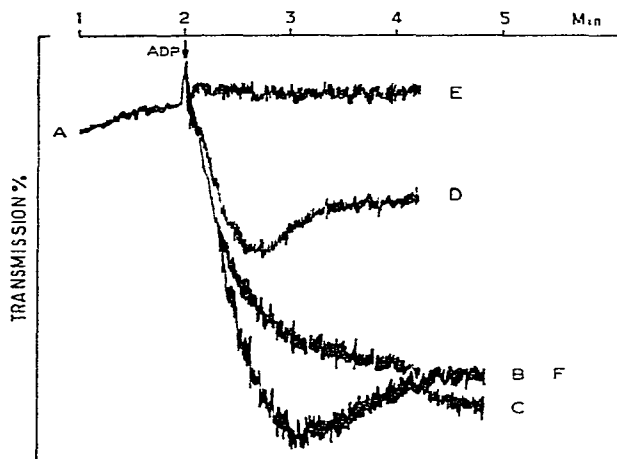


Fig 2 Effet de l'ADP-glucose 0,1mM sur l'agrégation du plasma humain riche en plaquettes A ADP-glucose seul et sans incubation, B ADP-glucose sans incubation et avec ADP  $10\mu\text{M}$ , C ADP-glucose 3 min d'incubation plus ADP  $10\mu\text{M}$ , D ADP-glucose 10 min d'incubation plus ADP  $10\mu\text{M}$ , E ADP-glucose 20 min d'incubation plus ADP  $10\mu\text{M}$ , F. ADP seul.

les mêmes conditions l'ADP-mannose perd successivement son activité agrégante et devient inhibiteur (Fig 3, D et E) Le comportement des trois esters glycosyliques de l'adénosine diphosphate est donc nettement différent

Les esters glycosyliques de l'UDP et du GDP étudiés (UDP-glucose, UDP-mannose, UDP-galactose, UDP-*N*-acétylglucosamine, acide UDP-glucuronique, UDP-

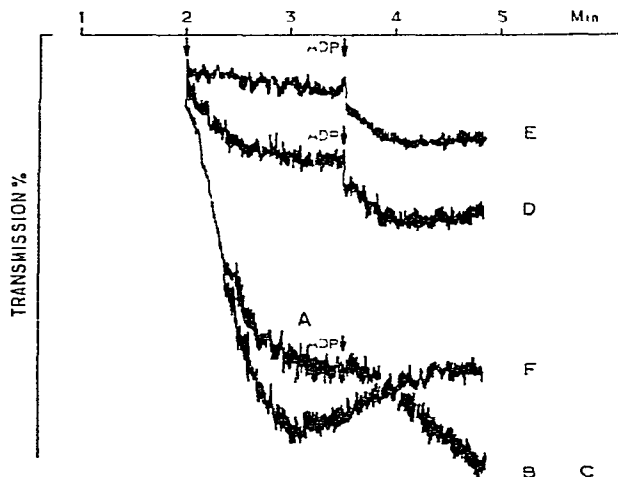


Fig 3 Effet de l'ADP-mannose sur l'agrégation du plasma humain riche en plaquettes A. ADP-mannose seul et sans incubation, B ADP-mannose sans incubation et avec ADP  $10\mu\text{M}$ , C ADP-mannose 3 min d'incubation plus ADP  $10\mu\text{M}$ , D ADP-mannose 10 min d'incubation plus ADP  $10\mu\text{M}$ , E ADP-mannose 20 min d'incubation plus ADP  $10\mu\text{M}$ ; F. ADP seul

xylose, GDP-glucose et GDP-mannose) ne montrent aucune action sur l'agrégation ni immédiatement, ni après une incubation de 10 min à 37°

Il n'y a pas de compétition entre l'ADP-mannose et l'ADP (Fig 3, B), ni entre l'ADP-ribose et l'adénosine (Fig 1, H)

DISCUSSION

L'ADP-ribose est un inhibiteur modéré de l'agrégation, dont l'activité augmente dans des conditions que l'on peut considérer approximativement physiologiques. Ainsi après 20 min d'incubation à 37° nous avons pu constater l'inhibition totale de l'agrégation déclenchée par l'ADP à une concentration finale 10µM. Contrairement à l'ADP-ribose, l'ADP-mannose est un agent agrégant, même si son activité est dix fois moins forte que celle de l'ADP. Au cours de l'incubation, dans des conditions physiologiques, l'ADP-mannose perd progressivement son pouvoir d'agrégation et devient modérément inhibiteur. Au point de vue de son action dans l'agrégation, l'ADP-glucose se situe entre les deux ADP-sucres précédents. Il présente notamment une activité agrégante limitée au départ, mais au cours d'une incubation de 20 min il devient également un inhibiteur modéré (Tableau I)

TABLEAU I

EFFET DES GLYCOSYL-DIPHOSPHONUCLÉOSIDES SUR L'AGREGATION PLAQUETTAIRE PAR L'ADP

Conditions d'incubation <sup>a</sup>		Inhibition de l'agrégation <sup>b</sup> par					
Conc ADP	Durée	ADP-ribose <sup>c</sup>		ADP-glucose <sup>d</sup>		ADP-mannose <sup>e f</sup>	
(µM)	(min)	100µM	10µM	100µM	10µM	100µM	10µM
10	0		+		0		0
10	3		++		0		+
10	10		+++		++		++
10	20		++++		+++		+++
10	10		+++		++		++
100	10		+		+		0
1000	10		0		0		0
10	60		++++		+++		+++
100	60		+++		+		++
1000	60		++		0		+
10	120		++++		+++		+++
100	120		+++		++		++
1000	120		+++		+		+
10	180		++++		+++		+++
100	180		+++		++		++
1000	180		+++		++		++
2	30		+++		+++		+++
2	60		(+)++		+++		(+)++
2	120		+++		+++		(+)++

<sup>a</sup>À 37° <sup>b</sup>Inhibition 0-5% 0, 5-35% +, 35-65% ++, 65-95% +++, 95-100% ++++ <sup>c</sup>Sans effet agrégant <sup>d</sup>Effet faiblement agrégant <sup>e</sup>Effet agrégant <sup>f</sup>Les dérivés de l'UDP et du GDP n'ont pas d'effet agrégant ou inhibiteur

Afin d'établir si l'effet inhibiteur des ADP-sucres ne provient pas de l'état réfractaire des plaquettes, nous avons étudié ce phénomène aux cours d'incubations prolongées de plusieurs heures à 37°. À une concentration 0,1mm, l'effet inhibiteur des ADP-sucres s'accroît au cours de l'incubation il faut dix fois ou cent fois plus d'ADP, même pour obtenir une agrégation partielle (Tableau I) À une concentration dix fois plus faible (10  $\mu$ M), les ADP-sucres atteignent après 30 min l'inhibition maximale de l'agrégation déclenchée par l'ADP à une concentration 2  $\mu$ M Une heure après que ce maximum a été atteint, l'ADP-ribose montre une légère baisse dans son action inhibitrice, qui reprend sa valeur maximale après 2 h On retrouve également cette légère baisse au bout d'une heure dans le cas de l'ADP-mannose, où elle persiste même après 2 h L'ADP-glucose se distingue par la stabilité de son effet inhibiteur au cours des incubations prolongées (Tableau I) Aucun de ces produits ne laisse donc soupçonner dans les conditions choisies l'état réfractaire des plaquettes, ou alors cet effet serait masqué par la superposition d'effets différents

Les trois dérivés glycosylés de l'ADP étudiés (ADP-ribose, ADP-glucose et ADP-mannose), montrent des effets différents dans l'agrégation plaquettaire L'incubation prolongée, à deux concentrations, n'a pas mis en évidence l'état réfractaire des plaquettes À la suite de leur action sur l'agrégation plaquettaire, il est évident que ni l'ADP-glucose, ni l'ADP-mannose ne peuvent être utilisés dans l'étude de la biosynthèse des glycoprotéines par les plaquettes et il faut donc utiliser les dérivés correspondants de l'uracyle ou de la guanine L'effet éventuel de l'ADP-ribose mérite également une attention particulière car ce nucléotide-sucré peut être libéré à partir du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) ou du poly-ADP-ribose dans les tissus, et peut avoir un effet considérable sur l'agrégation plaquettaire

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de subventions de la D G R S T (Contrat N° 6902018) et de la Fondation pour la Recherche Médicale Française

#### RÉFÉRENCES

- 1 L MESTER, dans J CAEN, *Platelet Aggregation*, Table Ronde Roussel, Masson, Paris, 1971, p 131
- 2 L MESTER, L SZABADOS, G V R P BORN ET F MICHAL, *Nature New Biol*, 236 (1972) 213
- 3 F MICHAL, G V R BORN L MESTER ET L SZABADOS, *Biochem J*, sous presse
- 4 H HOMLSEN ET H J DAY, *Ser Haemat*, IV-1 (1971) 28
- 5 E RECONDO ET L F LELOIR, *Biochem Biophys Res Comm*, 6 (1961) 85
- 6 H VERACHTERT, S T BASS ET R G HANSEN, *Biochim Biophys Acta*, 92 (1964) 482
- 7 Y NISHIZUKA, K UEDA, K NAKAZAWA ET O HAYAISHI, *J Biol Chem*, 242 (1967) 3164
- 8 R H REEDER, K UEDA, T HONJO, Y NISHIZUKA ET O HAYAISHI, *J Biol Chem*, 242 (1967) 3172
- 9 M FUTAI ET D MIZUNO, *J Biol Chem*, 243 (1968) 6325
- 10 M E HAINES, I R JOHNSTON, A P MATHIAS ET D RIDGE, *Biochem J*, 115 (1969) 881
- 11 L MICHAELIS, *J Biol Chem*, 87 (1930) 33
- 12 F K BEILER ET H GRAEFF, dans N U BANG, F K BELLER, E DEUTSCH ET E F MAMMEN, *Thrombosis and Bleeding Disorders*, Thieme Verl, Stuttgart, 1971, p 61 et 62