

Université de Montréal

Rôle de la PKC delta dans la fonction plaquettaire en réponse à la thrombine *via* le récepteur GPIb alpha

par

Younes Zaid

Programme des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Université de Montréal

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (PhD) en Sciences Biomédicales

Septembre 2015

© Younes Zaid, 2015

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Rôle de la PKC delta dans la fonction plaquettaire en réponse à la thrombine *via* le récepteur GPIb alpha

présentée par:

Younes Zaid

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Guy Rousseau.....Président rapporteur
Dr Yahye Merhi.....Directeur de recherche
Dr Walid Mourad.....Codirecteur de recherche
Dr Gaétan Mayer.....Membre du jury
Dr Éric Boilard.....Examineur externe
Dr Réjean Couture.....Représentant du doyen

Résumé

La famille des protéines kinases C (PKC) est essentielle pour la fonction plaquettaire en réponse à la thrombine qui signale et active les plaquettes *via* les *proteases activated receptors* (PAR-1 et PAR-4) et le GPIb α . Ces derniers constituent les récepteurs de moyenne/faible et de hautes affinités pour la thrombine, respectivement. L'isoforme PKC δ régule positivement ou négativement la fonction des plaquettes tout dépendamment de la nature du stimulus. Cependant, son importance dans la fonction plaquettaire en réponse à la thrombine en aval de la GPIb α reste inconnue. L'objectif principal de ce projet de doctorat était de déterminer l'implication de l'axe thrombine/GPIb α /PKC δ dans la fonction plaquettaire et d'évaluer le rôle de cet axe dans la régulation de la thrombose.

Dans les plaquettes humaines, le prétraitement avec l'inhibiteur spécifique de la PKC δ $\delta(V1-1)$ TAT, a significativement potentialisé l'activation et l'agrégation des plaquettes en réponse à de faibles concentrations de α -thrombine, mais pas en réponse à la γ -thrombine ou aux agonistes des PARs. Ce phénomène de potentialisation a été associé à une sécrétion accrue de granules, de génération de thromboxane A₂ (TXA₂) et une phosphorylation de la PKC δ sur la Tyr³¹¹, qui ont toutes été prévenues par l'inhibition spécifique du GPIb α à l'aide d'un anticorps monoclonal bloquant. En outre, l'inhibition de la p38 MAPK, ERK1/2 et le TXA₂ a inversé ce processus de potentialisation. Les plaquettes murines déficientes en PKC δ étaient aussi plus réactives à la thrombine et ont montré une augmentation significative de l'agrégation, alors qu'une étude menée *in vivo* chez la souris PKC δ ^{-/-} a montré, suite à une stimulation par α -thrombine, une réaction thrombotique accrue caractérisée par une diminution significative du temps de saignement ainsi qu'une formation de thrombo-embolies pulmonaires. En bloquant le GPIb α , ces effets ont été renversés.

Cette étude ouvre de nouvelles perspectives quant au rôle de la PKC δ dans les plaquettes en aval de GPIb α , où elle régule négativement la fonction plaquettaire en réponse à la thrombine. Ainsi, l'axe thrombine/GPIb α /PKC δ dans les plaquettes pourrait représenter un régulateur critique de la fonction plaquettaire et l'hémostase, et le dysfonctionnement de cette voie pourrait conduire à des événements thrombotiques.

Mots-clés: Plaquettes ■ PKC δ ■ GPIb α ■ Thrombine ■ Thrombose

Abstract

The protein kinase C (PKC) family is essential for platelet function in response to thrombin, which signals and activates platelets *via* protease-activated receptors (PARs) and GPIb α , the low/medium and high affinity receptors in human platelets, respectively. PKC δ positively and negatively regulates platelet function depending on the nature of the stimulus. However, its importance in platelet function in response to thrombin downstream of GPIb α remains unknown. Here, we aimed to determine the involvement of the thrombin/GPIb α /PKC δ axis in platelet function and investigate the relevance of this axis in regulating thrombosis.

In human platelets, pre-treatment with the specific PKC δ inhibitor δ (V1-1)TAT significantly potentiated platelet activation and aggregation in response to a priming concentration of α -thrombin, but not to γ -thrombin or PAR agonists. This potentiation process was associated with enhanced granule secretion, TXA₂ generation and PKC δ phosphorylation on Tyr³¹¹, all of which were prevented by GPIb α blockade. Moreover, inhibition of p38 MAPK, Erk1/2 and TXA₂ reverses this potentiation process. Platelets from PKC δ ^{-/-} mice show increased aggregation, whereas PKC δ ^{-/-} mice exhibit significantly decreased *in vivo* tail bleeding times and exacerbated pulmonary thrombo-emboli in response to α -thrombin. Blockade of GPIb α protects PKC δ ^{-/-} mice from these effects.

This study adds new insights into the role of PKC δ in platelets downstream of GPIb α , where it negatively regulates platelet function in response to thrombin. Thus, the thrombin/GPIb α /PKC δ axis in platelets may represent a critical regulator of platelet function and hemostasis, and dysfunction of this pathway could lead to adverse thrombotic events.

Keywords: Platelets ■ PKC δ ■ GPIb α ■ Thrombin ■ Thrombosis

Sommaire

Identification du Jury.....	i
Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Sommaire.....	iv-vi
Liste des figures.....	vii-ix
Liste des tableaux.....	x
Liste des abréviations.....	xi-xv
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1: Plaquettes.....	1-34
1.1 Formation des plaquettes: la thrombopoïèse.....	2
1.2 Morphologie plaquettaire.....	4
1.2.1 Membrane plasmique	4
1.2.2 Cytosquelette.....	5
1.2.3 Cytoplasme.....	5
1.3 Récepteurs plaquettaires.....	6
1.3.1 Récepteurs à sept domaines transmembranaires.....	6
1.3.1.1 Récepteurs de la thrombine.....	6
1.3.1.2 Récepteurs de l'ADP.....	9
1.3.1.3 Récepteurs de la famille des prostaglandines.....	10
1.3.2 Intégrines.....	10
1.3.2.1 Famille du $\beta 3$	11
1.3.2.2 Famille du $\beta 1$	12
1.3.3 Famille des récepteurs riches en leucine.....	12
1.3.3.1 GPIb-IX-V.....	12
1.3.3.2 Récepteurs Toll-like.....	13
1.3.4 Superfamille des immunoglobulines.....	13
1.3.4.1 GPVI.....	13
1.3.4.2 Fc γ RIIa.....	14

1.4 Fonctions des plaquettes.....	14
1.4.1 Adhésion plaquettaire.....	14
1.4.1.1 <i>Axe von Willebrand-GPIbα plaquettaire</i>	16
1.4.1.2 <i>Adhésion dépendante du collagène</i>	18
1.4.2 Activation plaquettaire par les agonistes solubles.....	19
1.4.2.1 <i>ADP</i>	19
1.4.2.2 <i>Thrombine</i>	20
1.4.2.3 <i>Thromboxane A₂</i>	21
1.4.3 Sécrétion plaquettaire.....	22
1.4.3.1 <i>Formation des granules</i>	22
1.4.3.2 <i>Constituants essentiels des granules</i>	23
1.4.3.3 <i>Mécanisme de la sécrétion: Fusion et relâche</i>	24
1.4.4 Agrégation plaquettaire.....	25
1.5 Mécanismes signalétiques des plaquettes.....	26
1.6 Plaquettes et athéro-thrombose.....	27
1.7 Antiplaquettaires actuels, en cours de développement et cibles thérapeutiques.....	30
Chapitre 2: Complexe GPIb-IX-V.....	35-44
2.1 Structure et fonction du GPIb-IX-V.....	36
2.1.1 Généralités.....	36
2.2 Partenaires intracellulaires du GPIb-IX-V.....	37
2.3 Syndrome de Bernard-Soulier.....	39
2.4 Différents ligands du GPIb-IX-V.....	40
2.4.1 Facteur von Willebrand.....	40
2.4.2 Thrombine.....	41
2.4.3 Autres ligands.....	42
2.5 Signalisation <i>via</i> le complexe GPIb-IX-V.....	43
Chapitre 3: Protéines Kinases C (PKC) dans les plaquettes.....	45-61
3.1. Structure et classification des PKCs.....	46
3.2. Activation, régulation intracellulaire et localisation des PKCs.....	48

3.2.1 Maturation des PKCs.....	48
3.2.2 Phosphorylation des PKCs.....	49
3.2.3 Activation des PKCs par les médiateurs secondaires.....	50
3.3 Rôle des PKCs dans la fonction plaquettaire.....	52
3.3.1 Dans le changement de forme et la sécrétion granulaire.....	52
3.3.2 Dans la dégranulation plaquettaire et la synthèse de thromboxane A ₂	53
3.3.3 Dans l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus.....	56
3.3.4 Dans la thérapie.....	58
3.4 Caractéristiques distinctives de l'isoforme PKCδ.....	58
Chapitre 4: Projet de recherche.....	62-65
4.1 Introduction.....	63
4.2 Problématique.....	63
4.3 Hypothèse et objectifs.....	64
Chapitre 5: Contribution scientifique.....	66-123
Premier article: La PKCδ régule négativement l'activation et l'agrégation des plaquettes humaines par l'entremise de la p38 MAPK, Erk1/2 et TXA ₂ en aval du récepteur GPIbα.....	67-98
Deuxième article: Le GPIbα régule négativement le temps de saignement et la formation des embolies pulmonaires chez la souris <i>PKCδ</i> ^{-/-} en réponse à la thrombine.....	99-123
Discussion générale.....	124-130
Conclusions et perspectives.....	131-132
Références bibliographiques.....	133-157
Liste des publications.....	158-159

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1: Les trois propositions de modèles de la production de plaquettes à partir des mégacaryocytes.....	3
Figure 1.2: Images prises par microscopie électronique à balayage.....	4
Figure 1.3: Les mécanismes signalétiques de l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine <i>via</i> les PAR-1 et PAR-4.....	8
Figure 1.4: Représentation schématique de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	11
Figure 1.5: Interactions du GPIb α avec les leucocytes et les cellules endothéliales.....	18
Figure 1.6: Cascade d'activation des plaquettes conduisant à la formation d'un clou hémostatique.....	19
Figure 1.7: Représentation schématique de l'activation des récepteurs PARs dans les plaquettes humaines et murines.....	21
Figure 1.8: Formation de l'agrégat plaquettaire et co-stimulation des plaquettes par les agonistes solubles.....	26
Figure 1.9: Mécanismes signalétiques de la régulation du calcium intracellulaire suite à l'activation des récepteurs plaquettaires.....	27
Figure 1.10: Rôle des plaquettes dans la réponse inflammatoire vasculaire associée à l'athérosclérose.....	29
Figure 1.11: Cibles moléculaires des agents antiplaquettaires.....	34

Chapitre 2

Figure 2.1: Structure détaillée du complexe GPIb-IX-V.....	36
Figure 2.2: Principaux partenaires intracellulaire du complexe GPIb-IX-V.....	37
Figure 2.3: Modèle de GPIb α comme cofacteur pour l'hydrolyse de PAR-1.....	42

Chapitre 3

Figure 3.1: Structure des différents membres de la famille des PKCs.....	47
Figure 3.2: Régulation intracellulaire des PKCs.....	52

Figure 3.3: Représentation schématique des mécanismes moléculaires de l'activation des PKCs.....	57
Figure 3.4: Schématisation du rôle de la PKC δ dans l'activation plaquettaire à l'alboaggregine.....	59

Chapitre 5

Figure 5.1: Vue d'ensemble de la voie signalétique découlant de l'interaction thrombine-GPIb α	130
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Article 1

Figure 1: PKC δ negatively regulates human platelet aggregation induced by low doses of α -thrombin.....	85
Figure 2: PKC δ negatively regulates thrombin-induced human platelet aggregation through GPIb α	86
Figure 3: PKC δ negatively regulates human platelet P-selectin expression through GPIb α	87
Figure 4: PKC δ negatively regulates human platelet secretion through GPIb α	88
Figure 5: Implication of p38 MAPK, Erk1/2 and TXA ₂	89
Figure 6: PKC δ phosphorylation is increased by PKC δ inhibition in response to a low dose of α -thrombin through GPIb α	90
Figure 7: PKC δ negatively regulates platelet function through membrane relocalization and not intrinsic kinase phosphorylation.....	91
Supplemental figure I: δ (V1-1)TAT alone has no effect on platelet aggregation.....	92
Supplemental figure II: Pre-treatment with a human anti-GPIb α antibody prevents δ (V1-1)TAT-induced potentiation of platelet aggregation.....	93
Supplemental figure III: Indomethacin has no effect on platelet aggregation in response to high dose of α -thrombin.....	94
Supplemental figure IV: PKC δ phosphorylation is unchanged by PKC δ inhibition in response to a high dose of α -thrombin through GPIb α despite its localization.....	95

Article 2

Figure 1: PKC δ negatively regulates mouse platelet aggregation through GPIb α 115

Figure 2: GPIb α blockade prevents PKC δ deficiency- and δ (V1-1)TAT-induced potentiation of platelet aggregation..... 116

Figure 3: PKC δ deficiency reduces bleeding time in response to a low dose of α -thrombin..... 117

Figure 4: PKC δ deficiency reduces platelet count in response to a low dose of α -thrombin..... 118

Figure 5: PKC δ negatively regulates platelet function and pulmonary thrombo-emboli formation *in vivo* through GPIb α 119

Supplemental figure I: Mice genotyping..... 120

Supplemental figure II: Anti-GPIb α F(ab) fragment prevents the potentiation of mouse platelet aggregation in *PKC δ ^{-/-}*..... 121

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1: Récepteurs plaquettaires impliqués dans le recrutement, l'adhésion et l'agrégation plaquettaires.....	16
Tableau 1.2: Récepteurs plaquettaires impliqués dans la phase d'amplification.....	22
Tableau 1.3: Principaux constituants et fonctions des granules plaquettaires.....	24

Chapitre 3

Tableau 3.1: Distribution tissulaire et facteurs d'activation requis pour les PKCs.....	48
------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Abréviations

ACS	Syndrome coronarien aigu <i>(Acute coronary syndrome)</i>
ADAM-10	Déintégrine et metallopeptidase-10 <i>(A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein-10)</i>
ADP	Adénosine diphosphate
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AVC	Accident vasculaire cérébral
BSS	Syndrome de Bernard-Soulier <i>(Bernard Soulier syndrome)</i>
Btk	Tyrosine kinase de Bruton <i>(Bruton's tyrosine kinase)</i>
CD40L	CD40 ligand
COX	Cyclo-oxygénase
DAG	Diacyglycérol
DMS	Système membranaire de démarcation <i>(Demarcation membrane system)</i>
EDHF	Facteur endothélial hyperpolarisant <i>(Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor)</i>
EDRF	Facteur endothelial relaxant <i>(Endothelium-Derived Relaxing Factor)</i>
EGF	Facteur de croissance épidermique <i>(Epithelial Growth Factor)</i>
ERK	Protéine kinase régulatrice extracellulaire

(Extracellular signal-regulated kinase)

Fab	Fragment de liaison de l'antigène <i>(Antigen-binding fragment)</i>
FcR γ	Chaînes γ des récepteurs Fc <i>(Fc receptor γ-chain)</i>
GP	Glycoprotéine
GTP	Guanosine triphosphate
ICAM	Molécule d'adhésion cellulaire <i>(InterCellular adhesion molecule)</i>
IP3	Inositol triphosphate 3
ITAM	Motifs activateurs d'immunorécepteurs à base de tyrosine <i>(Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)</i>
KCIP	Protéine inhibitrice des kinases C <i>(Protein kinase C inhibitor)</i>
MAPK	Protéine kinase activatrice du mitogène <i>(Mitogen Activating Protein Kinase)</i>
NO	Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote <i>(Nitric oxide)</i>
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide <i>(poly-acrylamide gel electrophoresis)</i>
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes <i>(Pathogen-Associated Molecular Patterns)</i>
PAR	Récepteur activé par les protéases <i>Protease-activated receptor</i>

PBMCs	Cellules mononucléaires du sang périphérique <i>(Peripheral Blood Mononuclear Cells)</i>
PCR	Réaction de polymérase en chaîne <i>(Polymerase chain reaction)</i>
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes <i>(Platelet-derived growth factor)</i>
PECAM-1	Molécule -1 d'adhésion cellulaire des plaquettes et l'endothélium <i>(Platelet endothelial cell adhesion molecule-1)</i>
PF4	Facteur 4 des plaquettes <i>(Platelet factor 4)</i>
PGD2	Prostaglandine D2
PGE2	Prostaglandine E2
PGI2	Prostacycline
PIP3	Phosphatidylinositol triphosphate
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase <i>(Phosphatidylinositol 3-kinase)</i>
PLC	Phospholipase C
PSGL-1	Ligand-1 glycoprotéique de la P-sélectine <i>(P-selectin glycoprotein ligand-1)</i>
PKC	Protéine kinase C
PKD	Kinase phosphoinositide-dépendante <i>(Phosphoinositide-dependent kinase)</i>
PLC	Phospholypase C
PP-1	Protéine phosphatase-1

PRP	Plasma riche en plaquettes
RANTES	Facteur régulé dans l'activation des cellules T normales exprimées et sécrétées <i>(Regulated upon activation and normal T cell expressed and secreted)</i>
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RIPA	Agrégation plaquettaire induite par la ristocétine <i>(Ristocetin-induced platelet aggregation)</i>
Ser	Sérine
SH3	Domaine d'homologie Src <i>(Src homology 3)</i>
TGF- β	Facteur de croissance transformant- β <i>(Transforming Growth Factor-β)</i>
TIR	Récepteur toll-interleukine-1 <i>(Toll-Interleukin-1 Receptor)</i>
TLR	Récepteur ressemblant aux tolls <i>(Toll-like receptor)</i>
TRAP	Peptide activant les récepteurs de la thrombine <i>(Thrombin receptor activating peptide)</i>
TXA ₂	Thromboxane A ₂
Tyr	Tyrosine
VASP	Phosphoprotéine stimulée par un vasodilatateur <i>(Vasodilator-stimulated phosphoprotein)</i>
VCAM	Molécule d'adhésion de cellule vasculaire <i>(Vascular cell adhesion molecule)</i>
VWF	Facteur Von Willebrand

(Von Willebrand factor)

WASP Protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich
(Wiskott-Aldrich syndrome protein)

WT Type sauvage
(Wild Type)

Remerciements

Le présent travail intitulé « Rôle de la PKC delta dans la fonction plaquettaire en réponse à la thrombine via le récepteur GPIIb alpha » a été réalisé au Laboratoire de Thrombose Hémostase de l'Institut de Cardiologie de Montréal, sous la direction du Dr Yahye Merhi. Qu'il me soit permis de lui exprimer mes vifs remerciements, d'abord pour l'ambiance conviviale et familiale qu'il a toujours su instaurer au sein de l'équipe, ainsi que pour son encadrement scientifique et ses précieux conseils qu'il m'a prodigués tout au long de la réalisation de ce travail. Son perfectionnisme et son abnégation sont un modèle pour moi. Ces années, enrichissantes et difficiles, sont à l'origine d'une expérience sans pareil.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers mon codirecteur de recherche le Dr Walid Mourad, pour l'amabilité avec laquelle il m'a toujours traité ainsi que pour l'aide scientifique et le temps précieux qu'il m'a consacrés. Qu'il veuille bien accepter ma sincère considération.

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble des membres du jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Je remercie particulièrement Daniel et Ahmed pour tout le temps consacré à m'aider durant ces cinq dernières années. Votre expertise technique et vos conseils m'ont été d'un grand secours pour la réalisation de ce mémoire. Merci pour votre patience et votre aide.

Mes remerciements s'adressent également aux Nabils, à Nezha, Kevin, Lara, Pauly, Jean-François, Rama et Olivier pour votre engagement et votre disponibilité à mon égard.

J'exprime toute ma reconnaissance aux Drs Oudghiri et Naya pour m'avoir initié à la recherche durant ma Maîtrise à la faculté de Casablanca.

Ce mémoire est dédié à mes chers parents et grands-parents, qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études. Sans eux, je n'aurais certainement pas pu continuer mes études. Ce mémoire représente donc l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'ils m'ont prodigués tout au long de ma scolarité. Qu'ils en soient remerciés par cette trop modeste dédicace.

Chapitre 1: Plaquettes

1.1 Formation des plaquettes: la thrombopoïèse

Les plaquettes furent découvertes par le chercheur italien Giulio Bizzozero (Bizzozero 1869). Il fut le premier à les identifier anatomiquement en plus de leur attribuer un rôle dans l'hémostase et la thrombose vasculaire (Bizzozero 1869). Bizzozero fut aussi le premier à identifier les mégacaryocytes issus de la moelle osseuse, tout en ignorant que ces dernières étaient les cellules précurseurs des plaquettes (Bizzozero 1869). L'origine des plaquettes est singulière par rapport aux autres cellules sanguines. Les plaquettes sont en effet produites à partir des mégacaryocytes, de grosses cellules multi-nucléées de la moelle osseuse qui, sous l'impulsion de cytokines, perdent des fragments du cytoplasme.

Bien qu'il ait été universellement reconnu que les plaquettes proviennent à partir des mégacaryocytes, les mécanismes par lesquels elles se forment et se libèrent de ces cellules précurseurs restent controversés. Au fil des années, plusieurs modèles de production de plaquettes ont été proposés. Ceux-ci comprennent (a) le bourgeonnement plaquettaire, (b) la fragmentation cytoplasmique *via* le système de membrane de démarcation (DMS), et (c) la formation des pro-plaquettes (figure 1.1).

Le modèle du bourgeonnement membranaire suggère que les plaquettes seraient clivées de la périphérie du cytoplasme des mégacaryocytes et relâchées par la suite dans la circulation, après qu'elles aient été attachées à la membrane mégacaryocytaire (Ihizumi, Hattori et al. 1977).

Pour ce qui est de la théorie de la fragmentation cytoplasmique, des plaquettes matures, *via* le DMS, seraient préassemblées dans le cytoplasme des mégacaryocytes (Shaklai and Tavassoli 1978), et seraient par la suite relâchées dans le milieu extracellulaire suite à une fragmentation cytoplasmique.

Enfin, dans le modèle de la formation des pro-plaquettes, le DMS semble jouer le rôle d'un réservoir membranaire permettant ainsi l'extension des pro-plaquettes au bout desquelles reposeraient ce qu'on appelle des pseudo-plaquettes en forme de perles (Becker and De Bruyn 1976) (Radley and Haller 1982). La plupart des études réalisées dans ce sens sont en accord avec ce dernier modèle.

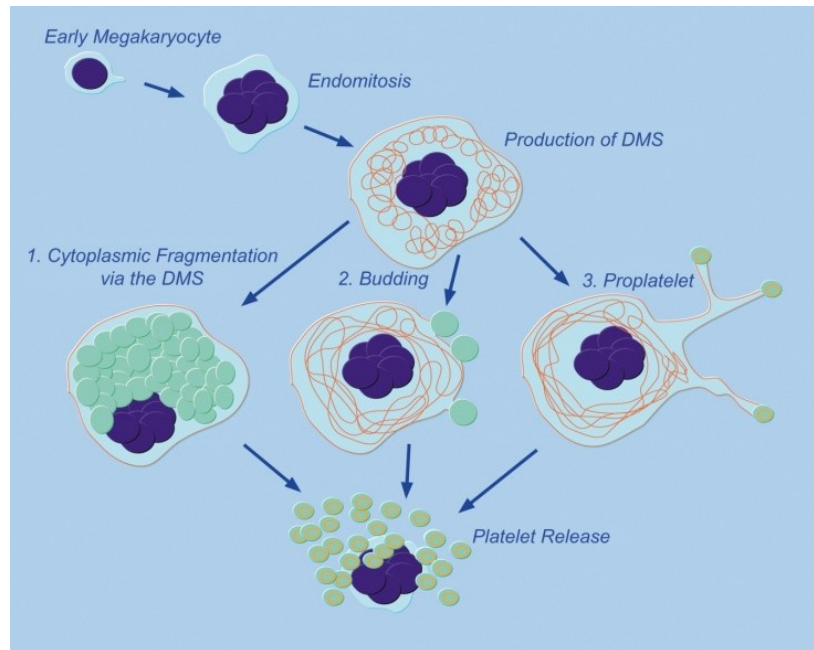


Figure 1.1: Les trois propositions de modèles de la production de plaquettes à partir des mégacaryocytes. (Michelson A.D. (2013). *Platelets*. Third Edition. Academic Press. pp. 31).

Comme les autres éléments figurés du sang, les plaquettes ont une vie brève; elles ne survivent probablement que de 7 à 12 jours avant leur élimination par phagocytose dans les macrophages du système réticulo-endothélial au sein du foie et de la rate. Cette durée se raccourcit si les plaquettes sont activées. Dans des conditions physiologiques, chaque millimètre cube de sang contient entre 250 000 et 400 000 plaquettes.

Les plaquettes sont les acteurs essentiels du maintien de l'intégrité vasculaire, elles préviennent les pertes liquidiennes en déclenchant des réactions en chaîne qui provoquent la coagulation du sang. Leur principale fonction alors est d'assurer l'hémostase primaire conduisant à la formation d'un thrombus riche en plaquettes ou « thrombus blanc » (Furie and Furie 2008). De plus, il a été démontré que les plaquettes jouent également un rôle important dans les processus de cicatrisation, de régulation de l'inflammation, d'angiogenèse et de séparation des vaisseaux lymphatiques et sanguins (Leslie 2010).

1.2 Morphologie plaquettaire

Ce sont les plus petits éléments figurés du sang. Les plaquettes circulantes au repos (état non activé) sont sous forme de disques arrondis ou ovales dépourvus de noyau. Leur contenu cytoplasmique est composé principalement de granules (denses et alpha) et d'organelles cellulaires typiques, tels que des mitochondries, des lysosomes et des membranes résiduelles du réticulum endoplasmique (George 2000). Leur diamètre varie entre 2 et 4 μm et leur épaisseur entre 0.5 et 2 μm . Lors de son activation, la plaquette passe d'une forme discoïde à une forme sphérique et émet des prolongements membranaires de type filopodes et lamellipodes, avec l'externalisation du réseau canaliculaire et la sécrétion des granules.

L'analyse par microscopie électronique permet de distinguer trois compartiments cellulaires: la membrane plasmique, le cytosquelette et les organelles. L'ultrastructure de la plaquette au repos ainsi qu'à l'état activé est représentée dans la Figure 1.2.

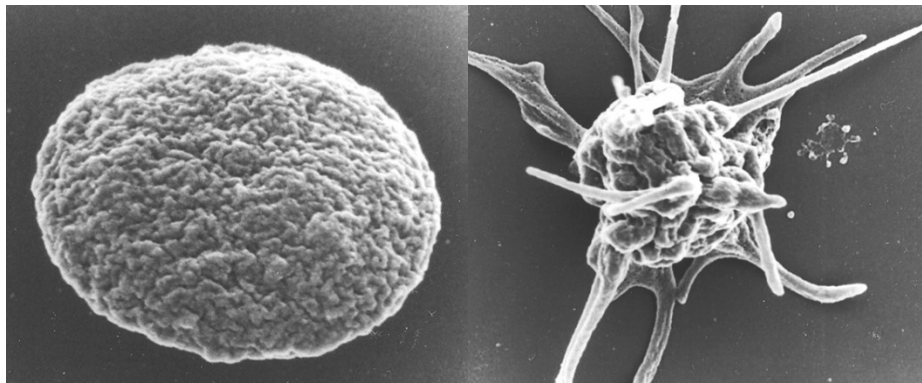


Figure 1.2 : Images prises par microscopie électronique à balayage. Gauche : plaquette au repos ; Droite : plaquette activée (formation des filopodes). (Michelson A.D. (2013). *Platelets*. Third Edition. Academic Press. pp. 118).

1.2.1 Membrane plasmique

La membrane plasmique des plaquettes (bicouche de phospholipides) est lisse et ne présente que quelques invaginations membranaires formant ce qu'on appelle le système canaliculaire ouvert (SCO). Le SCO représente un système de conduit élaboré permettant l'entrée de petites substances plasmatiques à l'intérieur de la cellule (endocytose). Au cours de

l'activation plaquettaire, le SCO fusionne avec les granules cytoplasmiques et favorise la relâche de leur contenu dans le milieu extracellulaire. Comme pour tout autre cellule, la membrane plasmique des plaquettes constitue aussi un lieu d'ancrage pour une variété de récepteurs et de molécules d'adhésion essentielles au fonctionnement de la cellule (White and Krumwiede 1987).

1.2.2 Cytosquelette

Le cytosquelette de la plaquette est principalement composé de microtubules (majoritairement la tubuline β 1), de polymères d'actine et de protéines qui leur sont associées (Kenney and Linck 1985), (Hartwig and Italiano 2006). C'est une composante intégrale de la cellule, puisqu'il confère aux plaquettes leur forme (grâce aux microtubules), leur permet de résister aux forces de cisaillement générées par le débit sanguin, assure l'ancrage de différentes glycoprotéines membranaires et représente le siège d'une multitude de réactions biochimiques impliquées dans l'activation plaquettaire (Shattil, Kashiwagi et al. 1998). Lors de l'activation plaquettaire, le réseau d'actine subit une réorganisation, ce qui permet le changement de forme des plaquettes (discoïde à une forme sphérique dotée de filopodes) (Winokur and Hartwig 1995), (Clemetson 1995), l'adhésion et l'étalement sur une surface (Hartwig 2006).

1.2.3 Cytoplasme

Les plaquettes renferment dans leur cytoplasme -un système fibrillaire contractile et riche en organelles- un nombre important de mitochondries, de grains de glycogène et de granules de sécrétion. Il existe trois types de granules plaquettaires; les granules denses, les granules alpha et les lysosomes. Ces granules renferment une multitude de substances indispensables au processus de l'activation, de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire. Lors d'une activation forte, les granules sécrètent leur contenu par un mécanisme d'exocytose. Les granules alpha sont les plus abondants et contiennent de nombreuses protéines, dont le facteur plaquettaire 4 (PF4), la β -thromboglobuline, la P-sélectine, des facteurs de coagulation (FV, FXI, FXIII), des protéines adhésives et des facteurs de croissance (PDGF, TGF- β , EGF...). Les granules denses contiennent des nucléotides, de l'ADP (~653 mM) et de l'ATP (~436 mM), du pyrophosphate (~300 mM), du calcium (~2 M) et de la sérotonine (~65 mM). Enfin les lysosomes contiennent des hydrolases acides ainsi que des protéases (Holmsen and Weiss 1979).

1.3 Récepteurs plaquettaires

Contrairement à la grande majorité des cellules, les plaquettes ne contiennent pas de noyau et donc ne peuvent s'adapter, en faisant appel à une synthèse *de novo*, à des situations différentes, bien qu'il y ait quand même des preuves de leur capacité de synthèse *de novo* à partir de l'ARN messager (ARNm) résiduel provenant des mégacaryocytes. Ainsi, les plaquettes doivent être équipées d'un large éventail de molécules pré-synthétisées prêtes à effectuer, en réponse à différents stimuli, diverses fonctions physiologiques, et faire face aux éventuels événements pathologiques.

Une caractéristique propre aux plaquettes est que la membrane ainsi que les protéines membranaires représentent une proportion importante de leur masse cellulaire totale. Elles sont donc capables de modifier leur phénotype malgré l'absence du noyau, grâce à l'externalisation sur leur membrane des récepteurs stockés dans leurs granules internes. Ces récepteurs sont exprimés sur la surface des plaquettes suite à leur activation (ex. P-sélectine). Les récepteurs plaquettaires constituent un pont qui relie le contenant des plaquettes avec l'extérieur, car ils déterminent la réactivité des plaquettes avec une large gamme d'agonistes et de protéines adhésives.

1.3.1 Récepteurs à sept domaines transmembranaires

La famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires est la principale famille des récepteurs exprimés sur les plaquettes. Ce sont des protéines monomériques couplées aux protéines G (RCPG), caractérisées par leurs sept domaines transmembranaires. On peut distinguer différents groupes, dont le plus important est celui des récepteurs de la thrombine.

1.3.1.1 Récepteurs de la thrombine

Puisque la thrombine est un puissant activateur plaquettaire, les récepteurs de la thrombine sont considérés comme les principaux représentants du groupe des récepteurs à sept domaines transmembranaires sur les plaquettes (Michelson A.D. (2013). *Platelets*. Third Edition. Academic Press. pp. 174). Le premier récepteur à être identifié et caractérisé dans les plaquettes humaines était le récepteur de la protéase activée 1 (PAR-1) (Vu, Hung et al. 1991) avec environ 2500 copies constituant ainsi le récepteur plaquettaire le plus prédominant de la thrombine.

D'autres PARs ont été également identifiés à la surface des plaquettes, notamment le PAR-2, le PAR-3 et le PAR-4.

Cependant, des différences d'expression existent entre les espèces. En effet, les deux isoformes PAR-1 et PAR-4 sont exprimés (PAR-3 est très faiblement exprimé) à la surface des plaquettes humaines, alors que les isoformes PAR-3 et PAR-4 (PAR-1 est absent chez la souris) sont présents dans les plaquettes murines (Furman, Liu et al. 1998), (Ofosu 2003).

Il est à signaler que le PAR-2 n'est pas présent sur les plaquettes et est le seul récepteur de la famille des PARs à ne pas être clivé par la thrombine, mais plutôt par d'autres sérines protéases: la trypsine et la tryptase (Nystedt, Emilsson et al. 1995), (Mirza, Schmidt et al. 1997).

Contrairement à d'autres membres de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires, les récepteurs PARs ont un mécanisme d'action particulier de l'activation par la thrombine, impliquant un clivage spécifique du domaine extracellulaire N-terminale, ce qui expose une nouvelle extrémité N-terminale qui, par repliement, agit en tant que ligand pour le récepteur (Vu, Hung et al. 1991), (Rasmussen, Vouret-Craviari et al. 1991).

Les plaquettes possèdent un double système signalétique comprenant deux récepteurs à la thrombine fonctionnant conjointement. Ce système inclut les récepteurs PAR-1 et PAR-4 qui, ensemble, sont responsables de la grande majorité de la réponse cellulaire déclenchée par l'action de la thrombine (figure 1.3) (Kahn, Zheng et al. 1998). PAR-1 est approximativement 10 fois plus sensible que PAR-4. Autrement dit, le PAR-1 a plus d'affinité pour la thrombine et est activé par des concentrations nettement inférieures par rapport au PAR-4 (1 nM pour PAR-1 *vs* 10-30 nM pour PAR-4) (Xu, Andersen et al. 1998). PAR-4 (récepteur de faible affinité) serait possiblement fonctionnel lorsque les plaquettes sont exposées à de fortes doses de thrombine et/ou PAR-1 est désensibilisé. Ainsi, l'activation et l'agrégation plaquettaires en réponse à de faibles doses de thrombine sont déclenchées par PAR-1, tandis que la stimulation plaquettaire à de fortes concentrations de thrombine est gouvernée par PAR-4 (Kahn, Nakanishi-Matsui et al. 1999).

Le récepteur murin PAR-3 possède un mode d'activation différent des deux précédents puisque son activation est liée à celle du récepteur PAR-4. La signalisation n'est pas induite par PAR-3 seul, mais dépend de la signalisation de PAR-4. PAR-3 agit en effet comme cofacteur pour le clivage et l'activation de PAR-4 à de faibles concentrations de thrombine (Nakanishi-Matsui, Zheng et al. 2000).

La stimulation des PARs engendre une forte activation plaquettaire qui mène ultimement à la réorganisation du cytosquelette et à l'activation des intégrines, notamment l'intégrine α IIb β 3; phénomènes cellulaires essentiels à l'adhésion ferme et à l'agrégation plaquettaire (Hers, Donath et al. 1998, Klages, Brandt et al. 1999). Les voies de signalisation déclenchées suite à l'activation des PARs impliquent l'hydrolyse de la phosphoinositide (PI), la phosphorylation de plusieurs protéines, l'augmentation du calcium intracellulaire libre et l'inhibition de la synthèse de l'AMPc (un puissant médiateur de l'inhibition plaquettaire) (Klages, Brandt et al. 1999). Les protéines hétérodimériques G sont responsables de diverses cascades signalétiques découlant de l'activation des PARs (Brass, Manning et al. 1997). La figure 1.3 résume les principaux mécanismes de signalisation plaquettaire suite à l'activation des PARs.

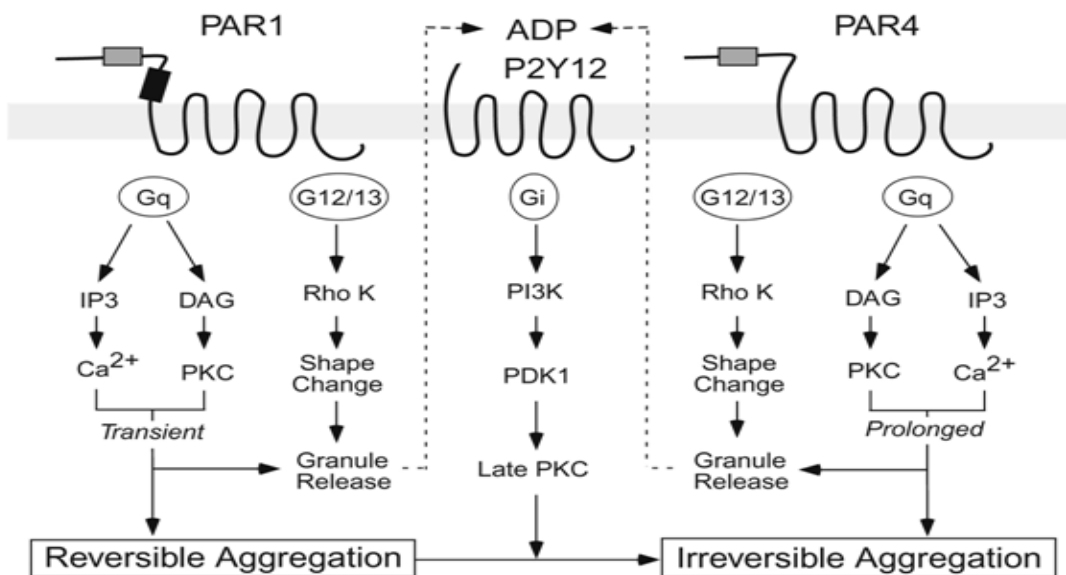


Figure 1.3: Les mécanismes signalétiques de l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine via les PAR-1 et PAR-4. (Michelson A.D. (2013). *Platelets*. Third Edition. Academic Press. pp. 252).

Les plaquettes contiennent plusieurs familles de protéines G (G_{as} , G_{ai} , G_{aq} et $G_{\alpha12/13}$), et au moins deux isoformes de la PLC (β et γ), tous impliqués dans la signalisation plaquettaire à la thrombine, à l'exception de la PLC γ qui occupe un rôle important dans l'activation au collagène (Francischetti, Ghazaleh et al. 1998).

Il existe trois principales voies signalétiques impliquées dans l'activation des PARs, soit celles découlant des protéines G_{aq} , $G_{\alpha12/13}$ et G_{ai} . La stimulation de G_{aq} active la voie de la PLC β , ce qui favorise l'activation des PKC et la libération du calcium intracellulaire sous l'action du DAG et de l'IP $_3$, respectivement (Offermanns, Toombs et al. 1997). Cette voie est requise pour l'activation des intégrines et ainsi pour l'agrégation plaquettaire. PAR-1 et PAR-4 stimulent également la voie $G_{\alpha12/13}$, qui à son tour, induit l'activation de Rho et Rho kinase, ce qui va permettre le changement de forme plaquettaire et le réarrangement du cytosquelette (Klages, Brandt et al. 1999). Finalement, la stimulation de G_{ai} est responsable de l'inhibition de l'adénylate cyclase et de l'AMPc (Barr, Brass et al. 1997).

1.3.1.2 Récepteurs de l'ADP

L'ADP est un agoniste plaquettaire primaire autocrine sécrété par les granules denses des plaquettes. Bien que l'ADP ait été l'un des premiers agonistes plaquettaires à être identifié, ses récepteurs n'ont que récemment été définitivement caractérisés. Le modèle actuel des récepteurs de l'ADP sur les plaquettes comporte deux types distincts, P2Y $_1$ et P2Y $_{12}$.

Le récepteur P2Y $_{12}$ a été le premier récepteur de l'ADP décrit dans les plaquettes. Son rôle est de renforcer l'activation plaquettaire et la stabilisation des agrégats plaquettaires formés. Il est couplé à une protéine Gi qui inhibe l'adénylate cyclase et active la phospho-inositide 3 kinase (PI3Kinase) ainsi que le récepteur au fibrinogène, le GPIIb/IIIa (ou l'intégrine α IIB β 3) (Dorsam and Kunapuli 2004), (Gachet 2005).

Le P2Y₁₂ est le seul récepteur de l'ADP impliqué dans l'externalisation de la phosphatidylsérine à la surface des plaquettes (Gratacap, Herault et al. 2000, Dangelmaier, Jin et al. 2001) et régule donc leur activité pro-coagulante. Le récepteur P2Y₁ est couplé à une protéine Gq et est responsable de la mobilisation calcique, du changement de forme des plaquettes suite à leur activation par l'ADP et d'une agrégation transitoire en réponse à l'ADP (Jin, Daniel et al. 1998, Savi, Beauverger et al. 1998). Pour obtenir une agrégation maximale à l'ADP, la co-activation de P2Y₁ avec P2Y₁₂ est nécessaire. P2Y₁ active également la phospholipase C et la PKC. Le troisième récepteur purinergique présent sur la plaquette est le P2X₁ qui un récepteur de l'ATP sous forme de canal calcique appartenant à une famille structurale différente (Vial, Hechler et al. 1997).

3.1.3 Récepteurs de la famille des prostaglandines

La prostacycline (ou PGI₂), issue de l'acide arachidonique, est produite naturellement par les cellules de l'endothélium par l'action de l'enzyme prostacycline synthétase sur la prostaglandine H₂. La principale action de la prostacycline est d'inhiber l'agrégation des plaquettes en entraînant une augmentation du niveau d'AMPc intracellulaire. C'est aussi un vasodilatateur efficace (Stuart 1983). La PGI₂ peut se lier aux récepteurs IP (Coleman, Grix et al. 1994). Elle a des effets opposés au TXA₂, ce qui suggère un mécanisme homéostatique entre ces deux hormones en réponse à une lésion de l'endothélium d'un vaisseau sanguin.

Le TXA₂ fait partie de la famille des prostanoïdes dérivés de l'acide arachidonique. Il est synthétisé lors de l'activation plaquettaire après activation de la phospholipase A₂, puis libéré probablement par diffusion à travers la membrane plasmique. Le TXA₂ possède chez l'homme deux récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques: TP α et TP β qui se distinguent par leur extrémité C-terminale (Hirata, Hayashi et al. 1991). Les récepteurs TP sont couplés aux protéines G hétérotrimériques G α q et G α 12/13 (Knezevic, Borg et al. 1993), (Offermanns, Laugwitz et al. 1994).

1.3.2 Intégrines

Les intégrines, présentes sur la plupart des types cellulaires, sont une famille de molécules d'adhérence responsables des interactions cellule-cellule et cellule-matrice (Bouvard, Brakebusch

et al. 2001). La famille des intégrines est la plus diversifiée des récepteurs d'adhésion cellulaire: on distingue 18 sous-unités α et 8 sous-unités β différentes, qui s'associent de façon non covalente pour former 24 intégrines différentes (Ruoslahti and Engvall 1997), (Hynes 2002), (Beer and Schwaiger 2008).

1.3.2.1 Famille du $\beta 3$

L' α I**II** β 3 (ou le complexe GPII**II**a-IIIa) est la seule intégrine exprimée uniquement sur les plaquettes. Elle est la principale intégrine plaquettaire (et récepteur) avec 50000 à 80000 copies par plaquette. Son absence ou son altération conduit au syndrome de thrombasthénie de Glanzmann (Clemetson and Clemetson 1994), trouble de saignement le plus courant causé par un défaut de ce récepteur plaquettaire. La principale fonction de α I**II** β 3 est sa capacité à subir une activation, une transition d'un état de faible affinité à un état de haute affinité, ce qui va lui permettre de devenir accessible à ses ligands extracellulaires. Cette transformation est le point culminant de ce qu'on appelle signalisation « *inside-out* ». La signalisation « *outside-in* », désigne, quant à elle, les événements signalétiques émanant de l'interaction de l'intégrine α I**II** β 3 avec une molécule de fibrinogène. Ceux-ci évoluent en fonction du degré d'oligomérisation (clustering) des intégrines dans la membrane plasmique, et impliquent le recrutement et/ou l'activation de protéines effectrices et de protéines structurales du cytosquelette d'actine. La figure 1.4 illustre la structure de l'intégrine α I**II** β 3.

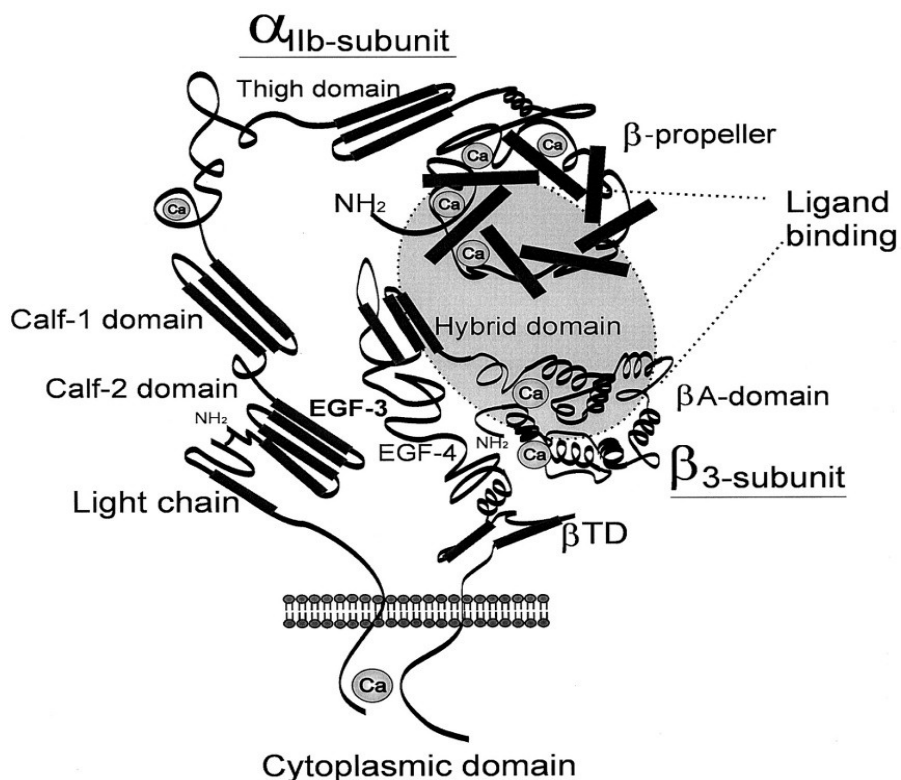


Figure 1.4: Représentation schématique de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. (Quinn *et al.* ATVB. 2003).

L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ est présente sur les plaquettes en petites quantités (quelques centaines de copies par plaquette), alors que sa fonction reste incertaine. Dans d'autres cellules, $\alpha_V\beta_3$ est un récepteur de la vitronectine (Pytela, Pierschbacher *et al.* 1985). Lorsque β_3 est affectée, $\alpha_V\beta_3$ ainsi que $\alpha_{IIb}\beta_3$ ne sont pas exprimées.

1.3.2.2 Famille du β_1

Les intégrines β_1 sont principalement impliquées dans les interactions cellule-matrice extracellulaire avec des molécules comme le collagène, la laminine, la fibronectine et la vitronectine. Elles sont exprimées par la plupart de type de cellules, notamment les plaquettes et les cellules endothéliales. On distingue trois β_1 présents sur les plaquettes, soit les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$ qui sont considérées respectivement comme les récepteurs de la fibronectine et de la laminine sur les plaquettes, ensemble jouent un rôle supplémentaire dans l'adhésion des plaquettes aux sites de lésions (Piotrowicz, Orzechowski *et al.* 1988), (Sonnenberg, Modderman *et al.* 1988), ainsi que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ qui est considérée comme le premier récepteur identifié du

collagène jouant un rôle clé dans l'adhésion plaquettaire (Saelman, Nieuwenhuis et al. 1994). Cette intégrine est présente sur la surface des plaquettes à une densité de 2000 à 4000 copies par plaquette. Il s'agit d'un hétérodimère formé d'une sous-unité $\alpha 2$ (150 kDa) et d'une sous-unité $\beta 1$ (130 kDa), toutes deux étant composées d'une région extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une région cytoplasmique. La sous-unité $\alpha 2$ contient dans sa partie extracellulaire le domaine I (pour *insert*) indispensable pour la liaison du collagène (Tuckwell, Calderwood et al. 1995). La partie cytoplasmique des chaînes β des intégrines est assez courte et contient des séquences relativement bien conservées qui interagissent avec les composants du cytosquelette (Calderwood, Shattil et al. 2000).

1.3.3 Famille des récepteurs riches en leucine

1.3.3.1 GPIb-IX-V

La famille des récepteurs riches en leucine (LRR) est représentée principalement, dans les plaquettes, par le complexe GPIb-IX-V, avec environ 50 000 copies/plaquette, un chiffre qui fait de ce complexe le second récepteur plaquettaire le plus abondant (après l' $\alpha IIb\beta 3$). Ses propriétés réceptrices sont essentiellement portées par l'une des quatre glycoprotéines transmembranaires formant ce complexe, la GPIb α . Dans sa partie N-terminale (45 Da), cette glycoprotéine est capable de lier plusieurs molécules, dont le VWF et la thrombine, qui jouent des rôles importants dans l'activation plaquettaire et l'hémostase (Yin, Liu et al. 2008) (Lechtenberg, Freund et al. 2014). Ce complexe sera décortiqué dans le chapitre 2.

1.3.3.2 Récepteurs Toll-like

Les récepteurs Toll-like (TLR) sont considérés comme la seconde classe de la famille des LRR à être détectée, après le complexe GPIb-IX-V, dans les plaquettes. Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I possédant: un domaine extracellulaire, en forme de fer à cheval, riche en leucine permettant l'interaction avec les PAMP (pour *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ; un domaine transmembranaire ; et un domaine TIR (pour *Toll-Interleukin-1 Receptor*) intracellulaire fondamental dans la transduction du signal.

En 2004, il a été démontré par une équipe japonaise que les plaquettes humaines expriment les TLR1 et 6 (Shiraki, Inoue et al. 2004). Une année plus tard, une équipe française a prouvé que les plaquettes humaines expriment également les TLR2, 4 et 9 aussi bien à leur

surface qu'à l'intérieur (Cognasse, Hamzeh et al. 2005). L'expression de ces TLRs serait modulée en fonction de l'état d'activation des plaquettes.

En effet, l'équipe du Dr Sample, après avoir confirmé la présence des TLR2,4 et 9 dans les plaquettes humaines et murines, a montré que les TLR4 plaquettaires seraient responsables de la modulation de la thrombocytopenie induite par le LPS ainsi que la production du TNF α (Aslam, Speck et al. 2006). Une autre étude menée par l'équipe du Dr Kubes a également démontré l'importance de la présence des TLR4 sur la surface plaquettaire dans la régulation de la thrombocytopenie induite par le LPS, mais aussi dans la cumulation des plaquettes dans les poumons, afin d'assurer leur fonction dans la réponse immunitaire innée pro-inflammatoire (Andonegui, Kerfoot et al. 2005).

1.3.4 Superfamille des immunoglobulines

1.3.4.1 GPVI

Le récepteur GPVI à tyrosine kinase est l'un des membres les plus importants de la superfamille des immunoglobulines (Ig) dans les plaquettes et comprend deux domaines Ig extracellulaires. En plus de l' $\alpha_2\beta_1$, le GPVI constitue un autre récepteur du collagène. Il est constitutivement exprimé à la surface des plaquettes et des mégacaryocytes sous forme de complexe non covalent avec la chaîne γ commune aux récepteurs des Ig (FcR γ) (Tsuji, Ezumi et al. 1997). La voie de signalisation couplée au complexe GPVI-FcR γ consiste en une cascade de phosphorylations sur tyrosine par des kinases de la famille des Src (Lyn et Fyn) (Bridson and Watson 1999) et fait intervenir la PI 3-kinase et des protéines adaptatrices (LAT, SLP-76 et SLP-130). Elle aboutit à l'activation de la PLC γ 2 qui va ensuite, en catalysant la PIP $_2$, produire de l'IP3 et du DAG, responsables, respectivement, de l'augmentation en calcium intracellulaire et l'activation de certains isoformes de la PKC (Blake, Schieven et al. 1994), avec pour conséquences, le changement de forme, la sécrétion granulaire et l'agrégation des plaquettes.

Il a reporté que l'interaction GPVI-fibrine pourraient constituer une voie alternative d'agrégation en cas d'absence de l'intégrine GPIIb/IIIa (Soslau, Class et al. 2001). Récemment, une étude réalisée *in vivo* dans un modèle de thrombose artérielle a montré que les interactions GPVI-fibrine pourraient conduire à la croissance du thrombus. En effet, cette interaction GPVI-fibrine semble favoriser le recrutement des plaquettes en cas d'une thrombose veineuse (Mammadova-Bach, Ollivier et al. 2015).

1.3.4.2 FcγRIIA

Le récepteur FcγRIIA est un autre récepteur à tyrosine kinase (RTK) de 40 kDa appartenant à la famille des immunoglobulines G (IgG). Ce sont les seuls récepteurs aux fragments Fc des IgG présents à la surface plaquettaire. La liaison d'anticorps par leur partie Fc agrégés ou de complexes immuns déclenche l'activation des plaquettes par un mécanisme comparable à celui du récepteur GPVI, caractérisé par un changement de forme, une sécrétion des granules ainsi qu'une agrégation plaquettaire (Anderson, Chacko et al. 1995).

1.4 Fonctions des plaquettes

1.4.1 Adhésion plaquettaire

Puisque la principale fonction des plaquettes est l'hémostase, il n'est pas surprenant que ces cellules soient dotées d'une multitude de récepteurs adhésifs (molécules d'adhésion), leur permettant d'adhérer, dans un premier temps, à l'endothélium et d'interagir avec d'autres plaquettes afin de former un clou hémostatique, stoppant rapidement l'hémorragie. Dans un deuxième temps, les plaquettes participent à la formation du thrombus, qui se met en place afin de permettre la réparation de l'endothélium. L'analyse des différentes molécules d'adhésion plaquettaire a permis une compréhension plus approfondie du rôle et des mécanismes exacts par lesquels les plaquettes participent à l'hémostase physiologique, mais aussi à la thrombose pathologique (Clemetson 1995).

L'adhésion plaquettaire est la première étape de l'hémostase et la thrombogénèse, et n'est enclenchée que suite à une lésion vasculaire. Dans les conditions physiologiques où la paroi des vaisseaux est intacte, les plaquettes inactives circulent dans le sang sans adhérer à l'endothélium. Cette propriété de thrombo-résistance revient à la nature de l'endothélium et à sa capacité de sécréter diverses substances inhibitrices de l'activité plaquettaire comme le monoxyde d'azote (NO), le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (pour *Endothelium-Derived Relaxing Factor*, EDRF), la prostacycline (PGI₂) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (pour *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*, EDHF) (Andrews, Lopez et al. 1997).

Suite à une lésion endothéliale, les composantes de la matrice extracellulaire, notamment le collagène, sont exposées à la lumière du vaisseau, et les plaquettes peuvent, par la suite, entrer en contact avec ces composantes et adhérer fermement aux sites de lésion. Le processus de l'adhésion plaquettaire est assuré par trois molécules d'adhésion plaquettaire principales; le complexe GPIb-IX-V et les récepteurs au collagène le GPVI et l' $\alpha2\beta1$ (GPIa/IIa). Le tableau 1.1 regroupe les différents récepteurs impliqués dans le recrutement, l'adhésion et l'agrégation plaquettaires, ainsi que leurs ligands physiologiques.

Tableau 1.1: Récepteurs plaquettaires impliqués dans le recrutement, l'adhésion et l'agrégation plaquettaires

Récepteurs	Familles	Ligands	Commentaires
Initiation du recrutement plaquettaire			
GPIIb-IX-V	Récepteurs riches en leucine	VWF, thrombine, FXI, FXII, P-sélectine, Mac-1, TSP-1	Syndrome de Bernard-Soulier
Adhésion et agrégation plaquettaires			
GPVI	Superfamille des Ig Intégrines	Collagène	
$\alpha 2\beta 1$		Collagène	
$\alpha 5\beta 1$		Fibronectine	
$\alpha 6\beta 1$		Laminine	
$\alpha v\beta 1$		Vitronectine, fibrinogène, VWF	Thrombasthénie de Glanzmann
$\alpha IIb\beta 3$		Fibrinogène, fibrine, VWF, TSP-1, fibronectine,	
CD148	Tyrosine phosphatase	vitronectine	Régulation du GPVI
CLEC-2	Récepteur de lectine type-C	Inconnu Podoplanine	

1.4.1.1 Axe von Willebrand-GPIIb plaquettaire

Dans des conditions de flux élevés, l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale est sous dépendance de l'interaction du complexe GPIIb-IX-V au VWF. Ce dernier circule librement dans le sang sous une forme inactive, incapable de lier le complexe GPIIb-IX-V. Il est aussi contenu dans des granules de sécrétion des cellules endothéliales (corps de Weibel-Palade) (Jaffe, Nachman et al. 1973) et des plaquettes (granules alpha) (Cramer, Meyer et al. 1985), et peut donc être libéré en grande quantité suite à leur activation.

Suite à une lésion de l'endothélium vasculaire, la matrice sous-endothéliale, composée essentiellement de laminine et de collagène, est exposée. Le VWF change alors de conformation et prend une forme active capable de se lier au collagène de la matrice sous-endothéliale, pour ensuite interagir avec le complexe GPIb-IX-V (Uff, Clemetson et al. 2002), (Hassan, Saxena et al. 2012). En effet, le VWF immobilisé par le collagène est reconnu par le complexe glycoprotéique GPIb-IX-V présent à la surface des plaquettes, ce qui va permettre, dans un premier temps, le ralentissement et l'adhérence des plaquettes à la matrice exposée (Savage, Saldivar et al. 1996). L'interaction initiale VWF- GPIb-IX-V est essentielle, car elle permet l'ancrage de la plaquette sur la matrice, même lorsque les forces de cisaillement sont très élevées, comme dans les artérioles. La ferme association entre le récepteur et le cytosquelette, *via* la filamine 1, va permettre la formation d'extensions membranaires qui vont ralentir et maintenir la plaquette à proximité de la matrice, permettant la fixation d'autres complexes comme le GPIb-IX-V, et menant à l'immobilisation et à l'adhérence de la plaquette à la matrice sous-endothéliale (Dopheide, Maxwell et al. 2002), (Williamson, Pikovski et al. 2002).

Le complexe GPIb-IX-V semble être impliqué également dans l'adhésion des leucocytes aux surfaces de plaquettes déjà adhérees, *via* l'interaction GPIb α et l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ des leucocytes, par l'intermédiaire de Mac-1 (pour *Macrophage Antigen-1* ; figure 1.5) (Simon, Chen et al. 2000). Finalement, il a été démontré que les plaquettes peuvent rouler sur un endothélium activé; phénomène qui serait dépendant de l'interaction GPIb α des plaquettes et de la P-sélectine endothéliale (figure 1.5) (Romo, Dong et al. 1999), (Berndt, Shen et al. 2001).

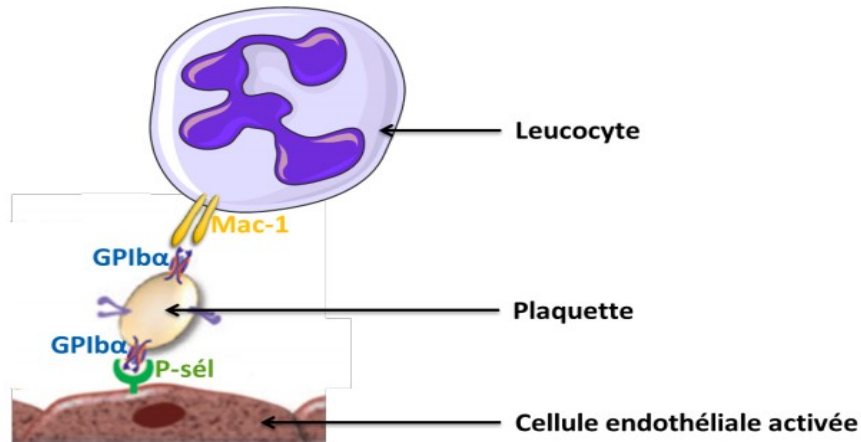


Figure 1.5: Interactions du GPIb α avec les leucocytes et les cellules endothéliales. (Modifié d'après Kaplan et Jackson. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011).

1.4.1.2 Adhésion dépendante du collagène

La liaison GPIb α -VWF représente un contact plus ou moins ferme entre les plaquettes et la matrice, mais demeure absolument essentielle. En effet, elle permet le ralentissement des plaquettes et la liaison subséquente du collagène de la matrice avec ses récepteurs plaquettaire le GPVI et le GPIa/IIa (Saelman, Nieuwenhuis et al. 1994), (Savage, Almus-Jacobs et al. 1998), (Jung and Moroi 2000). Ce dernier contact est de nature ferme et assure une immobilisation complète des plaquettes sur la surface endommagée. L'activation du récepteur GPIa/IIa induit l'activation des Src et de Syk, pour ensuite activer la PLC γ 2 et la mobilisation du calcium ainsi que la formation de filopodes et de lamellipodes (Inoue, Suzuki-Inoue et al. 2003). Toutefois, la signalisation induite par le récepteur GPIa/IIa dans les plaquettes est relativement modeste. GPVI joue un rôle déterminant dans l'adhésion au collagène fibrillaire (Miura, Takahashi et al. 2002) et représente le récepteur du collagène le plus efficace dans l'activation de la signalisation intracellulaire (Nieswandt and Watson 2003).

Pour résumer la section 4 de ce chapitre, le schéma plus bas de la figure 1.6 illustre la cascade d'activation des plaquettes conduisant à la formation d'un clou hémostatique. L'adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire sous-endothéliale (ECM) *via* GPIb-IX-V et GPVI, ou leur activation par les agonistes solubles *via* les récepteurs GPCR, induit la sécrétion de

molécules bioactives contenues dans les granules α et denses, qui peuvent ensuite agir sur la plaquette elle-même (activation autocrine) ou sur de nouvelles plaquettes (activation paracrine). Cette signalisation « *inside-out* » déclenchée suite à l'activation des plaquettes provoque également l'activation des intégrines α Ib β 3, ce qui va conduire à la formation d'un agrégat plaquettaire et vient enfin la cascade de coagulation pour assurer la stabilisation du thrombus (Golebiewska and Poole 2015).

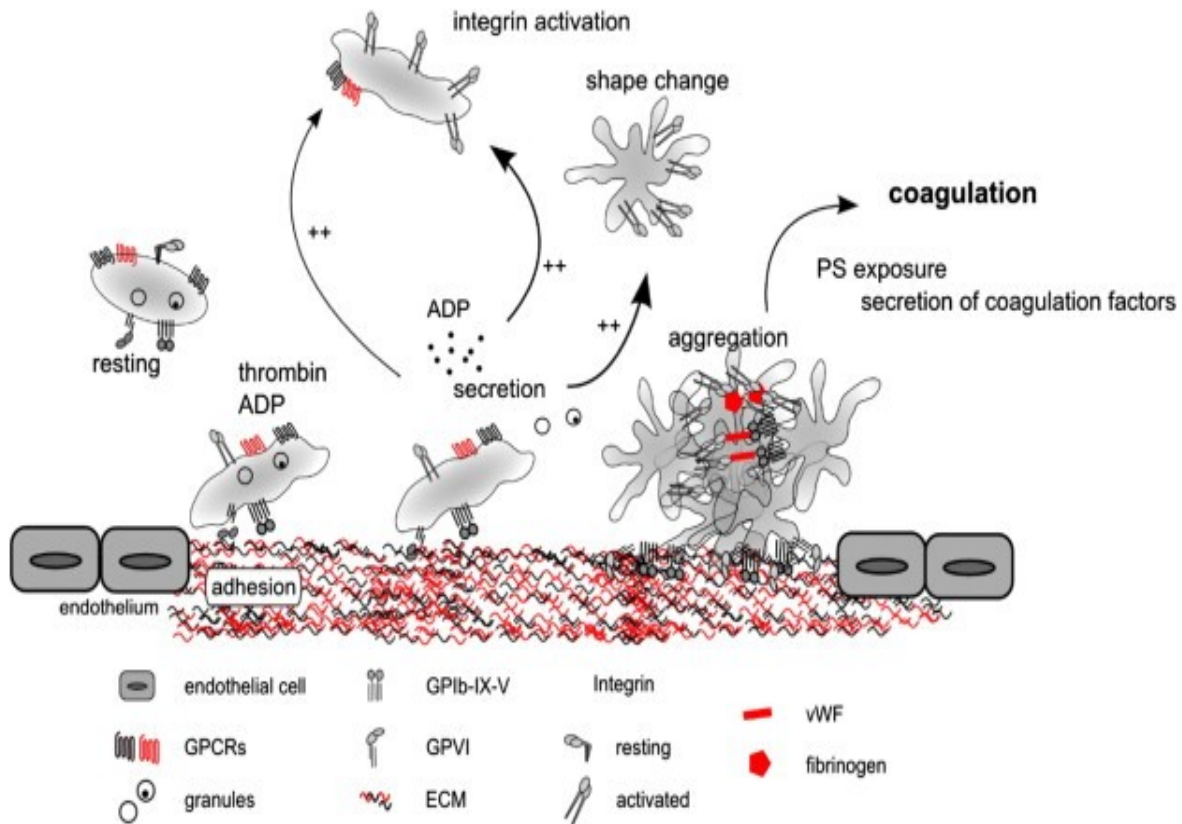


Figure 1.6: Cascade d'activation des plaquettes conduisant à la formation d'un clou hémostatique. (Golebiewska EM et Poole AW. *Blood Rev.* 2015).

1.4.2 Activation plaquettaire par les agonistes solubles

1.4.2.1 ADP

Les interactions de premier (GPIb α -VWF) et second (collagène aux GPIa/IIa et GPVI) contact entre les plaquettes et la matrice sous-endothéliale non seulement permettent l'adhésion des cellules, mais sont aussi responsables de l'activation plaquettaire. En effet, suite à leur

adhésion aux surfaces de lésion, les plaquettes changent de forme et sécrètent plusieurs substances, dont l'ADP et l'ATP présentes en grandes concentrations dans les granules denses, facilitant ainsi le recrutement et l'activation des plaquettes environnantes (et aussi simultanément dans une boucle autocrine), ce qui va conduire à l'amplification de l'activation plaquettaire.

L'ADP active ses deux récepteurs purinergiques couplés aux protéines G, P2Y₁ et P2Y₁₂ (Jantzen, Gousset et al. 1999), (Hollopeter, Jantzen et al. 2001). L'activation de P2Y₁ induit la mobilisation du calcium intracellulaire, indispensable au changement de forme plaquettaire, à la sécrétion des granules et à leur agrégation (Fabre, Nguyen et al. 1999), (Leon, Vial et al. 1999), alors que le P2Y₁₂, en inhibant permet l'adénylate cyclase, une enzyme responsable de la production de l'AMPc, permet la diminution des niveaux intracellulaires d'AMP cyclique (AMPc), un puissant inhibiteur de l'activation plaquettaire (Salzman and Weisenberger 1972). Il est important de noter que l'ADP est considérée comme un agoniste relativement faible des plaquettes et nécessite alors l'activation conjointe de ses deux récepteurs.

1.4.2.2 Thrombine

La thrombine, produite à la surface des plaquettes activées à partir de la prothrombine, joue un rôle majeur dans l'hémostase. C'est l'activateur le plus puissant des plaquettes et aussi l'élément pivot de la voie finale de la cascade de la coagulation en convertissant le fibrinogène en fibrine pour la consolidation du thrombus, et en activant le facteur XIII qui devient le XIIIa, qui stabilise la fibrine par des liaisons covalentes (Fenton 1995). Au niveau plaquettaire, elle agit par l'intermédiaire de ses récepteurs couplés également aux protéines G, les PARs (Coughlin 2000), (Coughlin 2005). La thrombine peut également lier (sans activité enzymatique) le récepteur GPIIb α sur un site de fixation spécifique, mais une voie de signalisation découlant de cette liaison et menant à l'activation des plaquettes, n'est pas très clairement établie (De Marco, Mazzucato et al. 1994). Comme mentionné précédemment, le mécanisme d'activation des PARs (PAR-1 et PAR-4) par la thrombine nécessite l'activité protéase de celle-ci. Elle clive en effet l'extrémité N-terminale extracellulaire du récepteur, et la nouvelle extrémité ainsi formée constitue son propre ligand (figure 1.7) (Vu, Wheaton et al. 1991). Cette génération de thrombine est suffisante pour initier la formation du thrombus et l'agrégation plaquettaire, et ce, en l'absence d'exposition de la matrice de collagène (Dubois, Panicot-Dubois et al. 2006). PAR-3 agit plutôt comme cofacteur

pour le clivage et l'activation de PAR-4 à de faibles concentrations de thrombine (figure 1.7) (Nakanishi-Matsui, Zheng et al. 2000).

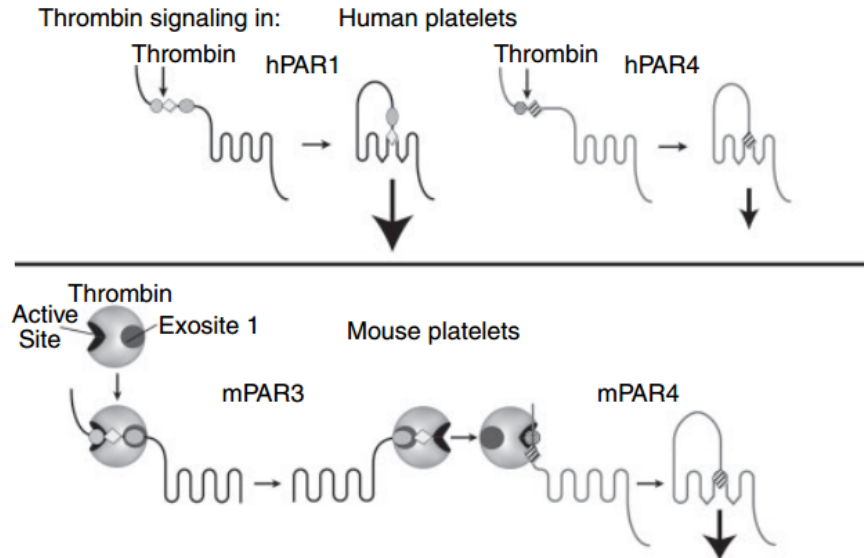


Figure 1.7: Représentation schématique de l'activation des récepteurs PARs dans les plaquettes humaines et murines. PAR: Protease-Activated Receptor (Coughlin SR. J Thromb Haemost. 2005).

1.4.2.3 Thromboxane A_2

Le TXA_2 est un membre de la famille des prostanoides dérivés de l'acide arachidonique. Sa synthèse se fait lors de l'activation plaquettaire après stimulation de la phospholipase A_2 , puis libéré probablement par diffusion membranaire. L'utilisation d'analogues stables du TXA_2 a permis de démontrer que l'activation de ses récepteurs TP couplés aux protéines G ($G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha 12/13}$) (Djellas, Manganello et al. 1999), induit l'activation la $PLC\beta$ qui va générer à son tour de l' IP_3 et du DAG, et par conséquent augmenter davantage les concentrations du calcium intracellulaire (Brass, Shaller et al. 1987). Ces événements favorisent l'activation plaquettaire, le changement de forme, la sécrétion et l'agrégation. Le tableau 1.2 rassemble les différents récepteurs plaquettaires impliqués dans la phase secondaire de l'amplification ainsi que leurs ligands.

Tableau 1.2: Récepteurs plaquettaires impliqués dans la phase d'amplification (Gresele P, Born V.R.G, Patrono C and Page P.C. *Antiplatelet agents*. Volume 210, Springer 2012).

Récepteurs	Famille	Ligands	Caractéristiques
P2Y1	Récepteurs couplés aux protéines G	ADP	Moyenne affinité
P2Y12		ADP	
PAR-1		Thrombine	Faible affinité
PAR-4		Thrombine	
TP α		TXA ₂	
Récepteur de PGE2 (EP3)		1- <i>O</i> -alkyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycero-	
Récepteur de PAF		3-phosphocholine	
Récepteur de chémokines		Chémokines	
Récepteur de sérotonine		Sérotonine (5-hydroxytryptamin)	
P2X1	Récepteurs à canaux ioniques	ATP	
Récepteur de leptine	Récepteurs à activité tyrosine kinase	Leptine	
Récepteur d'insuline		Insuline	
Récepteur de PDGF		PDGF	

1.4.3 Sécrétion plaquettaire

1.4.3.1 Formation des granules

La formation des granules α et denses ainsi que les lysosomes est initiée dès les stades précoces de maturation des mégacaryocytes et continue dans les plaquettes circulantes. En effet, le récepteur GPIIb/IIIa, le VWF et le facteur plaquettaire 4 (PF4), sont synthétisés dès le stade diploïde et sont considérés comme des marqueurs précoces de la différenciation en mégacaryocytes (Tomer 2004).

La formation des granules α se fait essentiellement grâce aux nombreux ARNm cytoplasmiques qui, après leur traduction, permettent la production de leur contenu, notamment les glycoprotéines. Cependant, les plaquettes contiennent d'autres constituants des granules α qui ne sont pas produits directement. Le fibrinogène, par exemple, est plutôt absorbé par endocytose (Raslova, Roy et al. 2003). Cependant, certains des constituants des granules denses, comme le cas de la sérotonine, sont recrutés à l'aide des transporteurs spécifiques (Humphrey and Toh 1954).

1.4.3.2 Constituants essentiels des granules

Les granules sont le principal réservoir intracellulaire de protéines destinées à être libérées au cours de l'hémostase primaire. Ce sont des structures sphériques ou allongées, entourées d'une membrane, qui contiennent des protéines plaquettaires spécifiques provenant d'une synthèse par le mégacaryocyte, et des protéines produites ou captées par la plaquette et/ou le mégacaryocyte.

Lors de l'activation, les plaquettes sécrètent plus de 300 substances actives à partir de leurs granules intracellulaires. Les composants de granules denses, tels que l'ADP et les polyphosphates, contribuent à l'hémostase et la coagulation, mais jouent également un rôle dans les métastases du cancer (Golebiewska and Poole 2015). Par ailleurs, les granules α contiennent de multiples cytokines, des mitogènes, des facteurs pro et anti-inflammatoires et d'autres molécules bioactives jouant un rôle important dans la progression de la formation du thrombus (Golebiewska and Poole 2015). Le tableau 1.3 regroupe les principaux constituants de ces granules ainsi que leurs caractéristiques générales.

Tableau 1.3: Principaux constituants et fonctions des granules plaquettaires (Michelson A.D. (2013). *Platelets*. Third Edition. Academic Press. pp. 344).

Type	Constituants	Fonctions générales
Granules alpha	Glycoprotéines (α Ib β 3, GPIb/IX/V, GPVI, TLT-1, P-sélectine)	
	Coagulants, anticoagulants et protéines fibrinolytiques (facteur V, facteur IV, facteur XIII, antithrombine, plasminogène...)	
	Protéines d'adhésion (fibrinogène, VWF, thrombospondine)	Hémostase/thrombose
	Chémokines (IL-8, RANTES, PF4, SDF-1 α ...)	Inflammation Angiogenèse
	Facteurs de croissance (épidermique, hépatocytaire...)	Mitogenèse Réponse Immunitaire
	Médiateurs immunitaires (facteur D, facteur H, inhibiteur de C1, IgG...)	
Granules denses	Cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+)	
	Phosphates (polyphosphate, pyrophosphate)	
	Amines bioactifs (sérotonine, histamine)	Hémostase/thrombose Inflammation
	Nucléotides (ADP, ATP, UTP, GTP)	
Lysosomes	Carboxypeptidase	
	Phosphatase acide	Digestion des endosomes
	Cathepsine D et E	

1.4.3.3 Mécanisme de la sécrétion: Fusion et relâche

Les plaquettes activées libèrent leurs contenus granulaires de façon chronologique. En premier lieu, les constituants des granules α sont relâchés, puis ceux des granules denses et enfin

ceux des lysosomes. Les invaginations membranaires profondes dont la plaquette dispose lui permettent d'être en contact permanent avec le milieu extracellulaire. C'est ainsi que le système caniculaire ouvert (SCO), connecté à la membrane, joue un rôle dans l'endocytose de molécules d'origine plasmatisque et dans la relâche des contenus des granules plaquettaires après la fusion de ces derniers avec la membrane, ainsi que dans la translocation de certaines protéines, comme la P-sélectine, du cytoplasme à la surface des plaquettes.

1.4.4 Agrégation plaquettaire

L'agrégation est la principale conséquence de l'activation plaquettaire. Elle est sous dépendance de l'intégrine GPIIb/IIIa (ou α IIb β 3) qui, une fois activée, lie le fibrinogène qui sert de pont entre les plaquettes liées au sous-endothélium, mais aussi avec des plaquettes nouvellement recrutées (Li, Delaney et al. 2010). Le fibrinogène devient alors un substrat adhésif capable de recruter les autres plaquettes adjacentes aux agrégats. La concentration de l'intégrine GPIIb/IIIa au niveau membranaire ainsi que son affinité pour les ligands solubles notamment le fibrinogène, augmentent après avoir subi un changement conformationnel dû à une signalisation « *inside-out* » (Parise 1999). L'intégrine GPIIb/IIIa peut lier également le VWF pour améliorer l'adhésion des plaquettes. Par ailleurs, l'interaction de l'intégrine Fibrinogène- GPIIb/IIIa stabilise l'agrégation grâce à la signalisation « *outside-in* » (Parise 1999). La figure 1.8 montre comment le fibrinogène participe dans la formation de l'agrégat plaquettaire.

L'agrégation est ensuite renforcée par les agonistes plaquettaires solubles stockés dans les granules denses (ADP, sérotonine, épinéphrine...) ou nouvellement synthétisés (Platelet Activating Factor, TXA₂...) qui sont relâchés lors de l'activation plaquettaire (figure 1.8). L'agrégation plaquettaire est aussi à l'origine d'une activité pro-coagulante par les thrombocytes (Jackson 2007). Ce mécanisme consiste en la régulation de la distribution des phospholipides membranaires. *In fine*, un réseau de fibrine formé suite à l'activité pro-coagulante des plaquettes consolidera l'agrégat plaquettaire.

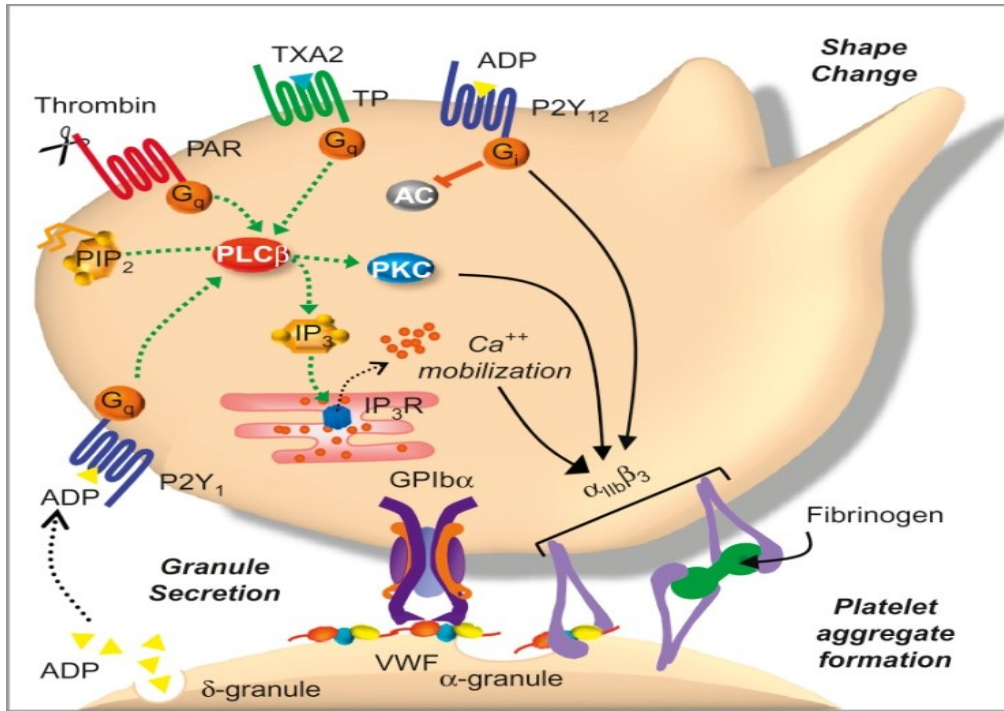


Figure 1.8: Formation de l'agrégat plaquettaire et co-stimulation des plaquettes par les agonistes solubles. (Michelson A.D. (2013). *Platelets*. Third Edition. Academic Press. pp. 409).

1.5. Mécanismes signalétiques des plaquettes

Les plaquettes sont de petits éléments cellulaires de toute première importance dans la physiopathologie vasculaire. Le fait qu'elles soient anucléées leur confère une caractéristique qui leur est propre: des mécanismes de signalisation intracellulaire, pour remplir leur fonction, sont indispensables. Du changement de forme à l'agrégation, en passant par l'activation et la sécrétion, la signalisation intracellulaire est au cœur de tout processus physiologique plaquettaire.

Les plaquettes humaines possèdent une multitude de récepteurs membranaires. Une fois qu'elles sont recrutées à la paroi du vaisseau endommagé, les plaquettes s'activent et les principaux facteurs de cette activation plaquettaire comprennent des événements de signalisation qui se produisent en aval des récepteurs de collagène (GPVI), de thrombine (PAR-1, PAR-4 et GPIb α), de l'ADP (P2Y₁ et P2Y₁₂) et de TXA₂ (TP) (Figure 1.9).

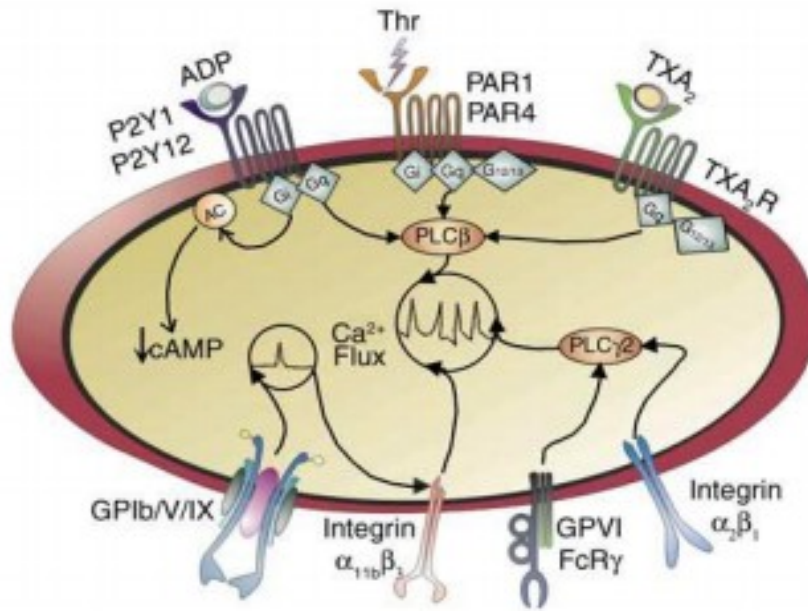


Figure 1.9: Mécanismes signalétiques de la régulation du calcium intracellulaire suite à l'activation des récepteurs plaquettaires. (Jackson *et al.* *J Thromb Haemost.* 2003).

Le type de signal déclenché ainsi que le comportement des plaquettes dépendent de la nature et de la concentration de l'agoniste. D'une manière générale, l'activation des plaquettes par un agoniste commence par l'activation de l'un des isoformes de la PLC qui, par hydrolyse de PIP_2 , produit le second messager IP_3 , essentiel pour l'augmentation du calcium intracellulaire. Bien que les mécanismes de signalisation plaquettaire soient sous la dépendance de la nature et du contexte de stimulation, les plaquettes sont généralement amenées à remplir leur fonction de base, celle de former un clou hémostatique.

Dans le chapitre suivant, la signalisation déclenchée par le récepteur $GPIIb/IIIa$ en réponse à différents stimuli sera décrite en détail.

1.6 Plaquettes et athéro-thrombose

L'athérosclérose constitue la première étape des complications athéro-thrombotiques. Il s'agit d'une maladie inflammatoire systémique chronique de la paroi des vaisseaux qui se développe particulièrement dans les artères de gros et moyen calibre (aorte, artères carotides, artères coronaires et artères des membres inférieurs) sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux (Lindemann, Kramer *et al.* 2007). Bien que les monocytes soient impliqués

dans l'athérosclérose, il est maintenant clair que les plaquettes participent activement à toutes les facettes de cette pathologie, soit l'initiation, la progression et la stabilité de la plaque d'athérome (Ross 1999), (Huo and Ley 2004), (Weber 2005), (Nieswandt, Aktas et al. 2005).

L'adhésion des plaquettes à la paroi des vaisseaux coïncide avec l'expression de plusieurs molécules d'interaction à la surface des cellules endothéliales activées, notamment ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine ou P-sélectine, ainsi qu'avec une sécrétion de chémokines comme MCP-1 et IL-8, favorisant ainsi la réaction inflammatoire à l'origine du développement de la plaque d'athérome (Gawaz, Brand et al. 2000). Suite à leur adhésion, les plaquettes sécrètent, à leur tour, plusieurs substances inflammatoires pro-athérogéniques comme IL-1 β , CD40L, P-sélectine, PF4 et RANTES qui vont participer également dans la formation de la plaque athérosclérotique (Fuentes, Fuentes et al. 2013) (figure 1.10).

Les plaquettes, par l'intermédiaire de leur récepteur GPIb α , sont également capables d'interagir avec l'intégrine leucocytaire α M β 2 (Mac-1) aux sites athérosclérotiques (Simon, Chen et al. 2000, Weber 2005), avec comme conséquence la relâche de facteurs autocrines et paracrines qui contribuent à la progression d'événements inflammatoires (May, Seizer et al. 2008).

Les interactions plaquette-leucocytes se font par une reconnaissance P-sélectine plaquettaire /PSGL-1 exprimé sur le leucocyte, entraînant une activation leucocytaire (Manka, Forlow et al. 2004). Il fut démontré d'ailleurs que le recrutement des leucocytes aux sites athérosclérotiques est largement supérieur en présence de plaquettes adhérees à l'endothélium qu'en absence de celles-ci (Huo, Schober et al. 2003).

Finalement, les plaquettes interviennent pleinement, après la rupture de la plaque, dans la thrombose vasculaire suite à l'exposition du collagène de la matrice sous-endothéliale, donnant ainsi naissance au SCA.

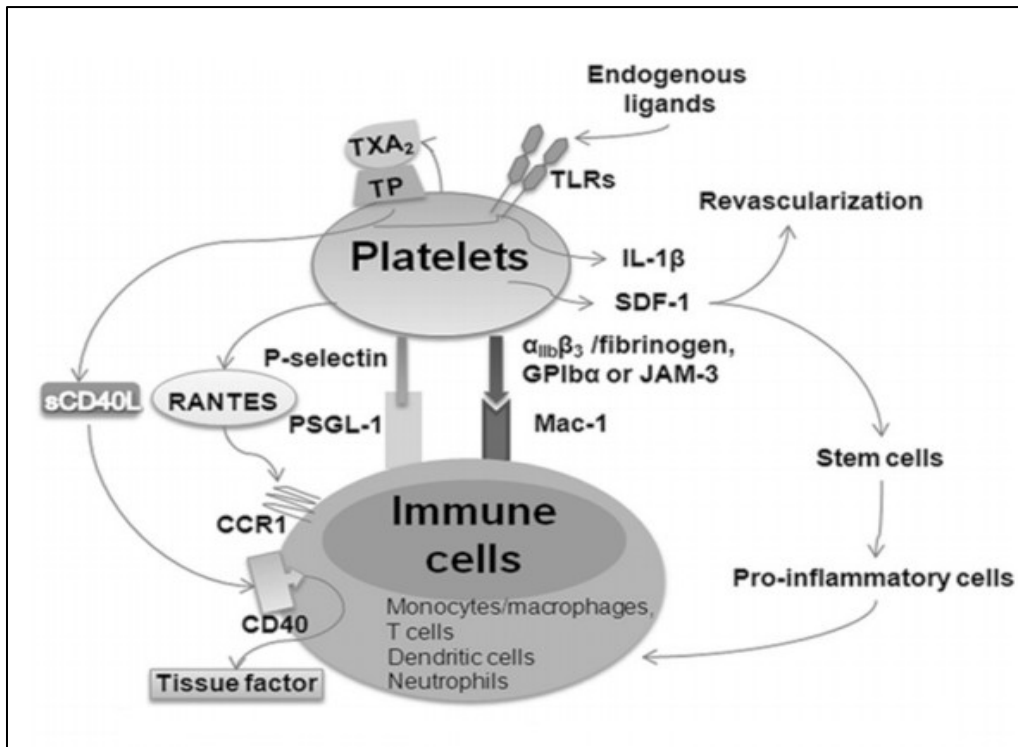


Figure 1.10: Rôle des plaquettes dans la réponse inflammatoire vasculaire associée à l'athérosclérose. (Fuentes Q E *et al. Platelets*. 2013).

La survenue de ces complications athéro-thrombotiques pourrait généralement constituer une source d'embolies vasculaires. En effet, à peu près 80% des accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont dus à une ischémie cérébrale vasculaire (type ischémique), suite à une occlusion artérielle, alors que seulement 20% des AVCs proviennent d'une hémorragie intracérébrale (type hémorragique) (Feigin, Lawes *et al.* 2003), (Prospective Studies, Lewington *et al.* 2007).

Puisque la grande majorité des AVCs sont secondaires à une occlusion artérielle, les plaquettes occupent un rôle central dans la physiopathologie de cette complication. Plusieurs observations expérimentales et cliniques pointent vers l'importance des plaquettes dans la pathogénèse des AVCs. Une présence de plaquettes activées et d'agrégats composés principalement de plaquettes et de leucocytes dans la zone ischémique des ganglions de la base dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le singe a été enregistrée (Okada, Copeland *et al.* 1994). Par ailleurs, il a été dénoté une augmentation des concentrations plasmatiques de nombreux composants plaquettaires, notamment le PF4 et la thrombospondine (Zeller, Tschoepe

et al. 1999). De plus, une forte cumulation d'agrégats plaquettaires dans les artères qui irriguent le cerveau, telles que les carotides a été observée (Steinman, Poepping et al. 2000).

En outre, l'efficacité des agents anti-plaquettaires, tels que l'aspirine et le clopidogrel dans le traitement et la prévention des AVCs ne laisse aucun doute quant au rôle déterminant des plaquettes dans les AVCs (Stoll, Kleinschnitz et al. 2008).

1.7. Antiplaquettaires actuels, en cours de développement et cibles thérapeutiques

Les antiplaquettaires sont des médicaments indiqués dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques. **L'aspirine** est le pilier du traitement à la phase aiguë et de la prévention secondaire à long terme contre des accidents cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral (AVC)...). L'indication à la prévention primaire se limite par contre aux patients ayant d'autres facteurs de risque, de même qu'à ceux en fibrillation auriculaire et ayant un faible risque d'AVC. En effet, après avoir été absorbée par l'estomac et le duodénum, l'aspirine agit sur la plaquette en acétylant une sérine (située en position 529) de COX-1, ce qui va inhiber de façon irréversible cette enzyme et empêchera ainsi la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine intermédiaire (PGH₂) qui normalement est convertie en TXA₂, un puissant vasoconstricteur et activateur plaquettaire (Patrono, Collier et al. 2004).

Le clopidogrel, appartenant à la famille des thiényridines, est un antiagrégant plaquettaire qui bloque irréversiblement la liaison de l'ADP à son récepteur spécifique sur la plaquette, le P2Y₁₂ (Quinn and Fitzgerald 1999). Ainsi l'antagonisme de ce récepteur prévient-il la dégranulation plaquettaire, qui produit des médiateurs prothrombotiques et inflammatoires à partir des plaquettes, et inhibe également l'activation ADP-dépendante de la GPIIb/IIIa.

Le clopidogrel est inactif *in vitro*, car il s'agit d'une prodrogue qui, pour être efficace, doit être métabolisée dans le foie par différents cytochromes, notamment le cytochrome hépatique p450. En revanche, le récepteur P2Y₁ n'est pas affecté par une prise de clopidogrel et donc conserve sa capacité à initier l'agrégation plaquettaire.

Le clopidogrel offre un avantage supplémentaire dans le syndrome coronarien aigu, surtout après implantation de stents. Actuellement, le clopidogrel est préféré après implantation de stents nus pendant trois mois, et au moins six mois à un an en association à l'aspirine après implantation de stents à élution. Hors de ces indications, le clopidogrel n'a qu'un avantage minime sur l'aspirine, l'association de ces deux substances n'est pas recommandée de routine en prévention secondaire, en raison de ses complications hémorragiques et de l'insuffisance de leur synergie. Le clopidogrel a en outre une indication de classe I en cas d'intolérance à l'aspirine et d'AVC sous aspirine (Neuhaus, Steffel et al. 2008).

Comme le clopidogrel, le **prasugrel** est une prodrogue d'abord hydrolysée, puis métabolisée par le cytochrome P450 dans sa forme active. Cependant cette biotransformation ne nécessite qu'une seule étape en comparaison des deux étapes du clopidogrel, ce qui fait que son action est beaucoup plus rapide (Jakubowski, Winters et al. 2007). Il est cependant, beaucoup moins sensible aux variations du fonctionnement de ce cytochrome que le clopidogrel (Farid, Payne et al. 2007). Le **ticagrelor** fait partie d'une nouvelle classe d'antiagrégants plaquettaires, les cyclopentyl-triazolo-pyrimidines (CPTP) (Husted and van Giezen 2009), (Teng and Butler 2010). Ce médicament, qui n'est pas une prodrogue, a la propriété d'être un antagoniste direct des récepteurs P2Y₁₂ à l'ADP mais de façon réversible. Ceci est dû à sa demi-vie relativement courte (6 à 12 heures). Un autre médicament de la famille des CPTP est le **cangrelor** qui est un analogue intraveineux réversible de l'ATP dont l'action est ultra rapide, avec une demi-vie de cinq minutes, *versus* plusieurs heures pour le clopidogrel.

Le **dipyridamole** est également un agent antiplaquettaire et est utilisé comme vasodilatateur coronarien dans l'angine de poitrine. Bien qu'il semble inhiber la capture d'adénosine par les thrombocytes (Neuhaus, Steffel et al. 2008), son mécanisme d'action reste encore mal élucidé. La dipyridamole appartient à la famille des inhibiteurs de la phosphodiesterase (PDE), une enzyme impliquée dans la dégradation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), ce qui a pour conséquence une augmentation de la concentration locale d'adénosine, une stimulation de l'adénylate-cyclase et une augmentation de la concentration de l'AMPc. Cette dernière empêche la mobilisation du calcium libre qui est essentielle à l'activation plaquettaire (Sudlow 2005).

L'activité antiplaquettaire du dipyridamole est cependant moindre que celle de l'aspirine et des antagonistes des récepteurs de l'ADP. De plus, son action sur la PDE est complètement réversible et dure environ 24 heures (Lenz and Hilleman 2000).

Le cilostazol est un inhibiteur des PDE-3 métabolisé par le système des cytochromes microsomaux hépatiques p450 (3A4, 2C9) et dont les métabolites sont excrétés par les urines. Son effet antiagrégant se manifeste par une augmentation des concentrations de nucléotides cycliques intraplaquettaires, due au blocage de l'externalisation de la P-sélectine membranaire. Bien que faisant partie des molécules antiagrégantes, le cilostazol présente une discordance entre ses effets inhibiteurs de l'activation plaquettaire (diminution de l'expression de la P-sélectine membranaire) et son inefficacité dans l'allongement du temps de saignement. Le cilostazol a néanmoins démontré son efficacité après angioplastie coronaire en association à l'aspirine et au clopidogrel.

L'iloprost est un analogue de la prostacycline (PGI₂) indiqué actuellement dans l'ischémie sévère des membres inférieurs. Ses propriétés pharmacodynamiques incluent l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, de l'adhésion et de la sécrétion plaquettaires, la vasodilatation et la diminution de la libération de radicaux libres d'oxygène (Ozat, Gungor et al. 2009).

Les anti-IIb/IIIa sont les seuls à mériter le terme 'antiagrégant', puisqu'ils inhibent l'interaction des résidus RGD en position γ 400-411 du fibrinogène avec leur récepteur plaquettaire, la glycoprotéine IIb/IIIa exprimée sur les plaquettes activées. L'agrégation est donc inhibée quel que soit l'activateur. On distingue **l'abciximab** qui est un anticorps monoclonal murin dirigé contre le récepteur de la GP IIb/IIIa. La majorité (80%) de ces récepteurs sont liés après deux heures et l'agrégation plaquettaire est totalement inhibée; la fonction plaquettaire se rétablit partiellement après environ 48 heures (Neuhaus, Steffel et al. 2008).

Enfin, plusieurs voies prometteuses de développement de nouvelles molécules antiagrégantes (notamment les inhibiteurs de PARs, les anti-PSGL1 et les anti-Tp) ont d'ores et déjà montré un excellent profil de tolérance (Bellemain, Collet et al. 2008). Plusieurs de ces molécules sont en

cours de développement, avec des phases précliniques prometteuses sur l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et des effets additifs antiathéroscléreux.

Le **RWJ-58259** est une petite molécule qui possède une action spécifique sur les récepteurs PAR-1, et qui a montré une inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine, une inhibition de la signalisation calcique et de la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi qu'une prévention de la resténose induite par un ballon d'angioplastie *in vivo* chez le rat (Bellemain, Collet et al. 2008).

Le **SCH 530348** est un produit révolutionnaire. Il s'agit d'un antagoniste oral du récepteur PAR-1. Lors des études de phase II, il a été démontré qu'il n'augmentait pas le taux de saignement comparativement au placebo et qu'il était capable de diminuer significativement le taux d'infarctus du myocarde ainsi que le taux d'avènement d'autres complications cardiovasculaires majeures chez les patients ayant subi une angioplastie (Becker, Moliterno et al. 2009).

L'affinité P-sélectine/PSGL-1 permet de lier les microparticules circulantes porteuses de facteurs tissulaires qui, concentrés à la surface des plaquettes activées, accélèrent la cascade de coagulation et la formation de thrombi plaquettaires. L'inhibition de cette voie est donc d'actualité, et bien que l'effet anti-inflammatoire de l'antagoniste de la P-sélectine (**rPSGL-Ig** pour Recombinant P-Selectin Glycoprotein Ligand-Immunoglobulin) n'ait pas montré d'efficacité associée à la thrombolyse dans les infarctus du myocarde ST+ en termes de régression du segment ST, de reperfusion et de récupération de la fonction VG, des études à visée antiagrégante sont depuis quelques années envisagées (Bellemain, Collet et al. 2008).

La liaison du VWF au GPIIb α plaquettaire est une autre voie qui suscite l'intérêt de plusieurs chercheurs. Un antagoniste de cette voie a été développé, le **GPG-290**, qui est une protéine recombinante formée de deux acides aminés de la portion N-terminale du GPIIb α couplé au segment Fc d'un IgG1 humain muté. Une étude a démontré que le blocage de l'interaction GPIIb α -VWF par le GPG-290 est une stratégie efficace pour prévenir la formation du thrombus

occlusif sans pour autant induire une augmentation dans le temps de saignement (Hennan, Swillo et al. 2006) (Wadanoli, Sako et al. 2007).

La figure 1.11 résume toutes les cibles moléculaires des agents antiplaquettaires identifiées jusqu'à présent.

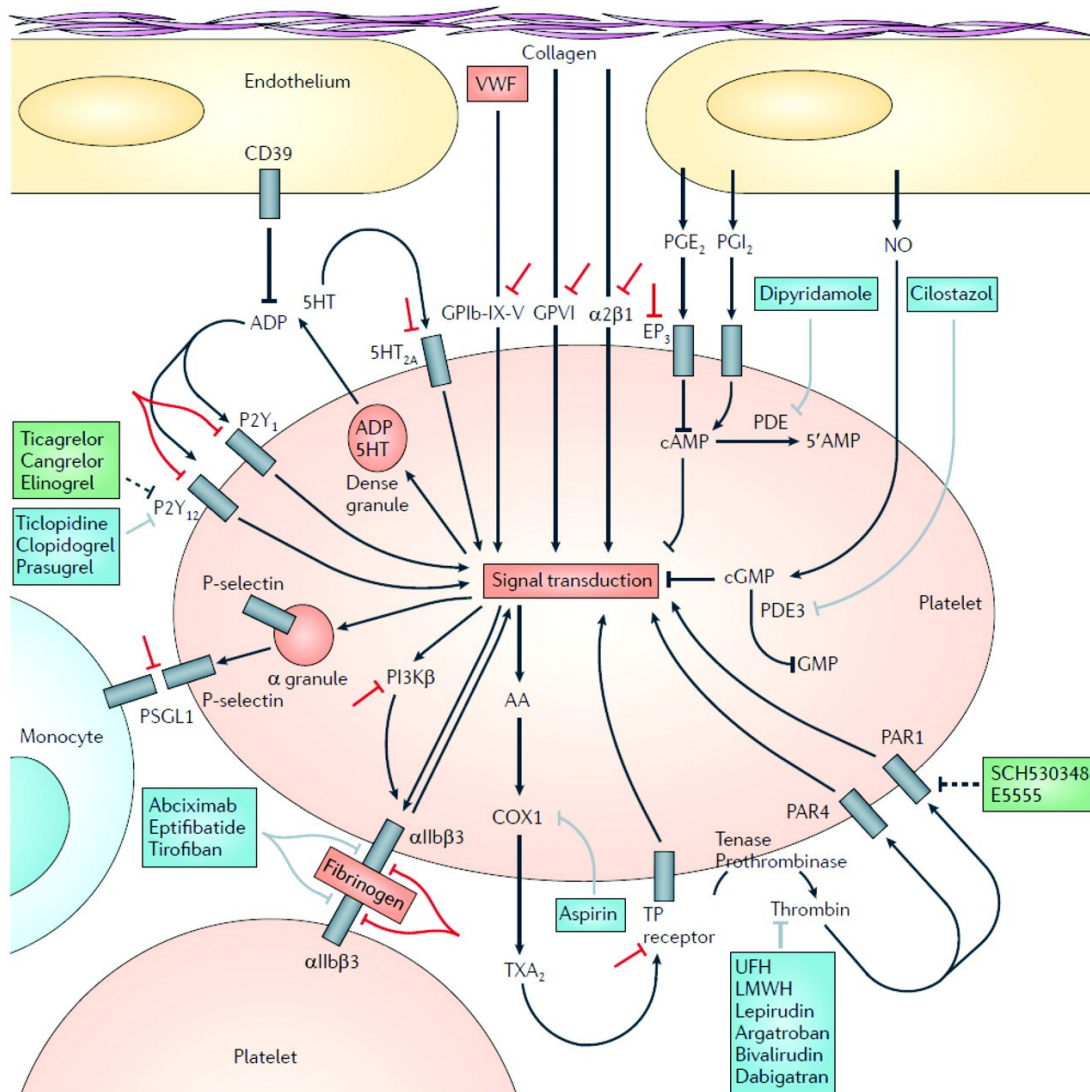


Figure 1.11: Cibles moléculaires des agents antiplaquettaires. (Michelson. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011). Les inhibiteurs directs de la thrombine tels que lépirudine, argatroban, bivalirudine et dabigatran, contrairement aux antagonistes du PAR-1, sont des anticoagulants plutôt que des médicaments antiplaquettaires spécifiques. De nouvelles cibles thérapeutiques pour de nouveaux agents antiplaquettaires sont indiquées en rouge. HBPM,

héparine de bas poids moléculaire; PG, prostaglandine; PSGL-1; P-sélectine ligand glycoprotéine 1; TX, thromboxane; HNF, héparine non fractionnée.

Chapitre 2: Complexe GPIb-IX-V

2.1. Structure et fonction du GPIb-IX-V

2.1.1 Généralités

La glycoprotéine Ib-IX-V constitue l'un des principaux récepteurs d'adhésion exprimés sur la surface des plaquettes circulantes. C'est un multimère composé de quatre polypeptides GPIb α , GPIb β , GPIX et GPV, et représente alors un récepteur multifonctionnel capable d'interagir avec un certain nombre de ligands, y compris le VWF, le facteur de coagulation thrombine, les facteurs XI et XII, la P-sélectine, le Mac-1, le collagène, etc. La figure 2.1 (A et B) montre la structure détaillée du complexe GPIb-IX-V.

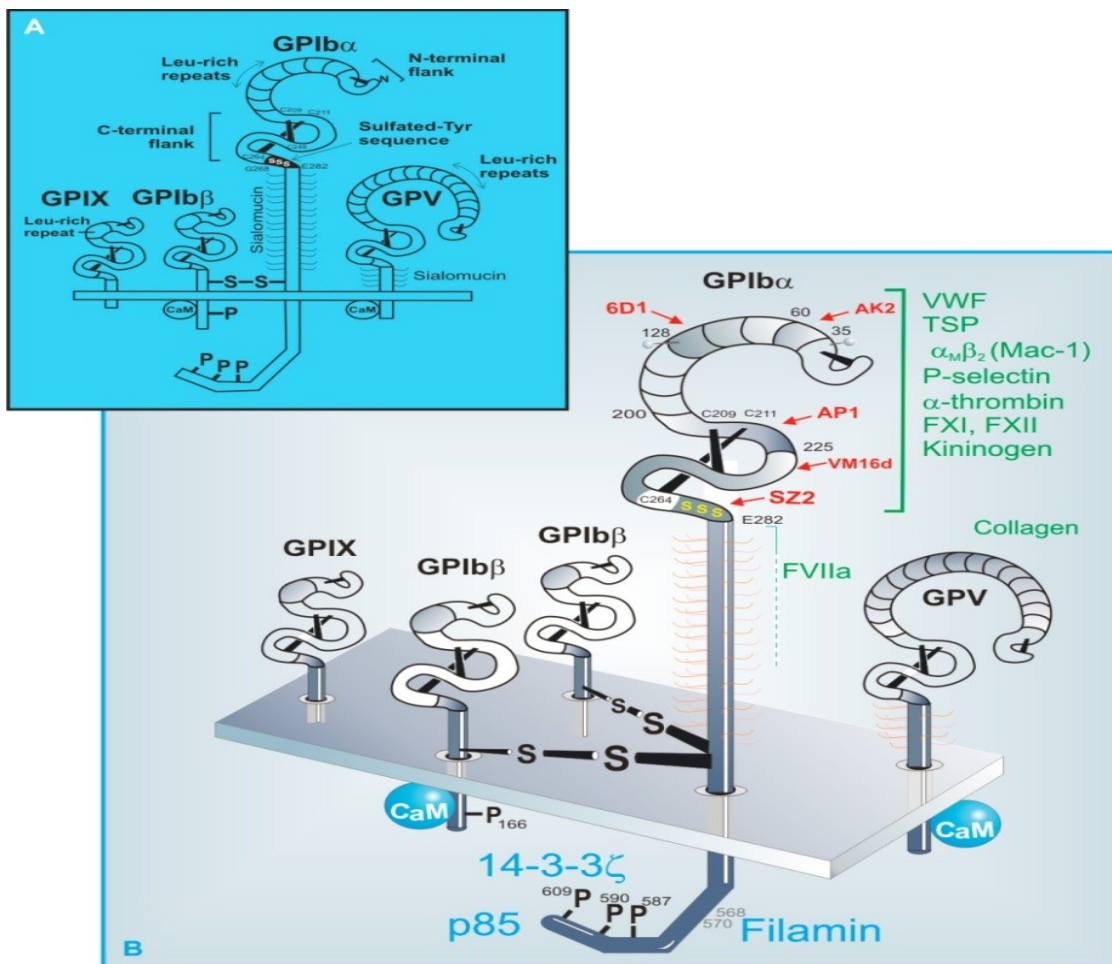


Figure 2.1: Structure détaillée du complexe GPIb-IX-V. (Michelson A.D. (2013). *Platelets*. Third Edition. Academic Press. pp. 197).

2.2. Partenaires intracellulaires du GPIb-IX-V

Les courts domaines cytoplasmiques des différentes sous-unités de la GPIb-IX-V ne sont pas associés à des protéines liées au GTP (GTP-binding proteins) (sont dépourvues de motifs de signalisation) et ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque. Cependant, le complexe GPIb-IX-V interagit de manière constitutive avec des partenaires intracellulaires, y compris la filamine-1 (précédemment dénommée actine-binding protein-280) (Meyer, Zuerbig et al. 1997), les protéines adaptatrices 14-3-3 (Du, Fox et al. 1996), (Calverley, Kavanagh et al. 1998) et la calmoduline (Andrews, Munday et al. 2001) (figure 2.2). Ces interactions interviennent dans la régulation de différents événements cellulaires GPIb-IX-V-dépendants, tels que le roulement et l'adhésion des plaquettes (Cranmer, Ulsemer et al. 1999), (Schade, Arya et al. 2003), la réorganisation du cytosquelette (Dyson, Munday et al. 2003) et la signalisation transmembranaire (Calverley, Kavanagh et al. 1998), (Gu, Xi et al. 1999).

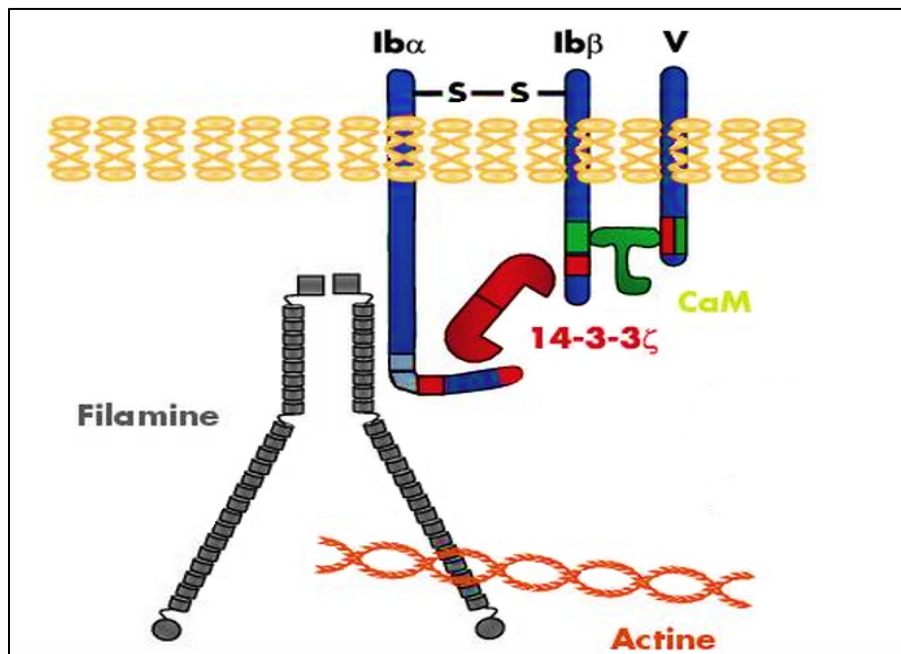


Figure 2.2: Principaux partenaires intracellulaires du complexe GPIb-IX-V. (Lanza *et al. Hématologie*. 2008).

La filamine-1 qui est une protéine de haut poids moléculaire (280 kDa), assure le pontage avec l'actine sous-membranaire en se liant sur le domaine cytoplasmique 560-575 de la sous-unité GPIb α (Feng, Resendiz et al. 2003), (Cranmer, Pikovski et al. 2005) (voir figure 2.1 (B)).

Il a été démontré que l'interaction entre la GPIb α et la filamine-1 possède une influence considérable sur les différents aspects de la morphologie plaquettaire et de la fonction du récepteur GPIb-IX-V. L'architecture anormale du cytosquelette des plaquettes et les mégacaryocytes associés à la déficience héréditaire du GPIb α (syndrome de Bernard-Soulier) ont été en effet expliquées par l'absence de liaison entre la GPIb α et la filamine-1 (Lopez, Andrews et al. 1998). En outre, il a été prouvé que l'association GPIb α -filamine-1 est nécessaire pour l'ancrage du complexe GPIb-IX-V au cytosquelette d'actine (Cunningham, Meyer et al. 1996), et aussi pour la liaison du VWF dans des conditions de forces de cisaillement élevées (Cranmer, Ulsemer et al. 1999).

Le domaine cytoplasmique de la GPIb α interagit également d'une manière directe avec les protéines adaptatrices de signalisation 14-3-3. La famille 14-3-3 comprend des protéines dimériques hautement conservées et largement exprimées avec des masses moléculaires entre 29 et 33 kDa. Ces protéines régulent l'activité de plusieurs molécules de signalisation et contrôlent différents processus physiologiques tels que la mitogenèse, le cycle cellulaire et l'apoptose (Morrison 1994), (Freeman and Morrison 2011). Six isoformes 14-3-3 (β , γ , ϵ , η , θ et ξ), interagissant avec le complexe GPIb-IX-V à travers des sites de liaison similaires, ont été détectés dans les plaquettes humaines (Mangin, Receveur et al. 2009). L'isoforme le plus impliqué dans la signalisation de la voie de transduction est la 14-3-3- ζ (Xiao, Smerdon et al. 1995).

La sous-unité GPIb α contient deux sites dans les régions 580-590 et 606-610 C-terminale qui sont tous deux critiques pour l'interaction avec la 14-3-3 ζ (Mangin, David et al. 2004). Une région dans le domaine intracytoplasmique du GPIb β , contenant un site de phosphorylation sur la Ser¹⁶⁶ dépendant d'une protéine kinase A (PKA), a également été proposée comme site de liaison pour 14-3-3 ζ (Calverley, Kavanagh et al. 1998).

Il a été rapporté qu'une grande variété de protéines pourraient s'associer aux isoformes de la famille 14-3-3, y compris la kinase Raf-1, la protéine kinase C (PKC) et la PI-3K (Bonney-Berard, Liu et al. 1995). Par ailleurs, d'autres données suggèrent que la protéine régulatrice cytosolique, la calmoduline, joue un rôle central dans la régulation du GPVI et le complexe GPIb-IX-V (Gardiner, Arthur et al. 2005). La calmoduline se lie directement aux motifs conservés juxta-membranaires, dans les domaines cytoplasmiques du GPVI et GPIb-IX-V (sous-unités GPIb β et GPV) sur les plaquettes au repos, interactions qui se dissocient lors de l'activation des plaquettes.

2.3 Syndrome de Bernard-Soulier

Le Syndrome de Bernard-Soulier (BSS) est une maladie héréditaire rare et souvent sévère, caractérisée par une macro-thrombocytopénie (des plaquettes anormalement grandes et moins nombreuses), des saignements cutané-muqueux spontanés et des hémorragies post-traumatiques. Cette pathologie a été initialement décrite en 1948 par deux médecins français, Bernard et Soulier chez un patient présentant un syndrome hémorragique grave. «*Ces caractères très particuliers permettent, nous semble-t-il, d'isoler, dans le cadre des diathèses hémorragiques, une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire, hémorragique, congénitale.*» rapportent-ils (Bernard and Soulier 1948).

Le BSS est causé par des mutations dans les gènes *GP1Ba*, *GP1B β* et *GP1X*, trois des quatre gènes codant pour les sous-unités du complexe GPIb-IX-V. La plupart des mutations identifiées dans ces gènes induisent une altération de l'expression des sous-unités du complexe au niveau des membranes plaquettaires, ou plus rarement de son interaction avec le VWF. En conséquence, les plaquettes présentent une incapacité d'adhésion au sous-endothélium vasculaire et une absence de réponse à l'agrégation plaquettaire induite par la ristocétine (RIPA).

L'incidence du syndrome BSS a été estimée à 1 par 1 million de naissances vivantes, cependant elle est susceptible d'être plus élevée, la maladie étant souvent mal diagnostiquée (Savoia, Pastore et al. 2011), (Balduini, Savoia et al. 2013), (Moiz and Rashid 2013). Dans sa forme typique, il s'agit d'une maladie autosomique récessive caractérisée par une grave tendance

hémorragique associée à une thrombopénie modérée ($60 \times 10^9/L$ en moyenne) (Savoia, Pastore et al. 2011).

Les membres de la famille porteurs d'un seul allèle muté sont généralement asymptomatiques avec une numération plaquettaire normale. Cependant, ils peuvent avoir des plaquettes légèrement agrandies, une diminution de l'expression du complexe GPIb-IX-V ainsi qu'une RIPA modérément réduite (Noris, Perrotta et al. 2012). Outre les formes récessives classiques du BSS, certaines mutations rares du *GP1B α* ou du *GP1B β* sont à transmission autosomique dominante avec une pénétrance complète. Ce mode de transmission est corrélé à une légère macrothrombocytopénie, généralement asymptomatique (Miller, Lyle et al. 1992), (Kunishima, Imai et al. 2006), (Vettore, Scandellari et al. 2008), (Noris, Perrotta et al. 2012).

2.4. Différents ligands du GPIb-IX-V

Les propriétés réceptrices du complexe sont essentiellement portées par le récepteur GPIb α dans sa partie N-terminale de 45 kDa. Les deux ligands VWF et thrombine jouent particulièrement des rôles importants dans l'activation plaquettaire et l'hémostase. Cependant, le GPIb α pourrait également lier d'autres ligands impliqués dans divers mécanismes cellulaires comme le recrutement des leucocytes par les plaquettes aux sites de lésions vasculaires.

2.4.1 Facteur von Willebrand

La formation du thrombus riche en plaquettes (thrombus blanc), une étape critique dans la pathogenèse des événements athérothrombotiques, est un processus composé de plusieurs étapes impliquant divers composants, parmi lesquels le VWF. Il est clair que les interactions VWF-GPIb α sont essentielles pour l'adhérence des plaquettes à l'endothélium sous des conditions de forces de cisaillement élevées. Le VWF est une grande glycoprotéine plasmatique multimérique présente dans le plasma et au niveau du sous-endothélium, mais il y a d'autres sources de VWF qui peuvent être également dans le corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, et dans les granules α des plaquettes. Le contenu de ces organites sera libéré lorsque le processus hémostatique est initié. Le collagène de la matrice sous-endothéliale lie le VWF qui va servir de pont entre le vaisseau sanguin endommagé et les plaquettes activées, en jouant un rôle crucial dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaires, en particulier dans des conditions de forces de

cisaillement élevées. En raison de ces particularités, la liaison du VWF au GPIIb/IIIa est considérée comme une cible thérapeutique attractive. La concentration plasmatique du VWF est d'environ 10 mg/mL, sa concentration dans les plaquettes est d'environ 280 ng/10⁹ plaquettes (Sadler 2005).

Le VWF dans la circulation ne peut pas lier spontanément les plaquettes. Il doit être d'abord capté par le collagène de la matrice sous-endothéliale exposée, par l'intermédiaire de son domaine A3, avant de pouvoir interagir avec le récepteur GPIIb/IIIa *via* son domaine A1 (Lankhof, van Hoeij et al. 1996). Les changements de conformation qui coïncident avec la liaison au collagène, et qui sont nécessaires pour exposer son domaine A1, ne sont que partiellement compris. D'autres domaines du VWF masquent probablement le domaine A1 et empêcheraient alors la liaison VWF-GPIIb/IIIa en conditions physiologiques (Ulrichs, Udvardy et al. 2006).

2.4.2 Thrombine

La thrombine n'agit pas seulement sur les plaquettes *via* leurs récepteurs couplés aux protéines G, mais également par son interaction avec le récepteur GPIIb/IIIa. En effet, l'absence du complexe GPIIb-IX-V, son blocage par des anticorps spécifiques, ou encore le clivage du domaine N-terminale (Mazzucato, Marco et al. 1998), (Soslau, Class et al. 2001), (Ramakrishnan, DeGuzman et al. 2001) entraînent tous une réponse diminuée à la thrombine.

En outre, plusieurs études ont montré que la stimulation par une thrombine dépourvue de son activité enzymatique (incapable alors de stimuler les PARs) induit tout de même une activation plaquettaire. Cette activation serait probablement GPIIb/IIIa-dépendante (Soslau, Class et al. 2001), (Adam, Bouton et al. 2003), (Dubois, Steiner et al. 2004). La structure cristallographique de l'axe GPIIb/IIIa-thrombine a permis l'identification des sites d'interaction (Celikel, McClintock et al. 2003), (Dumas, Kumar et al. 2003). L'analyse des cristaux montre qu'une même molécule de GPIIb/IIIa peut à la fois interagir avec l'exocyste I grâce à son 6e motif riche en leucine (LR) et avec l'exocyste II d'une seconde molécule de thrombine à l'aide de son domaine anionique sulfaté.

Par contre, une autre étude sur l'axe thrombine-GPIb-IX-V a montré que la liaison par GPIb α de la thrombine favorise la présentation de cette dernière à son récepteur approprié, le PAR-1, laissant croire que le récepteur GPIb α agit seulement comme cofacteur pour le récepteur PAR-1, sans pour autant être capable à lui seul d'initier une activation plaquettaire (figure 2.3). La même étude a conclu que la sous-unité GPV pourrait agir comme un régulateur négatif de l'activation plaquettaire induite par la thrombine, étant donné que son clivage par la thrombine facilite la liaison thrombine-GPIb α (Ramakrishnan, DeGuzman et al. 2001).

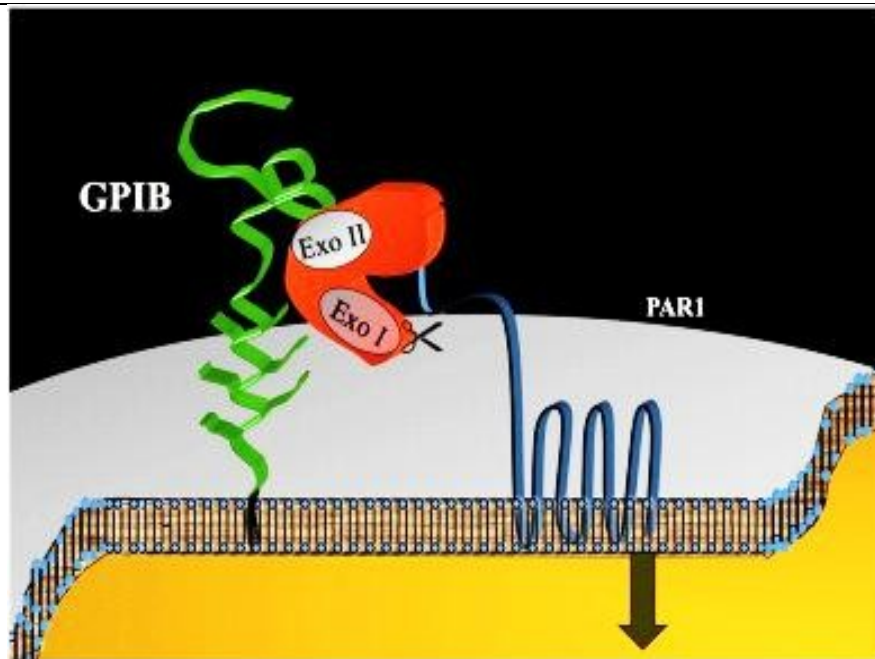


Figure 2.3: Modèle de GPIb α comme cofacteur pour l'hydrolyse de PAR-1. (De Candia E. *Thromb Res.* 2012).

2.4.3 Autres ligands

La thrombospondine (TSP) est un ligand pour GPIb α récemment identifié sur les plaquettes, l'interaction entre ces deux modèles est capable d'assurer l'adhésion des plaquettes à des forces de cisaillement élevées en absence du VWF (Jurk, Clemetson et al. 2003).

Le complexe GPIb-IX-V est aussi un récepteur majeur du collagène mais indirectement puisqu'il le lie *via* le VWF (Nieswandt and Watson 2003). Cependant, Moog et ses collègues ont rapporté que le collagène peut être un ligand direct du complexe où il s'associe spécifiquement au récepteur GPV (Moog, Mangin et al. 2001). En 1999, Romo *et al.* ont montré que le GPIb α

reconnait également la P-sélectine (Romo, Dong et al. 1999). De manière significative, l'interaction P-sélectine-GPIb α est à l'origine du processus responsable de l'adhésion des plaquettes à des cellules endothéliales activées. L'intégrine leucocytaire, α M β 2 (ou Mac-1), a été identifiée comme un récepteur du GPIb α en 2000. Il a été proposé en effet que cette interaction induit l'adhérence et la migration des leucocytes aux thrombus vasculaires (Simon, Chen et al. 2000). Enfin, le récepteur GPIb α peut interagir également avec les facteurs XI et XII de la coagulation (Bradford, Pixley et al. 2000), (Baglia, Badellino et al. 2002).

2.5 Signalisation *via* le complexe GPIb-IX-V

La capacité de transmettre un signal *via* le complexe GPIb-IX-V ainsi que la nature de cette signalisation ont fait l'objet de plusieurs débats. Pour longtemps, à part son rôle dans l'adhérence des plaquettes aux sites de lésions vasculaires, aucun rôle dans la signalisation plaquettaire n'a été attribué à ce récepteur. Il a fallu attendre les années quatre-vingt-dix pour avoir quelques premières indications de l'existence d'une signalisation déclenchée par le complexe GPIb-IX-V. En effet, deux études ont montré, après avoir stimulé le récepteur GPIb α par la ristocétine en présence du VWF, une augmentation dans la concentration en Ca²⁺ et production de TXA₂ ainsi qu'une activation des PKCs (Kroll, Harris et al. 1991), (Francesconi, Deana et al. 1993).

D'autres indications provenaient d'une étude en systèmes de perfusion en flux où l'adhérence des plaquettes au VWF induisait une activation menant à l'engagement de l'intégrine α IIB β 3 (Savage, Saldivar et al. 1996). Cependant, la preuve irréfutable d'une signalisation dépendante de la GPIb α a été montrée dans des expériences utilisant des cellules transfectées par le complexe GPIb-IX-V, puisque ces cellules ont subi, en absence de toutes activations par les agonistes solubles, un changement de forme suivi d'une émission de filopodes (Yuan, Kulkarni et al. 1999).

Il existe deux principales voies de signalisation déclenchées suite à l'activation du complexe GPIb-IX-V par le VWF; la première implique l'activation de la PI3-kinase et du dimère 14-3-3 ζ , alors que la seconde est modulée par les récepteurs FcR γ et Fc γ RIIa. Chacune de ces voies est capable, à elle seule, de déclencher l'activation de l'intégrine α IIB β 3.

Le complexe GPIb-IX-V possède aussi un site de liaison de haute affinité pour la thrombine et il semble que cette interaction soit capable de déclencher une signalisation intracellulaire favorisant l'activation plaquettaire (Celikel, McClintock et al. 2003), (De Candia 2012). Cependant, les mécanismes exacts impliqués dans ce phénomène sont peu caractérisés et encore débattus.

Les molécules inhibant la liaison de la thrombine au GPIb α ont montré une inhibition *in vitro* de l'activation plaquettaire en réponse à la thrombine. Par exemple, la forme mutée de la thrombine (exosite II absent), ayant une affinité faible au GPIb α , a induit moins d'agrégation en comparaison au contrôle (De Cristofaro, De Candia et al. 2001).

La pertinence de l'interaction thrombine-GPIb α dans l'hémostase et la thrombose *in vivo* a été traitée par une seule étude jusqu'à date, où le récepteur GPIb α humain muté sur la Tyr²⁷⁶, un résidu essentiel pour la liaison de la thrombine par le GPIb α , a été exprimé à l'intérieur des plaquettes murines. Ces souris transgéniques n'ont pas montré une hémostase défectueuse, mais dans différents modèles de thrombose artérielle, ces souris semblaient être protégées contre la thrombose par rapport aux souris WT (Guerrero, Shafirstein et al. 2008).

La signalisation découlant de l'interaction thrombine-GPIb α semble être similaire à celle observée suite à l'activation par le VWF. En effet, les protéines signalétiques incluant la tyrosine kinase Src et la PI3-kinase, ainsi que de la Rho kinase et la MEK1/2, occupent apparemment une fonction importante dans la signalisation du complexe GPIb-IX-V par la thrombine (Adam, Guillin et al. 2003), (Dubois, Steiner et al. 2003). De plus, la sous-unité GPV du complexe GPIb-IX-V possède un site de clivage pour la thrombine et certains investigateurs stipulent que ce clivage enzymatique permet la dimérisation des deux molécules de GPIb α avoisinantes, facilitant ainsi la transduction de signaux intracellulaires (Ramakrishnan, DeGuzman et al. 2001), (Celikel, McClintock et al. 2003). À l'heure actuelle, cette hypothèse fait l'état d'un débat important et des études plus approfondies à ce sujet seront nécessaires afin d'identifier clairement les mécanismes d'activation de la GPIb-IX-V suite à la liaison de la thrombine.

L'élucidation des mécanismes de signalisation déclenchés par ce complexe constitue aujourd'hui un vrai défi aux chercheurs et ouvre de nouvelles perspectives quant à la possibilité de développer une nouvelle cible pharmacologique dans le traitement de la thrombose vasculaire.

Chapitre 3: Protéines Kinases C dans les plaquettes

Protéines Kinases C dans les plaquettes

Les protéines kinases C (PKC) constituent une famille ubiquitaire de kinases sérine/thréonine qui occupent un rôle fondamental dans la régulation d'une multitude de mécanismes cellulaires, tels que la prolifération et la différenciation cellulaires, la survie, l'apoptose, et la sécrétion. Depuis leur découverte en 1997, les PKCs ont suscité un énorme intérêt scientifique se rapportant à plusieurs domaines d'étude.

Bien que les données actuelles permettent une meilleure compréhension de leur diversité fonctionnelle et de leur régulation physiopathologique, l'implication spécifique de chaque isoforme de la famille des PKCs dans les processus physiologiques demeure mal caractérisée. L'élucidation de ces mécanismes améliorera nos connaissances sur les modes d'action spécifiques de ces enzymes dans les différents tissus et constituera, certes, un potentiel thérapeutique de choix dans le traitement de nombreuses pathologies reliées aux PKCs.

3.1 Classification et structure des PKCs

La famille des PKCs est une famille d'enzymes cytosoliques transloquées à de multiples sites intracellulaires suite à l'activation plaquettaire (Mochly-Rosen, Khaner et al. 1991). Cette famille de kinases sérine/thréonine comprend 11 isoformes divisés en trois grandes classes, soit les PKCs conventionnelles (cPKC) ou classiques, les nouvelles PKCs (nPKC) et les PKCs atypiques (aPKC) (Violin and Newton 2003).

Quoique les PKCs aient une structure plus ou moins commune composée d'un domaine catalytique et d'un domaine régulateur liés entre eux par une structure charnière (Harper, Mason et al. 2010), quelques différences structurales et surtout dans leurs propriétés enzymatiques peuvent être distinguées. La figure 3.1 montre en effet les différences de structures entre les membres de la famille des PKCs. Le domaine régulateur est responsable de la liaison des cofacteurs à l'enzyme, et détermine ainsi les différences existant entre les isoformes des PKCs. Ce domaine se compose de plusieurs régions protéiques. La classe des cPKC qui comprend les isoformes α , β /II et γ , est caractérisée par un domaine C1 qui lie le diacylglycérol (DAG), et un domaine C2 qui lie le calcium (Nalefski and Newton 2001). Elle est donc activée à la fois par le DAG et le calcium. La classe des nPKC contenant les isoformes η , ϵ , δ et θ , est également

caractérisée par la présence d'un domaine C1 mais ne peut lier le calcium au domaine C2. Cette classe ne peut alors être activée que par le DAG. Finalement, la classe des aPKC (ζ et η/ι), qui n'ont pas de domaine C2 mais qui ont un domaine C1 atypique, sont insensibles au DAG et au calcium (Steinberg 2008), (Harper and Poole 2010). Le pseudo-substrat, quant à lui, est une courte séquence d'acides aminés présente dans les trois sous-familles des PKCs capable d'imiter le motif de reconnaissance du substrat et bloquer ainsi l'accès au domaine catalytique. Lors de la translocation des PKCs à la membrane après leur activation, le pseudo-substrat est libéré, ce qui permet la liaison de l'enzyme à son substrat (Kheifets and Mochly-Rosen 2007). Quant au domaine catalytique, il est très conservé entre tous les membres de la famille des PKCs et partage une forte homologie avec le domaine catalytique d'autres sérine/thréonine kinases.

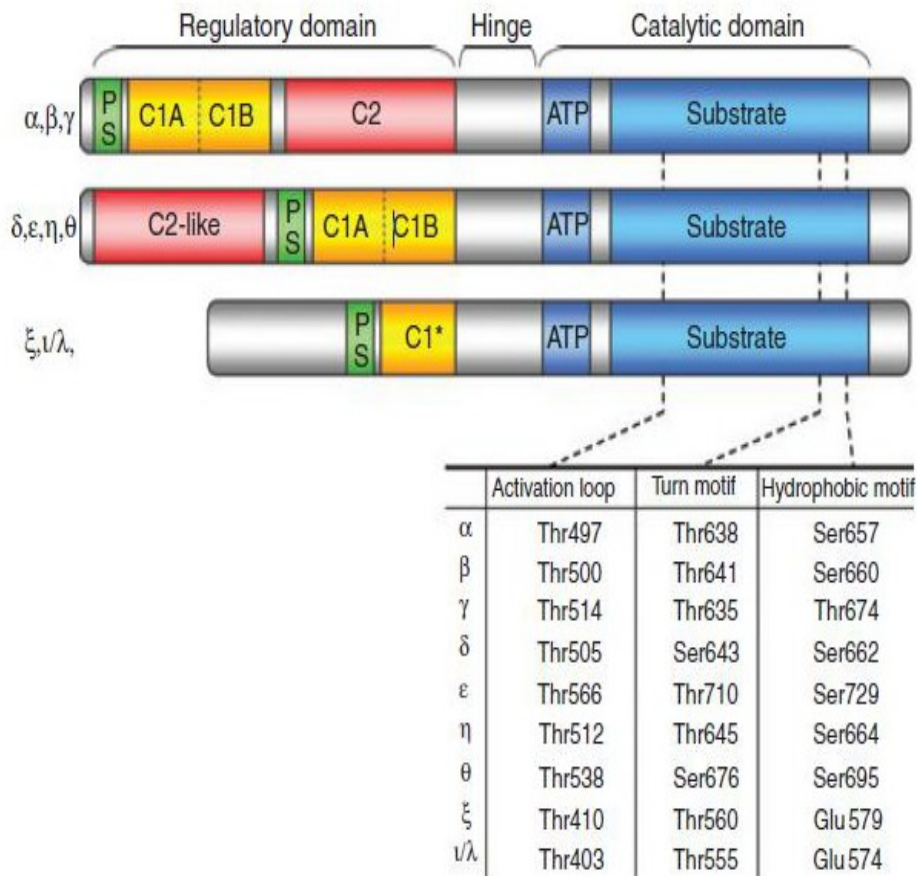


Figure 3.1: Structure des différents membres de la famille des PKCs. (Harper *et al.* *J Thromb Haemost.* 2010).

3.2 Localisation, phosphorylation et activation des PKCs

3.2.1 Localisation et maturation des PKCs

Les PKCs sont exprimées ubiquitairement à travers les différents tissus de l'organisme, cependant chaque isoforme montre une distribution particulière. Le tableau 3.1 résume la principale distribution tissulaire de chaque isoforme des PKCs ainsi que les facteurs requis pour leur activation (Idris, Gray et al. 2001).

À l'état non activé de la cellule, les PKCs sont localisées dans le cytosol. Après activation, les PKCs reçoivent un signal en aval des récepteurs membranaires et sont transloquées du cytosol vers la membrane plasmique où elles acquièrent leur maturité. Cette translocation est assurée par une protéine d'échafaudage nommée RACK1 (*Receptor for Activated Protein Kinase C-1*) qui ne lie que la forme active de la PKC (Schechtman and Mochly-Rosen 2001).

Tableau 3.1: Distribution tissulaire et facteurs d'activation requis pour les PKCs (Idris, Gray et al. 2001).

	Isoformes	Distribution tissulaire	Co-facteurs requis		
			Ca ²⁺	DAG	PS
PKCc (conventionnelles)					
	α	ubiquitaire	✓	✓	✓
	β I	ubiquitaire	✓	✓	✓
	β II	ubiquitaire	✓	✓	✓
	γ	cerveau	✓	✓	✓
PKCn (nouvelles)					
	δ	ubiquitaire	-	✓	✓
	ϵ	cerveau, cœur	-	✓	✓
	η	cœur, peau, poumons	-	✓	✓
	θ	muscle, cerveau, cellules sanguines	-	✓	✓
	μ	cellules épithéliales des poumons	-	✓	✓
PKCa (atypiques)					
	ζ	ubiquitaire	-	-	✓
	ι/λ	reins, cerveau, pancréas	-	-	✓

3.2.2 Phosphorylation et activation des PKCs

Les PKCs à l'état basal sont inactives et doivent être phosphorylées sur trois sites pour être activées. Après leur activation, les PKCs sont transloquées du cytosol à la membrane plasmique où elles interagissent avec des protéines spécifiques pour assurer leurs fonctions. L'activation des PKCs se fait par deux mécanismes post-traductionnels: la phosphorylation de PKC par des sérines/thréonines kinases ou par des tyrosines kinases (Liu and Heckman 1998), (Harper and Poole 2010).

En premier lieu, la protéine kinase 3-phosphoinositide-dépendante (pour *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*, PDK1) joue un rôle important dans l'activation des PKCs. En effet, elle phosphoryle une thréonine conservée près de la boucle d'activation de la PKC (Balendran, Hare et al. 2000) (Biondi 2004). Cette phosphorylation est essentielle à la maturation de la PKC, à l'exception de la PKC θ qui semble être phosphorylée de façon constitutive, et de la PKC α dont la phosphorylation n'est pas nécessaire à l'activité de cette kinase (Yonemoto, McGlone et al. 1997). Dans le cas des autres PKCs, la phosphorylation à la boucle d'activation induit une autophosphorylation au niveau du motif hydrophobique et du motif « *turn* » donnant naissance à une kinase qui est phosphatase-résistante et protéase-résistante. Cet état de la kinase lui permet de répondre aux médiateurs secondaires intracellulaires pendant que sa région de substrat lie le motif pseudo-substrat (Liu and Heckman 1998).

À contre-courant, il vient d'être démontré que l'inhibition spécifique de la PDK1 n'a aucun effet sur l'activité des PKC suite à la stimulation du PAR-4 (Dangelmaier, Manne et al. 2014).

Le collagène et la thrombine induisent la phosphorylation de Tyr³¹¹ et Tyr⁵⁶⁵ de la PKC δ par la famille des kinases Src, alors que le collagène induit la phosphorylation de Tyr⁹⁰ de PKC θ régulant ainsi leurs activités intracellulaires. Cette différence de phosphorylation aurait probablement une influence sur le degré d'expression des PKCs ainsi que sur leurs localisations. En effet, la PKC δ est fortement exprimée dans les plaquettes alors qu'une expression accrue de la PKC θ dans les cellules T du système immunitaire a été enregistrée (Crosby and Poole 2002), (Crosby and Poole 2003), (Pula, Crosby et al. 2005).

Plusieurs récepteurs plaquettaires sont couplés aux médiateurs secondaires intracellulaires et activent des membres de la famille des phospholipases. Par exemple, la GPVI et les récepteurs activés par le collagène induisent l'activation de la PLC, et plus spécifiquement la PLC γ 2, par la phosphorylation de résidus tyrosine de manière kinase-dépendante (Watson, Auger et al. 2005). D'autres activateurs plaquettaires tels que le TXA₂ et l'ADP activent la PLC β *via* Gaq. En général, les PLCs sont des enzymes catalyseurs de la synthèse de médiateurs secondaires intracellulaires, tels que le DAG et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). L'IP3 est principalement impliquée dans la relâche du calcium induisant donc une augmentation de la concentration intracellulaire. Dans le cas des cPKCs, le domaine C2 lie la phosphatidylsérine membranaire de manière calcium-dépendante. Une fois l'adhésion initiée, le domaine C1 lie le DAG permettant un changement dans la conformation de la PKC et entraînant un détachement du pseudo-substrat du domaine d'attachement de substrat. Ceci permet la phosphorylation de substrats à proximité (Steinberg 2008).

3.2.3 Régulation intracellulaire des PKCs

Les PKCs lient deux récepteurs, qui sont des protéines adaptatrices et protéines d'ancrage de haute affinité pour les PKCs: les récepteurs de kinase C inactivés (pour *receptors for inactivated C-kinase isozymes*, RICKs) et les récepteurs de kinase C activés (pour *receptors for activated C-kinase*, RACKs) (Figure 3.2) (Mochly-Rosen, Khaner et al. 1991), (Mochly-Rosen, Khaner et al. 1991), (Mochly-Rosen and Gordon 1998). Plusieurs isoformes de RACK ont été identifiées tels que RACK1 et RACK2 (aussi appelé ϵ RACK), chacun responsable de l'initiation de certaines voies intracellulaires. Ces récepteurs jouent un rôle essentiel dans la localisation différentielle des isoformes spécifiques de la PKC. La localisation est un facteur très important dans la régulation de la spécificité et l'activité des différents isoformes de PKCs puisque ces RACKs lient non seulement les PKCs, mais les amènent aussi à proximité d'un groupe spécifique de substrats pour chaque isoforme. Il est connu que RACK1 joue un rôle particulier dans l'activité de la PKC β II (Schechtman and Mochly-Rosen 2001). Les RACKs lient les isoformes de PKCs ainsi que d'autres médiateurs intracellulaires participant à plusieurs fonctions cellulaires. Par exemple, ils peuvent lier Src tyrosine kinase suite à la phosphorylation de résidus tyrosines des récepteurs G afin de réduire l'activité de ces derniers, ainsi que des intégrines et des

phosphodiesterases (Schechtman and Mochly-Rosen 2001). De plus, RACK1 peut lier la PLC γ et réduire l'activité catalytique de celle-ci. D'autre part, ϵ RACK lie particulièrement la PKC ϵ , impliquée dans les mécanismes de relâche vésiculaire et les interactions cellules-cellules. Des protéines, interagissant avec les PKCs, nommées les protéines d'interaction des kinases C (pour *C-kinase interacting proteins*, C-KIPs), ont, quelques années plus tard, retenu l'attention des chercheurs en raison de la grande affinité entre les PKCs et les C-KIPs. Ceci a ouvert une nouvelle perspective de thérapies pharmacologiques qui consiste en l'altération ou l'interruption des liaisons PKC-C-KIPs qui pourraient réduire ou même inhiber la formation de thrombus (Poole, Pula et al. 2004).

Récemment, une étude a démontré que les PKCs conventionnelles, mais pas les PKCs nouvelles, peuvent phosphoryler trois isoformes des protéines kinases D (PKD). Par contre, seule la PKD2 est spécifique aux plaquettes humaines et joue un rôle essentiel dans la modulation des fonctions plaquettaires telles que la sécrétion des granules α , l'agrégation et la formation de thrombus (Konopatskaya, Matthews et al. 2011).

Une autre famille de protéines largement impliquée dans la régulation des PKC est celle des protéines 14-3-3. Ces protéines sont exprimées de façon ubiquitaire à travers l'organisme et occupent une place importante dans la régulation de divers mécanismes cellulaires. Les protéines 14-3-3 sont également de très puissants inhibiteurs des PKCs et sont d'ailleurs nommées protéines inhibitrices des kinases C (kinase C inhibitor proteins ou KCIP) (Toker, Ellis et al. 1990), (Toker, Sellers et al. 1992). Leur mode d'action consiste à inhiber le domaine C1 des PKCs et à entrer en compétition avec les substrats des PKCs, tels que l'ATP, le Ca²⁺ et le DAG (Toker, Ellis et al. 1990), (Toker, Sellers et al. 1992), (Robinson, Jones et al. 1994). De plus, les protéines 14-3-3 inhibent aussi la translocation des PKCs vers la membrane plasmique (Mochly-Rosen, Khaner et al. 1991).

Il est particulièrement important de comprendre les médiateurs intracellulaires impliqués dans les cascades de signalisation des PKCs afin de mieux comprendre leur implication dans chaque stade de la fonction et la physiologie plaquettaires.

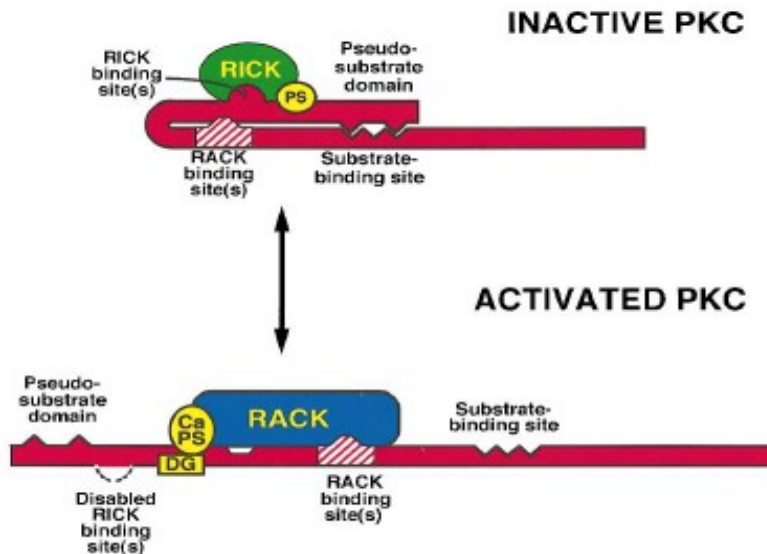


Figure 3.2: Régulation intracellulaire des PKCs. (Mochly-Rosen *et al.* *FASEB J.* 1998).

3.3 Rôle des PKCs dans la fonction plaquettaire

Les PKCs, comme dans la majorité des cellules, occupent une place fondamentale dans la physiologie des plaquettes. Plusieurs isoformes de PKCs ont été identifiées dans les plaquettes (α , β , δ , θ , ϵ , η , ζ et μ) et il est présumé que chacun de ces isoformes joue un rôle particulier dans la fonction plaquettaire (Crabos, Imber *et al.* 1991), (Baldassare, Henderson *et al.* 1992), (Grabarek, Raychowdhury *et al.* 1992). Malgré que la contribution spécifique de chacun de ces isoformes dans la fonction plaquettaire soit mal caractérisée, il est bien établi que les PKCs, en général, sont indispensables aux grandes fonctions des plaquettes, soit l'activation, la sécrétion et l'agrégation.

3.3.1 Les PKCs dans le changement de forme et l'étalement plaquettaire

Le changement de forme plaquettaire et l'étalement des plaquettes sur des surfaces thrombogènes est un processus d'initiation de la sécrétion de substances vasoactives et pro-inflammatoires dérivées des plaquettes et induisant l'agrégation plaquettaire. Plusieurs études ont caractérisé le rôle des isoformes de la PKC dans le changement de forme et l'étalement plaquettaire.

Une première étude a décrit le rôle de la PKC β dans ce processus. Elle démontre que la PKC β , activée par RACK1, est recrutée au récepteur GPIIb/IIIa où elle lie plus spécifiquement la

région $\beta 3$ du récepteur pour induire l'étalement des plaquettes sur le fibrinogène. Ce complexe, constitué de la PKC β et de la GPIIb/IIIa, se localise au niveau des lamellipodes et semble être impliqué dans le réarrangement de l'actine du cytosquelette. Dans cette étude, il a été prouvé que les plaquettes de souris déficientes en PKC β (*PKC β ^{-/-}*) ne peuvent pas changer de forme ni s'étaler. Par contre, ceci peut être prévenu par l'activation des récepteurs de la thrombine (PAR-4) ou de l'ADP ou bien du récepteur GPVI par la convulxine, une toxine du venin de serpent qui stimule spécifiquement le GPVI et induit l'activation des plaquettes (Buensuceso, Obergfell et al. 2005).

Peu après, une autre étude a démontré que la PKC θ est constitutivement associée au récepteur GPIIb/IIIa et que le fibrinogène stimule l'association de PKC θ aux tyrosines kinases Btk et Syk induisant la phosphorylation de la PKC θ , de la Btk et de la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP), un régulateur de la polymérisation de l'actine, phosphorylé au résidu Ser⁴⁸⁸ et impliqué dans l'activation du complexe Arp2/3 du cytosquelette. La PKC θ est donc essentielle à la signalisation « *outside-in* » du récepteur de fibrinogène GPIIb/IIIa et à la formation de filopodes. Ces études ont établi un lien étroit entre l'étalement plaquettaire et la relâche de TXA₂ (Hall, Harper et al. 2008), (Nagy, Bhavaraju et al. 2009), (Prevost, Mitsios et al. 2009).

D'autre part, une étude plus récente a démontré, en utilisant des plaquettes de souris déficientes en PKC α (*PKC α ^{-/-}*), que cette dernière n'est pas nécessaire à l'étalement des plaquettes sur le fibrinogène (Konopatskaya, Gilio et al. 2009). Cependant, une autre étude a décrit le rôle négatif de la PKC δ dans la formation de filopodes et l'étalement des plaquettes *via* la protéine VASP (pour *vasodilator-stimulated phosphoprotein*), un régulateur important de l'actine du cytosquelette (Pula, Schuh et al. 2006). Finalement, il a été établi que dans les plaquettes de souris, la PKC ϵ n'a aucun effet au niveau du changement de forme ou de l'étalement plaquettaire (Pears, Thornber et al. 2008).

3.3.2 Les PKCs dans la dégranulation plaquettaire et la synthèse de TXA₂

Tout d'abord, l'exocytose est un processus cellulaire qui est à la base de la dégranulation plaquettaire et de la sécrétion de plusieurs facteurs qui influencent la fonction plaquettaire. Deux

familles de protéines, les récepteurs du SNAP (pour *soluble n-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment proteins*) et les SMs (pour *Sec1/Munc18-like*), jouent des rôles complémentaires dans la fusion des vésicules à la membrane cellulaire afin d'amorcer le processus d'exocytose.

Une étude a démontré que les plaquettes humaines stimulées avec la thrombine induisent la phosphorylation de la syntaxine 4 par la PKC permettant ainsi l'association avec SNAP-23. Or, il a été conclu que l'activation extracellulaire des plaquettes est couplée à un mécanisme intracellulaire *via* la PKC et module les interactions des SNAREs dans l'exocytose plaquettaire (Chung, Polgar et al. 2000). Une étude plus récente a décrit le rôle de la PKC dans la phosphorylation des résidus sérines de SNAP-23 dans la sécrétion des granules α , denses et des lysosomes. Le SNAP-23 est important dans la modulation des interactions du complexe SNARE. La phosphorylation aux résidus Ser²³, Thr²⁴ et Ser¹⁶¹ inhibe l'interaction de la syntaxine 4 dans ce complexe. De plus, ces sites sont phosphorylés surtout par les PKC α , PKC γ et PKC δ (Polgar, Lane et al. 2003).

La PKC α est un régulateur positif de la dégranulation plaquettaire. Une étude a caractérisé le rôle de la PKC α dans la sécrétion du VWF, des granules α , et du 5-HT (sérotonine), des granules denses. Il a été démontré que la PKC α est essentielle, mais pas suffisante à la sécrétion des granules α et des granules denses calcium-dépendante des plaquettes (Yoshioka, Shirakawa et al. 2001). Peu après, une autre étude a démontré l'association de PKC α à Syk, induisant la phosphorylation de PKC α et la translocation à la membrane. Ceci stimule la relâche de 5-HT suite à l'activation des récepteurs GPVI et GPIb-IX-V. Une association de PKC α à Src a également été décrite dans les plaquettes stimulées à la thrombine (Pula, Crosby et al. 2005). Dans les plaquettes de souris *PKC α ^{-/-}*, la phosphorylation de SNAP-23 au résidu Ser⁹⁵, suite à l'activation avec la thrombine ou le CRP, est significativement réduite ayant un effet négatif sur la sécrétion des granules denses (Konopatskaya, Gilio et al. 2009). Le rôle important de la PKC α a également été caractérisé dans la phosphorylation de la protéine kinase D (PKD2) des plaquettes, suite à l'activation de la GPVI, induisant la sécrétion des granules denses (Konopatskaya, Matthews et al. 2011). Outre ces rôles de la PKC α dans la relâche granulaire, son rôle important dans la régulation négative, au niveau de la formation des pro-plaquettes, a été aussi démontré (Williams, Harper et al. 2014).

La PKC δ démontre un double rôle agoniste-dépendant. Dans une première étude, il a été prouvé que l'activation des PARs induit la sécrétion des granules denses alors que l'activation de GPVI semble réguler négativement cette dégranulation (Murugappan, Tuluc et al. 2004), (Pula, Schuh et al. 2006). Ce même groupe a également démontré que la phosphorylation de Tyr³¹¹ de PKC δ est calcium-dépendante et Src-dépendante et module la production de TXA₂ dans les plaquettes, mais n'est pas nécessaire à la sécrétion de granules denses (Murugappan, Shankar et al. 2005). Plus tard, notre équipe de recherche a déterminé le rôle de la PKC δ dans la génération du TXA₂ suite à l'activation plaquettaire induite par le collagène, mais pas par la thrombine (Yacoub, Theoret et al. 2006). Une étude comparant des plaquettes de souris *PKC δ ^{-/-}* et des plaquettes humaines traitées avec le rottlerin a démontré l'implication de PKC δ dans la sécrétion de granules denses GPVI-dépendante et PAR-dépendante (Chari, Getz et al. 2009) (plus de détails dans la section 4).

Bien que la PKC θ n'ait, semble-t-il, aucun rôle dans la mégacaryopoïèse et la libération des plaquettes (Kostyak and Kunapuli 2014), elle est considérée comme un isoforme impliqué dans la sécrétion des granules plaquettaires. L'interaction entre la PKC θ et Btk module la sécrétion de 5-HT. Suite à l'activation des plaquettes *via* les récepteurs GPVI et GPIb-IX-V, la Btk, qui se trouve en aval dans la cascade de signalisation intracellulaire, joue le rôle de régulateur négatif sur la PKC θ ainsi que sur la sécrétion de 5-HT (Crosby and Poole 2002). Une étude a stipulé que la PKC θ a un double rôle dans la régulation de la sécrétion des granules. Dans les plaquettes de souris *PKC θ ^{-/-}* la sécrétion des granules α GPVI-dépendante est significativement augmentée, alors qu'aucun effet n'est observé au niveau des granules denses (Hall, Harper et al. 2008). D'autre part, la PKC θ régule positivement la sécrétion de granules α induite par la thrombine (Cohen, Braiman et al. 2009).

Le rôle de la PKC ϵ dans les plaquettes n'est pas assez bien documenté. Une étude a suggéré que dans les plaquettes de souris *PKC ϵ ^{-/-}*, une inhibition de la sécrétion des granules denses est marquée suite à l'activation de la GPVI avec le collagène, ce qui n'est pas le cas dans les plaquettes activées par la thrombine. Il a été proposé que cet effet serait lié à une réduction de la phosphorylation de protéines en aval du GPVI, telles que FcR γ , Syk et PLC γ 2, et donc une

réduction du DAG et du calcium intracellulaire (Pears, Thornber et al. 2008). Récemment, il a été démontré qu'en régulant l'activité de RhoA, la PKC ϵ serait responsable de la modulation de la formation *in vitro* des pro-plaquettes (Gobbi, Mirandola et al. 2013).

Finalement, un isoforme moins étudié, la PKC η , a été identifié dans une étude démontrant que l'ADP stimule PKC η par l'activation du récepteur P2Y₁, mais pas P2Y₁₂. Cette activation de PKC η semble être nécessaire au mécanisme de la génération du TXA₂ (Bynagari, Nagy et al. 2009). Par contre, ces résultats restent un sujet de débat, puisqu'il a été également rapporté que l'inhibition de la PKC η induit la production de TXA₂ (Harper and Poole 2010).

3.3.3 Les PKCs dans l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus

Toutes les études menées sur le rôle des PKCs dans les plaquettes visent à démontrer un lien entre la fonction plaquettaire et la formation d'un thrombus. Certains isoformes de la PKC ont suscité plus d'intérêt que d'autres en raison de leur forte expression et/ou leur rôle dans la physiologie des plaquettes. L'activation de la GPIIb/IIIa est à la base de l'agrégation fibrinogène-dépendante. En général, les PKCs sont considérées comme des régulateurs qui stimulent l'agrégation plaquettaire *via* le récepteur GPIIb/IIIa (Strehl, Munnix et al. 2007).

Comme rapporté dans plusieurs études, la PKC α , impliquée dans le mécanisme « *inside-out* » par l'activation du récepteur GPIIb/IIIa, est nécessaire à l'agrégation plaquettaire et à la formation de thrombus. De plus, les plaquettes de souris *PKC α ^{-/-}* ne peuvent pas former de thrombus, alors qu'aucun effet n'a été enregistré sur l'adhésion de ces plaquettes (Tabuchi, Yoshioka et al. 2003) (Konopatskaya, Gilio et al. 2009). Plus récemment, la PKD2 a été identifiée comme un médiateur de l'agrégation plaquettaire, située en aval du mécanisme signalétique intracellulaire de la PKC α et régulée par cette dernière (Konopatskaya, Matthews et al. 2011). La PKC α joue également un rôle important dans l'activation des récepteurs GPVI et GPIb-IX-V. Cette étude a démontré que la PKC α interagit avec Syk et régule la phosphorylation de Src pour stimuler l'agrégation plaquettaire (Pula, Crosby et al. 2005).

Un autre isoforme important dans l'agrégation plaquettaire est la PKC θ . Une étude a démontré que l'agrégation plaquettaire, suite à l'activation de PAR-4 avec la thrombine, est inhibée dans les plaquettes de souris *PKC θ ^{-/-}*, ce qui est probablement lié à une inhibition de la sécrétion des granules α (Cohen, Braiman et al. 2009). Par contre, une autre équipe de recherche a suggéré que l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus sont régulées négativement par la PKC θ suite à l'activation de la GPIIb/IIIa collagène-dépendante. Le rôle de la PKC θ dans la fonction plaquettaire semble être alors agoniste-spécifique (Hall, Harper et al. 2008).

En ce qui concerne la PKC β , une étude a décrit l'interaction de cette kinase avec son récepteur RACK1 et leur implication dans les phases primaires de la signalisation *via* la GPIIb/IIIa (Buensuceso, Obergfell et al. 2005).

La PKC ϵ , quant à elle, semble être impliquée dans la sécrétion et l'agrégation des plaquettes de souris activées par la GPVI, plus spécifiquement au niveau de la chaîne FcR γ de ce récepteur (Pears, Thornber et al. 2008).

Pour ce qui est de la PKC δ , objet de notre étude, plusieurs rôles dans la fonction plaquettaire *via* les récepteurs GPVI, les PARs ainsi que le complexe GPIb-IX-V lui ont été attribués. La section 3.4 de ce chapitre détaille davantage les rôles distinctifs de cet isoforme.

La figure 3.3 ci-dessous résume les voies de signalisation menant à l'activation des PKCs.

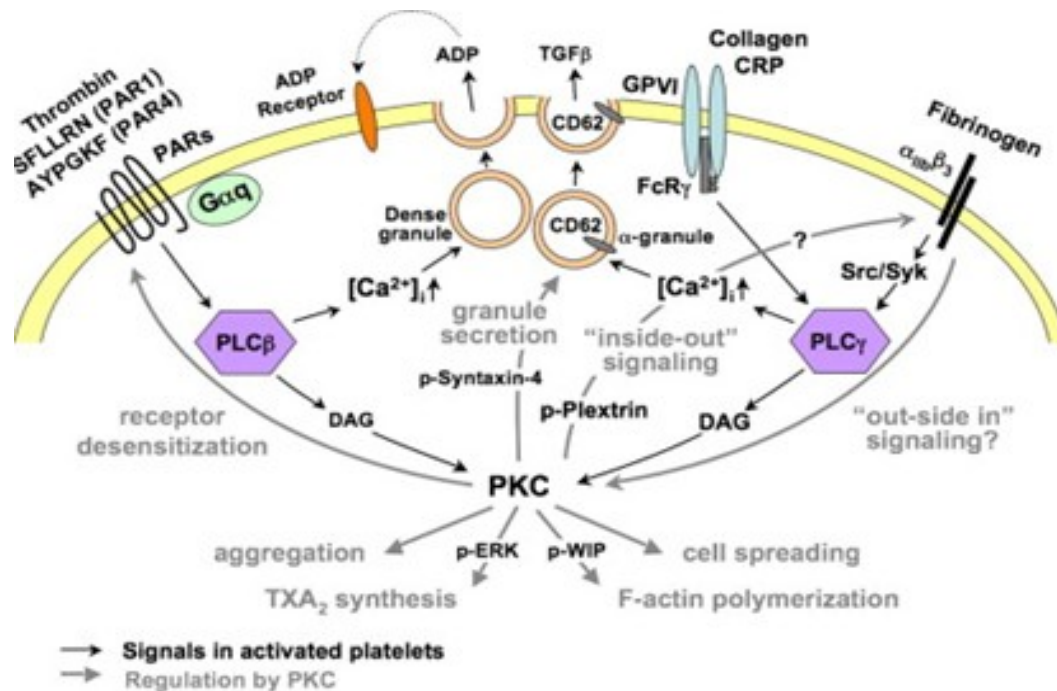


Figure 3.3: Représentation schématique des mécanismes moléculaires de l'activation des PKCs. La voie d'activation endogène débute suite à l'activation d'un récepteur membranaire et à la production subséquente du DAG par l'action de la PLC. Le DAG favorise la translocation des PKC vers la membrane où elles peuvent, par la suite, interagir avec le Ca^{2+} et la phosphatidylsérine (PS). La formation de ce complexe induit un changement de conformation structurale permettant la liaison et la phosphorylation des substrats des PKCs (adaptée d'après Cohen S *et al. FEBS Lett.* 2011).

3.3.4 Les PKCs comme cible thérapeutique

La régulation différentielle des isoformes de la PKC, leurs réponses à différents agonistes et leurs spécificités sont d'une importance accrue au niveau des études sur la thérapie antiplaquettaire et anti-thrombotique. L'inhibition génétique des PKCs est considérée comme étant une approche thérapeutique pour réduire l'activité de ces enzymes et moduler la fonction plaquettaire à différents stades de l'agrégation et de la formation de thrombus. D'autre part, des composés pharmacologiques sont à l'étude afin de déterminer leur potentiel inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. Un exemple est l'aprinocarsen, un oligonucléotide anti-sens à la PKC α bloquant la transcription de la kinase, qui est passé en phase d'études fondamentales et cliniques

et qui a démontré un potentiel inhibiteur de cette kinase par la réduction de la formation de thrombus (Konopatskaya, Gilio et al. 2009).

3.4 Caractéristiques distinctives de l'isoforme PKC δ

La PKC δ joue un rôle complexe dans les plaquettes, en ayant à la fois des rôles opposés (positif et négatif) dans la régulation de la signalisation intracellulaire. Elle est impliquée dans le mécanisme de l'agrégation plaquettaire *via* les récepteurs GPVI et GPIb-IX-V (figure 3.4). La famille des kinases Src joue un rôle important dans la signalisation *via* le récepteur GPVI, responsable de la phosphorylation de la chaîne FcR γ . La PKC δ est associée à Fyn, une protéine membre de la famille des kinases Src, et bloque l'agrégation plaquettaire. Lorsque ces récepteurs sont stimulés avec l'alboaggregin-A, un venin de serpent, la PKC δ et Fyn s'associent pour induire une réponse intracellulaire. Cette association est inhibée par la protéine phosphatase-1 (PP1), un inhibiteur de la famille des Src kinases qui inhibe la phosphorylation de tyrosine de la PKC δ induite par l'alboaggregin-A. Par contre, l'activation de Fyn semble être régulée par un autre isoforme de la famille des PKCs (Crosby and Poole 2003).

L'agrégation plaquettaire induite *via* la PKC δ est essentiellement médiée par la génération du TXA $_2$ suite à l'activation collagène-dépendante de la GPIIb/IIIa (Yacoub, Theoret et al. 2006).

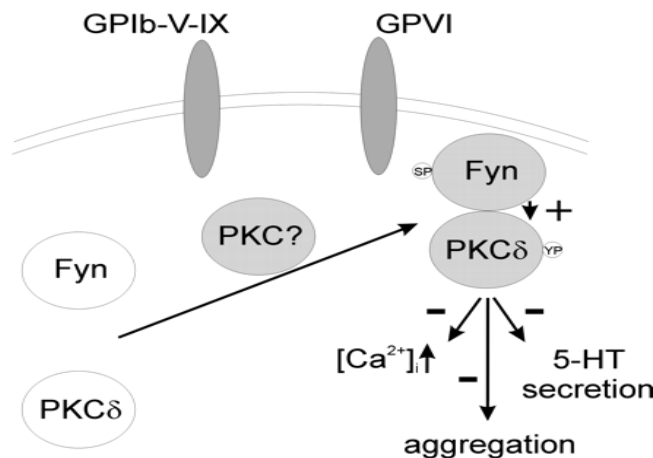


Figure 3.4: Schématisation du rôle de la PKC δ dans l'activation plaquettaire à l'alboaggregine. Suite à l'activation des récepteurs GPVI et GPIb-IX-V, la PKC δ interagit avec Fyn pour réguler

négativement la sécrétion de sérotonine, la concentration en Ca^{2+} intracellulaire et l'agrégation (Crosby D and Poole W. *JBC*. 2003).

L'activation plaquettaire par le collagène et la thrombine, qui active les récepteurs PAR-1 et PAR-4, induit la phosphorylation de la PKC δ sur le résidu Tyr³¹¹. De plus, il a été mis en évidence que l'activation plaquettaire par la thrombine phosphoryle également le résidu Tyr⁵⁶⁵. La phosphorylation de ces deux résidus dépend de la kinase Src et de la PLC.

Le rôle attribué à la PKC δ dans la régulation de la sécrétion granulaire a été proposé d'abord sur la base des effets rapportés avec un inhibiteur non spécifique de la PKC δ (rottlerin, aussi nommé mallotoxin). Dans les plaquettes humaines, le rottlerin augmente la sécrétion granulaire en réponse au collagène, mais inhibe la libération des granules suite à l'activation de PAR-1 et PAR-4, ce qui suggère que la PKC δ régule la sécrétion des granules denses dépendamment de la nature de l'agoniste (Murugappan, Tuluc et al. 2004). Ces effets, par contre, n'ont pas été enregistrés chez la souris. Cependant, de nombreuses critiques ont été soulevées concernant la spécificité et le mécanisme d'action de rottlerin (Soltoff 2007).

En revanche, Chari *et al.*, à l'aide d'un inhibiteur spécifique de la translocation de la PKC δ à la membrane (δ (V1-1)TAT), ont pu reproduire, aussi bien dans les plaquettes humaines que murines, les résultats observés par le rottlerin. Autrement dit, une augmentation de la sécrétion des granules denses GPVI-dépendante ainsi qu'une inhibition suite à une stimulation des PAR-1 et -4. Chari *et al.* (Chari, Getz et al. 2009) indiquent que cette inhibition de la sécrétion a été seulement observée à des concentrations sous-maximales de TRAP-4, alors qu'à des concentrations plus élevées, aucun effet n'a été enregistré, ce qui suggère l'implication d'autres voies de signalisation qui peuvent compenser l'absence de l'activité de PKC δ .

Les mécanismes qui pourraient expliquer cette régulation différentielle de granule de sécrétion par la PKC δ en aval du GPVI et des récepteurs couplés aux protéines G sont encore mal connus. Il est bien établi que la phosphorylation de PKC δ par la tyrosine kinase Lyn se produit en aval de la GPVI mais pas des PARs, et que Lyn et PKC δ ensemble régulent la phosphorylation de SHIP1 tout dépendamment de la nature de l'agoniste (Chari, Kim et al. 2009). Ceci est cohérent avec la régulation négative de la signalisation $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ par un complexe Lyn-SHIP1

(Maxwell, Yuan et al. 2004), ce qui pourrait expliquer les rôles différentiels de PKC δ dans la signalisation en réponse au collagène et à la thrombine.

Récemment, l'équipe de Kunappuli a découvert le CGX1037, une petite molécule inhibitrice de la phosphorylation de la PKD2 qui est un substrat de la PKC δ . Le prétraitement des plaquettes isolées par le CGX1037 a confirmé les rôles de la PKC δ dans la sécrétion des granules denses en aval des récepteurs PAR-4 et GPVI (Bhavanasi, Kostyak et al. 2015).

D'autre part, une étude a suggéré que la PKC δ interagit avec VASP et joue un rôle négatif dans la formation de filopodes et conséquemment dans l'agrégation plaquettaire collagène-dépendante (Pula, Schuh et al. 2006). En effet, la PKC δ se trouve à interagir constitutivement avec VASP, phosphoryle le résidu Ser¹⁵⁷ de ce dernier, et bloque ainsi la formation de filopodes induisant même une rétraction. Dans les plaquettes de souris déficientes en PKC δ (*PKC δ ^{-/-}*) et en VASP (*VASP^{-/-}*), une augmentation de la formation de filopodes a été observée (Pula, Schuh et al. 2006), alors qu'une déficience en PKC δ semble ne pas avoir d'effet sur la formation de thrombus (Chari, Getz et al. 2009).

La PKC δ pourrait également représenter une cible thérapeutique importante dans les thrombocytopénies. Nous avons en effet observé chez nos souris déficientes en PKC δ une numération plaquettaire nettement supérieure à celle des souris WT, laissant croire que la PKC δ pourrait jouer un rôle dans la mégacaryopoïèse. Depuis peu, une étude a révélé que des souris *PKC δ ^{-/-}* ont la capacité de se rétablir beaucoup plus rapidement après une thrombocytopénie immunitaire que des souris WT, indiquant que la PKC δ est un médiateur de la préformation des plaquettes. Ainsi, Cette régulation par la PKC δ semble-t-elle thrombopoïétine-dépendante (Kostyak, Bhavanasi et al. 2014).

En résumé, les PKCs sont activement impliquées dans la physiologie plaquettaire et les principaux récepteurs membranaires, tels que le GPVI, le GPIb-IX-V et les PARs, déclenchent tous l'activation de mécanismes signalétiques dépendants des PKCs. Cependant, la contribution des divers isoformes de PKCs dans la fonction plaquettaire demeure encore mal définie, et le défi principal se rapportant à ce domaine d'étude vise justement à élucider les différents mécanismes de régulation qui découlent de chacun de ces isoformes.

Chapitre 4: Projet de recherche

4.1 Introduction

Les plaquettes participent à l'hémostase normale mais occupent aussi une place fondamentale dans le développement et la progression de plusieurs pathologies thrombotiques et inflammatoires. Tel que discuté précédemment dans ce manuscrit, la plaquette possède une machinerie moléculaire et cellulaire assez développée lui conférant un rôle majeur dans plusieurs événements athéro-thrombotiques menant généralement à divers événements cardiovasculaires et plus particulièrement au syndrome coronarien aigu (SCA) caractérisé par l'obstruction d'une ou de plusieurs artères coronaires. Par ailleurs, la famille des PKCs est activement impliquée dans la physiologie plaquettaire et les principaux récepteurs membranaires, tels que le GPVI, le complexe GPIIb-IIIa et les PARs, déclenchent tous l'activation de mécanismes signalétiques qui dépendent des PKCs. Cependant, la contribution des diverses isoformes de PKCs dans la fonction plaquettaire demeure encore mal définie et le défi principal se rapportant à ce domaine d'étude vise justement à élucider les différents mécanismes de régulation qui découlent de chaque isoforme de la famille des PKCs.

4.2 Problématique

Les maladies cardiovasculaires constituent une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde. Le lien étroit entre l'inflammation, la coagulation et les plaquettes est à la base de la progression de l'athérosclérose (Borissoff, Spronk et al. 2011), une maladie inflammatoire complexe et dégénérative caractérisée par l'accumulation de cellules inflammatoires au niveau de l'intima des artères (Lindemann, Kramer et al. 2007). Ces composantes du système inflammatoire contribuent à la déstabilisation et à la rupture ou l'érosion des plaques athérosclérotiques entraînant une occlusion thrombotique vasculaire aux stades avancés de l'athérosclérose (Lindemann, Kramer et al. 2007, Borissoff, Spronk et al. 2011). Les complications thromboemboliques résultant de cette rupture sont responsables de la majorité des syndromes coronariens aigus (angine de poitrine instable, infarctus du myocarde,...), des accidents vasculaires cérébraux et des thromboses vasculaires périphériques. Le rôle majeur des plaquettes dans la phase initiale de la formation d'un thrombus après rupture de plaque d'athérome en a fait la cible idéale des médicaments antiplaquettaires utilisés en prévention secondaire d'un événement athérothrombotique.

Actuellement, trois grands types d'antiplaquettaires puissants sont utilisés en clinique, notamment les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase (aspirine), les thiéno-pyridines (clopidogrel) et les antagonistes de l'intégrine α IIb β 3 (abciximab). Malgré les effets bénéfiques enregistrés suite au traitement par ces drogues, la prévalence des thromboses reste élevée. De surcroît, le risque de saignement associé à la prise de ces médicaments ainsi que la résistance à l'aspirine et au clopidogrel chez certains patients, incitent de nombreux chercheurs à trouver d'autres traitements alternatifs.

Comme élaboré dans la section 6 du premier chapitre de ce manuscrit, le récepteur GPIIb α vu sa propriété d'interagir avec plusieurs ligands à des sites de liaison différents, ainsi que son rôle majeur dans l'adhésion des plaquettes aux sites de lésions vasculaires, représente aujourd'hui une cible thérapeutique de premier choix. En effet, le blocage de l'interaction VWF-GPIIb α par le GPG-290 ou par l'ARC1779, un aptamère thérapeutique bloquant la liaison du domaine A1 du VWF au récepteur GPIIb alpha, semble être une alternative efficace dans la prévention de la formation du thrombus sous forces de cisaillement élevées, sans induire des hémorragies (Hennan, Swillo et al. 2006, Diener, Daniel Lagasse et al. 2009, Arzamendi, Dandachli et al. 2011, Brill, Fuchs et al. 2011). Cependant, peu d'études sur l'interaction thrombine-GPIIb α ont été réalisées.

Une autre approche antithrombotique consisterait à cibler des protéines des voies de signalisation intracellulaires. En effet, plusieurs chercheurs se sont penchés sur les membres de la famille de PKC qui semblent être impliqués dans la signalisation en aval du GPIIb α (Kroll, Hellums et al. 1993), et qui jouent un rôle central dans la régulation des voies de signalisation plaquettaires.

Dans cette perspective, nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle de l'axe thrombine-GPIIb α -PKC δ dans la fonction plaquettaire.

4.3 Hypothèse principale et objectifs

Les plaquettes jouent un rôle primordial dans le développement des maladies cardiovasculaires. La thrombine, un puissant activateur plaquettaire, est actuellement la pierre d'achoppement des traitements anti-thrombotiques. En effet, ni l'aspirine ni le clopidogrel ne peuvent inhiber l'activation des plaquettes due à la thrombine. Par ailleurs, la thrombine demeure

enzymatiquement active dans le thrombus alors que l'ADP et le TXA₂ ont une demi-vie très courte. La thrombine reconnaît sur la plaquette trois principaux récepteurs, soit le PAR-4 (faible affinité), le PAR-1 (moyenne affinité) ainsi que le GPIIb/IIIa (haute affinité).

Le GPIIb/IIIa pourrait être en mesure de réguler, en réponse à la thrombine, la fonction plaquettaire par l'intermédiaire de partenaires intracellulaires jouant un rôle central dans la signalisation plaquettaire notamment les PKCs. *In extremis*, les médiateurs secondaires tels que l'ADP et le TXA₂ pourraient être également impliqués dans cette voie de signalisation thrombine-GPIIb/IIIa-PKC δ . En se basant sur des études antérieures et des résultats préliminaires, nous avons émis l'hypothèse principale que l'axe thrombine-GPIIb/IIIa-PKC δ régulerait négativement la fonction plaquettaire et conséquemment la formation du thrombus. Afin de valider cette hypothèse, nous avons poursuivi les principaux objectifs suivant :

I- Évaluer *in vitro* le rôle de l'axe thrombine-GPIIb/IIIa-PKC δ dans l'agrégation et l'activation plaquettaires en utilisant deux approches, pharmacologique (δ (V1-1)TAT) et génétique (souris PKC δ ^{-/-}).

II- Étudier *in vivo* le rôle de cet axe dans les réactions thrombotiques en examinant chez la souris, le temps de saignement et la formation des micro-embolies pulmonaires en réponse à de faibles doses de thrombine.

III- Déterminer l'implication du TXA₂ et de la voie des MAPK dans la régulation de fonction plaquettaire contrôlée par l'axe thrombine-GPIIb/IIIa-PKC δ .

Chapitre 5: Contribution scientifique

Mise en contexte pour le premier article:

La PKC δ régule négativement l'activation et l'agrégation des plaquettes humaines en réponse à la thrombine par l'entremise de la p38 MAPK, Erk1/2 et TXA₂ en aval du récepteur GPIb α

Le récepteur GPIb α assure une fonction clé en hémostase en se liant au VWF, ce qui permet le recrutement des plaquettes circulantes au niveau d'une lésion vasculaire. Cette adhésion plaquettaire s'accompagne d'une signalisation intracellulaire, propre au GPIb α , en réponse au VWF immobilisé sur une surface et qui se traduit par le changement de forme des plaquettes et l'émission de filopodes. Le GPIb α est aussi un récepteur de haute affinité pour la thrombine. Cette interaction a fait l'objet de plusieurs débats puisque nombreux investigateurs en ont réduit le rôle à la présentation de la thrombine à son récepteur approprié le PAR-1, alors que d'autres études ont montré que le GPIb α est capable, à lui seul, d'induire un signal intracellulaire indépendamment des PARs en réponse à la thrombine. L'analyse des mécanismes par lesquels le récepteur GPIb α régule la fonction plaquettaire en réponse à la thrombine est nécessaire à la compréhension de son fonctionnement et à l'établissement de nouvelles thérapies sélectives. L'objectif général de ce travail consistait justement à décortiquer la voie de signalisation induite par l'interaction thrombine-GPIb α tout en identifiant les partenaires intracellulaires qui y sont impliqués.

Contribution des auteurs

Younes Zaid: Planification et exécution de la majorité des expériences, montage des figures, rédaction et correction de l'article.

Ahmed Hachem: Planification et exécution de quelques expériences, analyse des données et correction de l'article.

Daniel Yacoub: Planification des expériences, réalisation de quelques expériences, analyse des données et correction de l'article.

Rahma Mrad: Participation aux techniques liées à l'agrégation plaquettaire.

Catherine Martel: Participation aux techniques liées à la cytométrie en flux.

Louis Villeneuve: Participation aux techniques liées à la microscopie confocale.

Marie Lordkipanidzé: Analyse des données et correction de l'article.

Walid Mourad: Codirection générale.

Yahye Merhi: Conception du projet de recherche et supervision générale.

ORIGINAL ARTICLE

PKC δ negatively regulates thrombin-induced platelet activation and aggregation *via* p38 MAPK, Erk1/2 and TXA₂ downstream of GPIb α

Y. ZAID, * A. HACHEM, * R. MRAD, * D. YACOUB, † C. MARTEL, * L. VILLENEUVE, * M. LORDKIPANIDZÉ, *‡ W. MOURAD, †§ Y. MERHI *§

** Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada; † Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; ‡ Université de Montréal, Faculty of Pharmacy, Montreal, Quebec, Canada; § Université de Montréal, Faculty of Medicine, Montreal, Quebec, Canada.*

Correspondence to Yahye Merhi, PhD, Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8; Tel: +514 376-3330 ext. 3035, Fax: +514 376-1355

Short title: GPIb α and PKC δ in platelet function

Word count of abstract: 229

Word count of body: 3344

Total number of figure: 7

Summary

Background: The protein kinase C (PKC) family is essential for platelet function in response to thrombin, which signals and activates platelets *via* protease-activated receptors (PARs) and GPIb α , the low/medium and high affinity receptors in human platelets, respectively. PKC δ positively and negatively regulates platelet function depending on the nature of the stimulus. However, its importance in platelet function in response to thrombin downstream of GPIb α remains unknown.

Objectives: We aimed to determine the involvement of the thrombin/GPIb α /PKC δ axis in platelet signaling and to investigate the relevance of this axis in regulating platelet function.

Methods and Results: In human platelets, pre-treatment with the specific PKC δ inhibitor δ (V1-1)TAT significantly potentiated platelet activation and aggregation in response to a priming concentration of α -thrombin, but not to γ -thrombin or PAR agonists. This potentiation process was associated with enhanced granule secretion, TXA₂ generation and PKC δ phosphorylation on Tyr³¹¹, all of which were prevented by GPIb α blockade. Moreover, inhibition of p38 MAPK, Erk1/2 and TXA₂ reverses the potentiation of platelet aggregation induced by a priming dose of thrombin, following PKC δ inhibition.

Conclusions: These results show for the first time that PKC δ negatively regulate platelet function downstream of GPIb α in response to thrombin. These findings highlight a new inhibitory mechanism in the regulation of platelet function that could be the basis for translational research and drug development, thereby targeting the management of thrombotic events in cardiovascular diseases.

Keywords: platelets; protein kinase C-delta; GPIb-alpha; thrombin; TXA₂, p38 MAPK, Erk1/2.

Introduction

Platelets are central mediators of physiological hemostasis and pathological thrombosis in response to vascular injury, promoting atherothrombosis. Indeed, anti-platelet agents are essential elements in the clinical management of patients with acute coronary syndrome (ACS). However, these agents do not inhibit all pathways involved in platelet activation and aggregation, and their efficiency is hampered by increased risk of bleeding complications (Michelson 2011). Platelet function is mediated by specific cell adhesion molecules and receptors that induce activation and adhesion to other platelets, leukocytes, endothelial cells and the extra-cellular matrix (Varga-Szabo, Pleines et al. 2008). The initial binding of platelets to damaged blood vessels does not require activation; it is predominantly mediated by the interactions of platelet glycoprotein (GP) complex Ib-IX-V with von Willebrand factor (VWF) at high shear (Berndt, Shen et al. 2001), and GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$ integrin) and GPVI with collagen at low shear (Clemetson and Clemetson 2001). This in turn, induces signaling events that lead to platelet aggregation through GPIIb/IIIa (α IIB β 3 integrin) activation and binding to fibrinogen (Bledzka, Smyth et al. 2013). Signaling in platelets is induced by the adhesion process itself and by several specific agonists of platelet receptors that provoke activation and granule secretion. Thrombin, one of the most potent agonists, activates platelets mainly through protease-activated receptors (PAR-1 and PAR-4 on human platelets) (Leger, Covic et al. 2006) and GPIb α (Canobbio, Balduini et al. 2004), which constitute the medium, low and high-affinity thrombin receptors in human platelets, respectively. PAR-3 is predominantly found on mouse platelets (instead of PAR-1), albeit low levels of this receptor have also been detected on human platelets (Schmidt, Nierman et al. 1998). Nevertheless, PAR-3 mainly acts as a cofactor for PAR-4 activation in response to thrombin, rather than an intrinsic signalling receptor (Nakanishi-Matsui, Zheng et al. 2000). Thrombin induces inside-out signaling through activation of phospholipase C (PLC β and γ) (Guinebault, Payrastre et al. 1994), which hydrolyzes phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to generate the second messengers 1,2-diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). In turn, IP3 triggers release of intracellular Ca²⁺, while DAG activates PKCs (Varga-Szabo, Pleines et al. 2008). At least five PKC isoforms (α , β , δ , θ , and η) are found in human platelets, and it is presumed that each individual isoform plays one or more distinct role in platelet function (Harper and Poole 2010). Among these, PKC δ has been shown to play dichotomous roles in platelets by negatively or positively influencing platelet function (Yacoub, Theoret et al. 2006, Chari, Getz et al. 2009), depending on the platelet agonists and their receptors.

The platelet GPIb-IX-V complex is required for platelet adhesion, as demonstrated by the increased bleeding time seen in patients suffering from the Bernard-Soulier syndrome, who are deficient for the GPIb-IX-V complex (Clemetson and Clemetson 1994). Although VWF represents the main GPIb α ligand, additional ligands of significant importance have been described, namely thrombin (Canobbio, Balduini et al. 2004). Indeed, GPIb α contains a high affinity binding site for thrombin within its extracellular domain adjacent to the VWF binding site (Sixma, Schiphorst et al. 1991). Thrombin binding to the N-terminal region of GPIb α (His1-Glu282) is inhibited by the anti-GPIb α antibodies VM16d and SZ2 that map to the C-terminal flanking sequence 226 to 268 and to the anionic/sulfated tyrosine sequence 269 to 282 of GPIb α , respectively (Andrews and Berndt 2013). The crystal structure of the α -thrombin/GPIb α complex has already been modeled (De Marco, Mazzucato et al. 1994, Dumas, Kumar et al. 2003), and this complex appears to be involved in platelet function (Ward, Andrews et al. 1996, Mazzucato, Marco et al. 1998). Although several authors have argued that PAR-1 and PAR-4 signaling are sufficient to explain all aspects of platelet activation by thrombin (Coughlin, Vu et al. 1992, Liu, Freedman et al. 1997), others have highlighted the contribution of GPIb α in thrombin-mediated signaling, albeit its exact contribution to this signaling as well as the underlying cellular mechanisms remain unknown (De Marco, Mazzucato et al. 1991, Berndt, Shen et al. 2001). Understanding such a pathway could be important, in particular when PAR antagonists are used as anti-platelet agents during the management of patients with ACS, because current PAR antagonists do not interfere with thrombin binding to platelet GPIb α .

This study was designed to investigate the implication of PKC δ in platelet function in response to thrombin stimulation *via* GPIb α . Our results show that PKC δ negatively regulates platelet function downstream of GPIb α in response to priming concentrations of thrombin. The thrombin/GPIb α /PKC δ axis may thus represent a critical regulator of platelet function and hemostasis, and dysfunction of this pathway could lead to adverse thrombotic disorders.

Material and methods

PKC δ inhibitor peptide

PKC δ membrane translocation was selectively inhibited by the δ (V1-1)TAT peptide (Chen, Hahn et al. 2001, Inagaki, Chen et al. 2003). The PKC δ δ (V1-1) interacting sequence of the receptors for activated C kinases (SFNSYELGSL) was coupled to the TAT HIV membrane permeable sequence

(YGRKKRRQRRR) through a cysteine-cysteine bridge. Peptide sequencing was performed at CanPeptide. A scrambled sequence of δ (V1-1) (YGRKKRRQRRR/FSNLYLSESG) (CanPeptide) and a specific PKC α inhibitor peptide α (V5-3)TAT (YGRKKRRQRRR/QLVIAN) (Genscript Corp.) were also synthesized and used as controls.

Preparation of human platelets

Venous blood was drawn from healthy volunteers, free from medication known to interfere with platelet function for at least 20 days before the experiment. The protocol was approved by the human ethical committee of the Montreal Heart Institute in accordance with the declaration of Helsinki for experiments involving humans. Washed platelets were prepared as previously described (Yacoub, Hachem et al. 2010), adjusted to $250 \times 10^6/\text{mL}$ and allowed to rest at 37°C for 30 minutes before further manipulation. For aggregation experiments with ristocetin (Chrono-log Corp.), platelet rich plasma (PRP) was used.

Measurement of platelet aggregation

Aggregation of human and mouse platelets was monitored on a four-channel optical aggregometer (Chronolog Corp.) under shear at 37°C , until stabilization of platelet aggregation. Platelets were pre-incubated with $\delta(\text{V1-1})\text{TAT}$ or its vehicle for 5 minutes at 37°C prior to the addition of a platelet agonist: bovine α -thrombin (Sigma-Aldrich), γ -thrombin (PAR-1 and PAR-4 agonist, but unable to bind GPIIb α) from Abcam, and the TRAP-1 (SFLLRN, PAR-1 agonist) and TRAP-4 (AYPGKF, PAR-4 agonist) peptides (Peptides International). The scrambled sequence of the $\delta(\text{V1-1})\text{TAT}$ peptide or a specific PKC α inhibitor were used as controls. Blockade of thrombin binding to the N-terminal region of GPIIb α (His1-Glu282) was achieved by two different blocking antibodies (VM16d or SZ2) that inhibit the thrombin binding site on GPIIb α (Mazurov, Vinogradov et al. 1991, Dormann, Clemetson et al. 2000, Celikel, McClintock et al. 2003). The mouse anti-human antibody, clone VM16d (Abcam, dialyzed against PBS in our laboratory to remove sodium azide), maps the C-terminal flanking sequence 226 to 268 of GPIIb α ; whereas the mouse-anti-human antibody, clone SZ2 (Beckman Coulter, sodium azide free) targets the anionic/sulfated tyrosine sequence 269 to 282 of GPIIb α (Andrews and Berndt 2013). The specific isotype IgG of these antibodies were used as controls. The p38 MAPK inhibitor (SB203580, Millipore), the Erk1/2 inhibitor (U0126, Millipore) or the COX inhibitor (Indomethacin, Calbiochem) were used. We also used the rat anti-mouse antibody, clone Xia.B2 (Emfret Analytics) that recognizes and blocks GPIIb α on mouse platelets (Adam, Kauskot et al. 2010).

Western blotting

Platelets were stimulated with thrombin in the presence of $\delta(\text{V1-1})\text{TAT}$ or its vehicle and/or an anti-GPIIb α blocking antibody for the appropriate time under shear conditions at 37°C . The reaction was

stopped by adding the appropriate volume of 4 x Laemmli buffer. Platelet lysates were analyzed by SDS-PAGE using antibodies against phospho-PKC δ (Tyr³¹¹ or Thr⁵⁰⁵), phospho-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) or phospho-Erk1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) (Cell Signaling Technology) (Hachem, Yacoub et al. 2012). To assess equal amounts of protein loading, membranes were stripped and blotted for total PKC δ (Cell Signaling Technology) or actin (Santa Cruz Biotechnology).

Confocal microscopy

Platelets were stimulated for 5 minutes at 37°C with α -thrombin in the presence of δ (V1-1)TAT or its vehicle and/or the anti-GPIb α blocking antibody, fixed with paraformaldehyde and allowed to immobilize on poly-L-lysine-coated coverslips. Adhered platelets were permeabilized with Triton X-100. Platelets were then incubated with the rabbit anti-human polyclonal anti-PKC δ antibody (Abcam) and the mouse anti-human monoclonal antibody against α -tubulin (Santa Cruz Biotechnology), washed and labeled with anti-rabbit IgG–Alexa 555 and anti-mouse IgG Alexa-488 secondary antibodies. A series of fluorescent confocal images (Z-stacks) were acquired with a LSM-510 confocal microscope (Zeiss).

Granule secretion

P-selectin (CD62P) translocation to the platelet surface from α -granule stores was measured by flow cytometry as previously described (Yacoub, Hachem et al. 2010). Briefly, human platelets were stimulated with α -thrombin in the presence of δ (V1-1)TAT or its vehicle and/or an anti-GPIb α blocking antibody, fixed, washed and stained with saturating concentrations of anti-CD62P PE-conjugated antibody (BD Biosciences) or its isotype-matched control IgG. Platelets were analyzed on an Altra flow cytometer (Beckman Coulter).

ATP release was measured by a Lumi-Aggregometer according to the manufacturer's instructions (Chrono-log Corp.) (Yacoub, Hachem et al. 2010). Dense granule release was measured by mepacrine uptake and its subsequent release by activated platelets (Wall, Buijs-Wilts et al. 1995).

Thromboxane A₂ measurement

Platelets were stimulated with α -thrombin in the presence of δ (V1-1)TAT or its vehicle and/or an anti-GPIb α blocking antibody for 5 minutes under shear conditions at 37°C. The reaction was stopped by adding ice-cold EDTA (1 mmol/L) and indomethacin (50 μ mol/L) mixture. Samples were then

centrifuged at 3000 g for 5 minutes at 4°C and supernatants were stored at -20°C for further analysis. Supernatants were assayed for the presence of thromboxane B₂ (TXB₂), the stable metabolite of TXA₂, using a correlate-EIA TXB₂ enzyme immunoassay kit (Enzo Life Sciences), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Results are presented as mean ± SEM of at least 3 independent experiments. Statistical comparisons were done using a one-way ANOVA, followed by a Dunnett's test for comparison against a single group. Data with $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

PKC δ negatively regulates human platelet aggregation induced by low doses of α -thrombin

As thrombin signaling in human platelets is mediated by its high-, medium- and low-affinity receptors (GPIb α , PAR-1 and PAR-4, respectively), α -thrombin at different doses was first used to investigate the role of PKC δ in platelet aggregation. As shown in figure 1A, pre-treatment with the specific PKC δ membrane translocation inhibitor δ (V1-1)TAT, but not its scrambled peptide, significantly potentiates platelet aggregation in response to low doses (0.0125 and 0.025 U/mL) of α -thrombin, while higher doses (0.05 and 0.1 U/mL) were unaffected. In contrast, the specific PKC α inhibitor peptide was without effect on platelet aggregation (Fig. 1B). The dose of 0.0125 U/mL of α -thrombin that does not trigger platelet aggregation alone was considered as the priming dose and used for the rest of experiments. Moreover, platelet aggregation in response to increasing concentrations of TRAP-1, TRAP-4, γ -thrombin or ristocetin-dependent binding of VWF (which binds a GPIb α site different from that which binds thrombin) (De Marco, Mazzucato et al. 1994) was unaffected by δ (V1-1)TAT treatment, indicating that this exacerbation effect is PAR- and VWF-independent (Fig. 1C). Of note, δ (V1-1)TAT alone showed no impact on platelet aggregation (Fig. S-I).

Role of GPIb α

Given that GPIb α represents the high-affinity receptor for thrombin, we sought to investigate its contribution to the regulation of platelet function by PKC δ . Our results show that specific blockade of the thrombin binding site on GPIb α , by either VM16d (Fig. 2A) or SZ2 (Fig. S-II) blocking monoclonal antibodies, entirely prevented the potentiation of thrombin-induced platelet aggregation when PKC δ is

inhibited, whereas a control IgG antibody had no effect on this process. Moreover, figure 2B shows that inhibition of TXA₂ generation significantly reduces $\delta(V1-1)$ TAT-induced potentiation of platelet aggregation in response to a priming concentration of α -thrombin, thereby indicating that GPIb α negatively regulates thrombin-induced platelet aggregation through PKC δ and TXA₂ generation. In order to confirm the inhibitory role of the thrombin/GPIb α /PKC δ axis in platelet function, we assessed the release of α and dense granules, as markers of platelet activation. Our results indicate that pre-treatment of human platelets with $\delta(V1-1)$ TAT significantly potentiates thrombin-induced α -granule release (CD62P expression) (Fig. 3) and dense granule secretion, as assessed by loss of mepacrine fluorescence (Fig. 4A) and ATP release (Fig. 4B), in a GPIb α -dependent manner. We further evaluated the implication of TXA₂ in this response. As shown in figure 4C, PKC δ inhibition also enhances TXA₂ formation in response to a priming concentration of α -thrombin, a process reversed by GPIb α blockage. Thus, GPIb α negatively regulates thrombin-induced platelet secretion through PKC δ .

Implication of p38 MAPK, Erk1/2 and TXA₂

To further decorticate the signaling mechanism involved in the negative regulatory role of PKC δ in thrombin-induced platelet aggregation, we assessed p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation as they have been shown to be implicated in GPIb α downstream signaling (Dubois, Steiner et al. 2003), (Canobbio, Reineri et al. 2004). As shown in figure 5A, when platelets are pretreated with $\delta(V1-1)$ TAT, phosphorylation of both p38 MAPK and Erk1/2 is increased in response to a priming dose of α -thrombin. As expected, specific inhibition of p38 MAPK and Erk1/2 entirely prevented the exacerbation effect in thrombin-induced platelet aggregation observed in response to PKC δ inhibition (Fig. 5B and 5C). Furthermore, we investigated the involvement of the secondary mediator TXA₂ as its secretion increased in response to PKC δ inhibition (Fig. 5D). For this purpose, platelets were pretreated with the COX inhibitor indomethacin. Figure 5D shows that inhibition of TXA₂ generation significantly reduces $\delta(V1-1)$ TAT-induced potentiation of platelet aggregation in response to a priming concentration of α -thrombin. Indomethacin had no effect on platelet aggregation induced by a high α -thrombin concentration (Fig. S-III).

PKC δ phosphorylation and cellular localization

PKC δ has multiple phosphorylation sites, among which Thr⁵⁰⁵ and Tyr³¹¹ are considered key regulators of its function. In this regard, we evaluated the phosphorylation of PKC δ on Tyr³¹¹ and

Thr⁵⁰⁵ in human platelets. Our results indicate that PKC δ is constitutively phosphorylated on Thr⁵⁰⁵ regardless of the treatments. However, phosphorylation of PKC δ on Tyr³¹¹ is significantly increased at both 1 and 5 minutes in response to a priming dose of α -thrombin, post δ (V1-1)TAT treatment, as compared to untreated cells, which was reversed by blockade of GPIb α (Fig. 6). It is worth mentioning that phosphorylation of PKC δ at Tyr³¹¹ in response to a high dose of α -thrombin (0.1 U/mL) was maximal and unchanged regardless of treatment (Fig. S-IV-A). On the other hand, confocal images demonstrate that δ (V1-1)TAT treatment inhibits relocalization of PKC δ to the membrane in response to a priming (Fig. 7) and high doses of α -thrombin (Fig. S-IV-B), thus confirming specificity of the inhibitor and suggesting the plasma membrane as the cellular compartment by which PKC δ negatively regulates thrombin-induced platelet function.

Discussion

Platelet GPIb α constitutes the high affinity receptor for thrombin in human platelets and it may represent a critical mediator of platelet activation and thrombus formation. This might be particularly important during the management of ACS, in cases where PAR antagonists are used as anti-platelet therapy. It has been previously shown that PKC δ can negatively and positively regulate platelet function in response to different platelet agonists, including thrombin (Crosby and Poole 2003, Pula, Schuh et al. 2006, Yacoub, Theoret et al. 2006, Chari, Getz et al. 2009). Therefore, this work was designed to study platelet function in response to thrombin *via* GPIb α and to evaluate the implication of PKC δ in this process. Our main finding that inhibition of PKC δ potentiates human platelet aggregation induced by a priming dose of α -thrombin through GPIb α . This potentiation is TXA₂ and MAPK pathway dependent.

Our findings and those of previous studies suggest that PKC δ regulates platelet function in an agonist- and concentration-dependent manner. Indeed, PKC δ negatively regulates platelet aggregation in response to collagen (Crosby and Poole 2003, Pula, Schuh et al. 2006, Yacoub, Theoret et al. 2006). In contrast, Chari *et al.* (Chari, Getz et al. 2009) showed a partial reduction in granule secretion in platelets derived from *PKC δ ^{-/-}* mice and in WT platelets treated with δ (V1-1)TAT in response to PAR-4 stimulation. However, this reduction in secretion was only seen at low but not high doses of PAR-4 stimulation. Moreover, this study had not assessed platelet aggregation and was performed with platelets pre-treated with either indomethacin or aspirin (Chari, Getz et al. 2009), probably to exclude

the role of TXA₂ in PKC δ signaling. Our study, which was performed in the absence of platelet inhibitors, contrasts with these findings, as inhibition of PKC δ had no effect on TRAP-4-induced platelet aggregation. Moreover, our results show that inhibition of TXA₂ generation, which is increased by a priming dose of α -thrombin when PKC δ is inhibited, reverses the potentiation of platelet aggregation, supporting a central role of TXA₂ in this process. Instead, using complementary pharmacological approaches, we demonstrated that PKC δ negatively regulates platelet function in response to low but not high doses of α -thrombin in a PAR-independent fashion. Specific inhibition of the high-affinity binding site of thrombin on GPIb α was found to reverse platelet aggregation and secretion, indicating that the GPIb α /PKC δ axis can dampen platelet activation in the presence of suboptimal thrombin concentrations.

Phosphorylation of PKCs is an essential regulatory mechanism required for complete kinase activity. However, the involvement of PKC δ phosphorylation in thrombin-induced GPIb α signaling is still unknown. Thrombin can activate platelets by either proteolytic or non-proteolytic mechanisms, and GPIb α facilitates platelet responses to thrombin (Lopez, Andrews et al. 1998). Thrombin's interaction with GPIb α has two potential roles (Ramakrishnan, DeGuzman et al. 2001). First, it is involved in regulating coagulation by localizing thrombin and factor XI on GPIb α . Second, thrombin's interaction with GPIb α can induce signaling in platelets in two ways: either by acting as a cofactor for the thrombin-dependent activation of PARs or by signaling directly *via* GPIb α . Our results show an increase in PKC δ phosphorylation on Tyr³¹¹ in the presence of δ (V1-1)TAT, which is reversed by GPIb α blockade, indicating that a priming dose of α -thrombin induces PKC δ activation through GPIb α . However, PKC δ is phosphorylated and remains in the cytoplasm in platelets pre-treated with δ (V1-1)TAT and thus is unable to exert its activity which usually occurs at the cytoplasmic membrane.

The kinase responsible for PKC δ phosphorylation downstream of GPIb α remains unknown. Previous studies have shown the involvement of Lyn and Src in phosphorylating PKC δ (Blake, Garcia-Paramio et al. 1999, Chari, Kim et al. 2009). Signaling through PARs involves G-protein pathways, unlike GPIb α which utilizes effector proteins such as 14-3-3 ζ , calmodulin, PI3-kinase and Src kinase to mediate intracellular signaling induced by VWF (Munday, Berndt et al. 2000, Andrews, Munday et al. 2001, Wu, Asazuma et al. 2003, Dai, Bodnar et al. 2005). However, in response to thrombin, the MAPK pathway has previously been shown to play an important role in platelet aggregation

downstream of GPIIb/IIIa (Dubois, Steiner et al. 2003). Accordingly, we found that PKC δ inhibition increases phosphorylation of both p38 MAPK and Erk1/2 whereas their specific inhibition reverses the potentiation of aggregation when platelets are stimulated by a priming dose of α -thrombin.

In a clinical setting, anti-platelet agents are important elements in managing patients with ACS. However, these agents do not inhibit all pathways involved in platelet activation and aggregation, and their efficiency is hampered by increased bleeding tendencies. Antagonists of PAR-1 have emerged as novel anti-platelet agents (Leger, Covic et al. 2006). However, in addition to PAR-1, GPIIb/IIIa constitutes the high affinity receptor for thrombin on platelets and its role in platelet function may influence thrombus formation, therefore affecting the outcome of other anti-platelet agents. Thus, the thrombin/GPIIb/IIIa/PKC δ axis may represent a critical regulator of platelet function and hemostasis, and dysfunction in this pathway could lead to thrombotic disorders. This axis may be needed to dampen activation in conditions where traces of thrombin are generated and platelet activation needs to be controlled. This may be of critical importance in ACS patients who have primed circulating platelets and are partially or entirely unresponsive to current anti-platelet agents. Thus, deregulating PKC δ function may lead to thrombo-embolic complications, while means of stabilizing or enhancing its function could represent an attractive therapeutic avenue against platelet-associated disorders. Understanding effector pathways regulated by GPIIb/IIIa/PKC δ axis in platelet function might therefore offer valuable pharmaco-therapeutic targets, and thus further investigation is warranted.

In conclusion, this study adds new insights into the role of the GPIIb/IIIa/PKC δ axis in platelet function, where it negatively regulates platelet activation and aggregation in response to suboptimal concentrations of thrombin. Thus, modulation of this pathway may eventually constitute a target in the management of thrombotic events.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Canada. We also thank Nabil El Khouri and Sophie Mathieu (Montreal Heart Institute) for their assistance.

Disclosure of Conflict of Interest

The authors state that they have no conflicts of interest.

References

- Adam, F., A. Kauskot, P. Nurden, E. Sulpice, M. F. Hoylaerts, R. J. Davis, J. P. Rosa and M. Bryckaert (2010). "Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation." Blood **115**(20): 4083-4092.
- Andrews, R. K. and M. C. Berndt (2013). "The GPIb-IX-V complex, in Platelets. Third Edition. Editor: Michelson. A.D." Academic Press **195-213**.
- Andrews, R. K., A. D. Munday, C. A. Mitchell and M. C. Berndt (2001). "Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex." Blood **98**(3): 681-687.
- Berndt, M. C., Y. Shen, S. M. Dopheide, E. E. Gardiner and R. K. Andrews (2001). "The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex." Thromb Haemost **86**(1): 178-188.
- Blake, R. A., P. Garcia-Paramio, P. J. Parker and S. A. Courtneidge (1999). "Src promotes PKCdelta degradation." Cell Growth Differ **10**(4): 231-241.
- Bledzka, K., S. S. Smyth and E. F. Plow (2013). "Integrin alphaIIb beta3: From Discovery to Efficacious Therapeutic Target." Circ Res **112**(8): 1189-1200.
- Canobbio, I., C. Balduini and M. Torti (2004). "Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex." Cell Signal **16**(12): 1329-1344.
- Canobbio, I., S. Reineri, F. Sinigaglia, C. Balduini and M. Torti (2004). "A role for p38 MAP kinase in platelet activation by von Willebrand factor." Thromb Haemost **91**(1): 102-110.
- Celikel, R., R. A. McClintock, J. R. Roberts, G. L. Mendolicchio, J. Ware, K. I. Varughese and Z. M. Ruggeri (2003). "Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha." Science **301**(5630): 218-221.
- Chari, R., T. Getz, B. Nagy, Jr., K. Bhavaraju, Y. Mao, Y. S. Bynagari, S. Murugappan, K. Nakayama and S. P. Kunapuli (2009). "Protein kinase C[delta] differentially regulates platelet functional responses." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(5): 699-705.
- Chari, R., S. Kim, S. Murugappan, A. Sanjay, J. L. Daniel and S. P. Kunapuli (2009). "Lyn, PKC-delta, SHIP-1 interactions regulate GPVI-mediated platelet-dense granule secretion." Blood **114**(14): 3056-3063.
- Chen, L., H. Hahn, G. Wu, C. H. Chen, T. Liron, D. Schechtman, G. Cavallaro, L. Banci, Y. Guo, R. Bolli, G. W. Dorn, 2nd and D. Mochly-Rosen (2001). "Opposing cardioprotective

actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11114-11119.

Clemetson, K. J. and J. M. Clemetson (1994). "Molecular abnormalities in Glanzmann's thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome, and platelet-type von Willebrand's disease." Curr Opin Hematol **1**(5): 388-393.

Clemetson, K. J. and J. M. Clemetson (2001). "Platelet collagen receptors." Thromb Haemost **86**(1): 189-197.

Coughlin, S. R., T. K. Vu, D. T. Hung and V. I. Wheaton (1992). "Characterization of a functional thrombin receptor. Issues and opportunities." J Clin Invest **89**(2): 351-355.

Crosby, D. and A. W. Poole (2003). "Physical and functional interaction between protein kinase C delta and Fyn tyrosine kinase in human platelets." J Biol Chem **278**(27): 24533-24541.

Dai, K., R. Bodnar, M. C. Berndt and X. Du (2005). "A critical role for 14-3-3zeta protein in regulating the VWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications." Blood **106**(6): 1975-1981.

De Marco, L., M. Mazzucato, A. Masotti, J. W. Fenton, 2nd and Z. M. Ruggeri (1991). "Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin." J Biol Chem **266**(35): 23776-23783.

De Marco, L., M. Mazzucato, A. Masotti and Z. M. Ruggeri (1994). "Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein Ib alpha." J Biol Chem **269**(9): 6478-6484.

Dormann, D., K. J. Clemetson and B. E. Kehrel (2000). "The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity." Blood **96**(7): 2469-2478.

Dubois, C., B. Steiner, N. Kieffer and S. C. Reigner (2003). "Thrombin binding to GPIbalpha induces platelet aggregation and fibrin clot retraction supported by resting alphaIIb beta3 interaction with polymerized fibrin." Thromb Haemost **89**(5): 853-865.

Dumas, J. J., R. Kumar, J. Seehra, W. S. Somers and L. Mosyak (2003). "Crystal structure of the GpIbalpha-thrombin complex essential for platelet aggregation." Science **301**(5630): 222-226.

Guinebault, C., B. Payrastre, G. Mauco, M. Breton, M. Plantavid and H. Chap (1994). "Rapid and transient translocation of PLC-gamma 1 to the cytoskeleton of thrombin-stimulated platelets. Evidence for a role of tyrosine kinases." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **40**(5): 687-693.

Hachem, A., D. Yacoub, Y. Zaid, W. Mourad and Y. Merhi (2012). "Involvement of nuclear factor kappaB in platelet CD40 signaling." Biochem Biophys Res Commun **425**(1): 58-63.

Harper, M. T. and A. W. Poole (2010). "Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation." J Thromb Haemost **8**(3): 454-462.

Inagaki, K., L. Chen, F. Ikeno, F. H. Lee, K. Imahashi, D. M. Bouley, M. Rezaee, P. G. Yock, E. Murphy and D. Mochly-Rosen (2003). "Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo." Circulation **108**(19): 2304-2307.

Leger, A. J., L. Covic and A. Kuliopulos (2006). "Protease-activated receptors in cardiovascular diseases." Circulation **114**(10): 1070-1077.

Liu, L., J. Freedman, A. Hornstein, J. W. Fenton, 2nd, Y. Song and F. A. Ofofu (1997). "Binding of thrombin to the G-protein-linked receptor, and not to glycoprotein Ib, precedes thrombin-mediated platelet activation." J Biol Chem **272**(3): 1997-2004.

Lopez, J. A., R. K. Andrews, V. Afshar-Kharghan and M. C. Berndt (1998). "Bernard-Soulier syndrome." Blood **91**(12): 4397-4418.

Mazurov, A. V., D. V. Vinogradov, T. N. Vlasik, V. S. Repin, W. J. Booth and M. C. Berndt (1991). "Characterization of an antiglycoprotein Ib monoclonal antibody that specifically inhibits platelet-thrombin interaction." Thromb Res **62**(6): 673-684.

Mazzucato, M., L. D. Marco, A. Masotti, P. Pradella, W. F. Bahou and Z. M. Ruggeri (1998). "Characterization of the initial alpha-thrombin interaction with glycoprotein Ib alpha in relation to platelet activation." J Biol Chem **273**(4): 1880-1887.

Michelson, A. D. (2011). "Advances in antiplatelet therapy." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2011**: 62-69.

Munday, A. D., M. C. Berndt and C. A. Mitchell (2000). "Phosphoinositide 3-kinase forms a complex with platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and 14-3-3zeta." Blood **96**(2): 577-584.

Nakanishi-Matsui, M., Y. W. Zheng, D. J. Sulciner, E. J. Weiss, M. J. Ludeman and S. R. Coughlin (2000). "PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin." Nature **404**(6778): 609-613.

Pula, G., K. Schuh, K. Nakayama, K. I. Nakayama, U. Walter and A. W. Poole (2006). "PKCdelta regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation." Blood **108**(13): 4035-4044.

Ramakrishnan, V., F. DeGuzman, M. Bao, S. W. Hall, L. L. Leung and D. R. Phillips (2001). "A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1823-1828.

Schmidt, V. A., W. C. Nierman, D. R. Maglott, L. D. Cupit, K. A. Moskowitz, J. A. Wainer and W. F. Bahou (1998). "The human proteinase-activated receptor-3 (PAR-3) gene. Identification within a Par gene cluster and characterization in vascular endothelial cells and platelets." J Biol Chem **273**(24): 15061-15068.

Sixma, J. J., M. E. Schiphorst, C. L. Verweij and H. Pannekoek (1991). "Effect of deletion of the A1 domain of von Willebrand factor on its binding to heparin, collagen and platelets in the presence of ristocetin." Eur J Biochem **196**(2): 369-375.

Varga-Szabo, D., I. Pleines and B. Nieswandt (2008). "Cell adhesion mechanisms in platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 403-412.

Wall, J. E., M. Buijs-Wilts, J. T. Arnold, W. Wang, M. M. White, L. K. Jennings and C. W. Jackson (1995). "A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents." Br J Haematol **89**(2): 380-385.

Ward, C. M., R. K. Andrews, A. I. Smith and M. C. Berndt (1996). "Mocarhagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrand factor receptor glycoprotein Ibalpha. Identification of the sulfated tyrosine/anionic sequence Tyr-276-Glu-282 of glycoprotein Ibalpha as a binding site for von Willebrand factor and alpha-thrombin." Biochemistry **35**(15): 4929-4938.

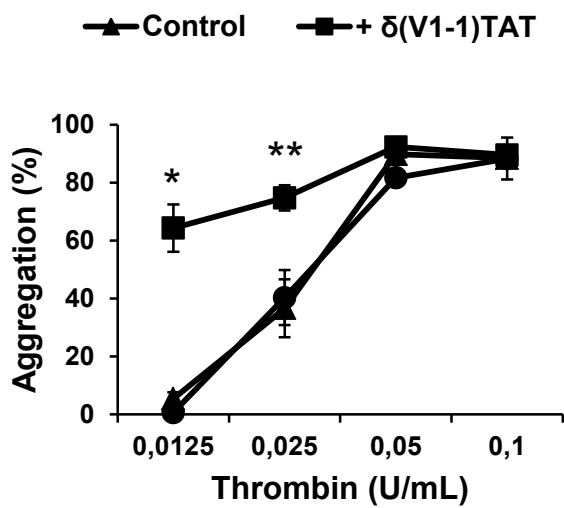
Wu, Y., N. Asazuma, K. Satoh, Y. Yatomi, T. Takafuta, M. C. Berndt and Y. Ozaki (2003). "Interaction between von Willebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinase in human platelets: role of phosphoinositide 3-kinase." Blood **101**(9): 3469-3476.

Yacoub, D., A. Hachem, J. F. Theoret, M. A. Gillis, W. Mourad and Y. Merhi (2010). "Enhanced levels of soluble CD40 ligand exacerbate platelet aggregation and thrombus formation through a CD40-dependent tumor necrosis factor receptor-associated factor-2/Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(12): 2424-2433.

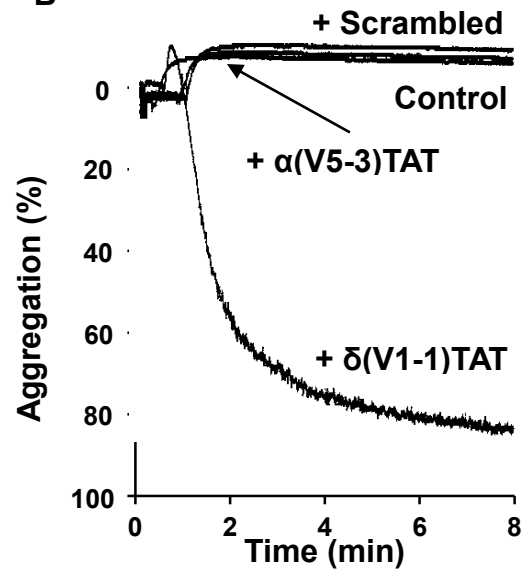
Yacoub, D., J. F. Theoret, L. Villeneuve, H. Abou-Saleh, W. Mourad, B. G. Allen and Y. Merhi (2006). "Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release." J Biol Chem **281**(40): 30024-30035.

Figure 1

A



B



C

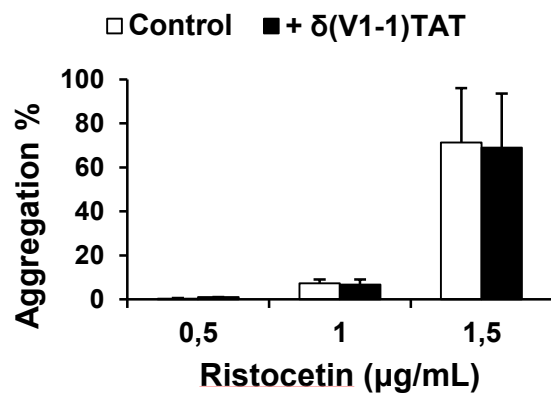
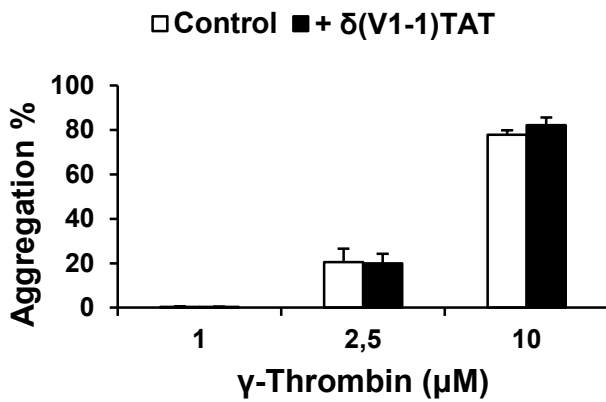
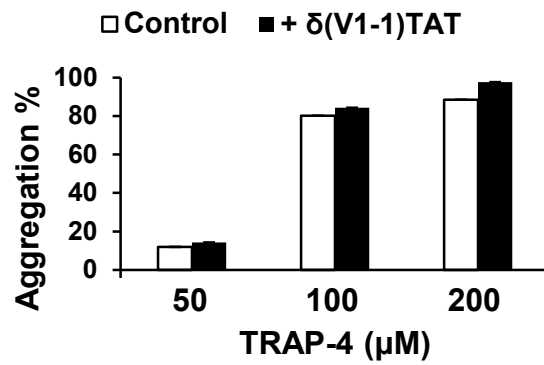
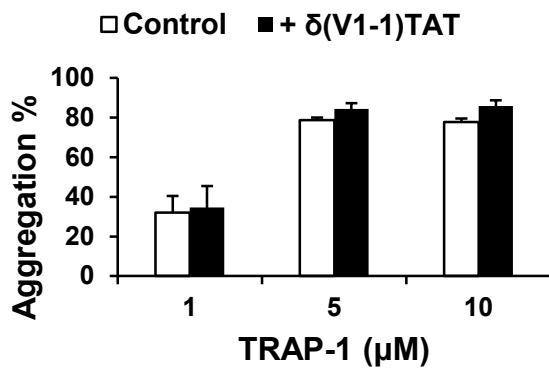


Figure 2

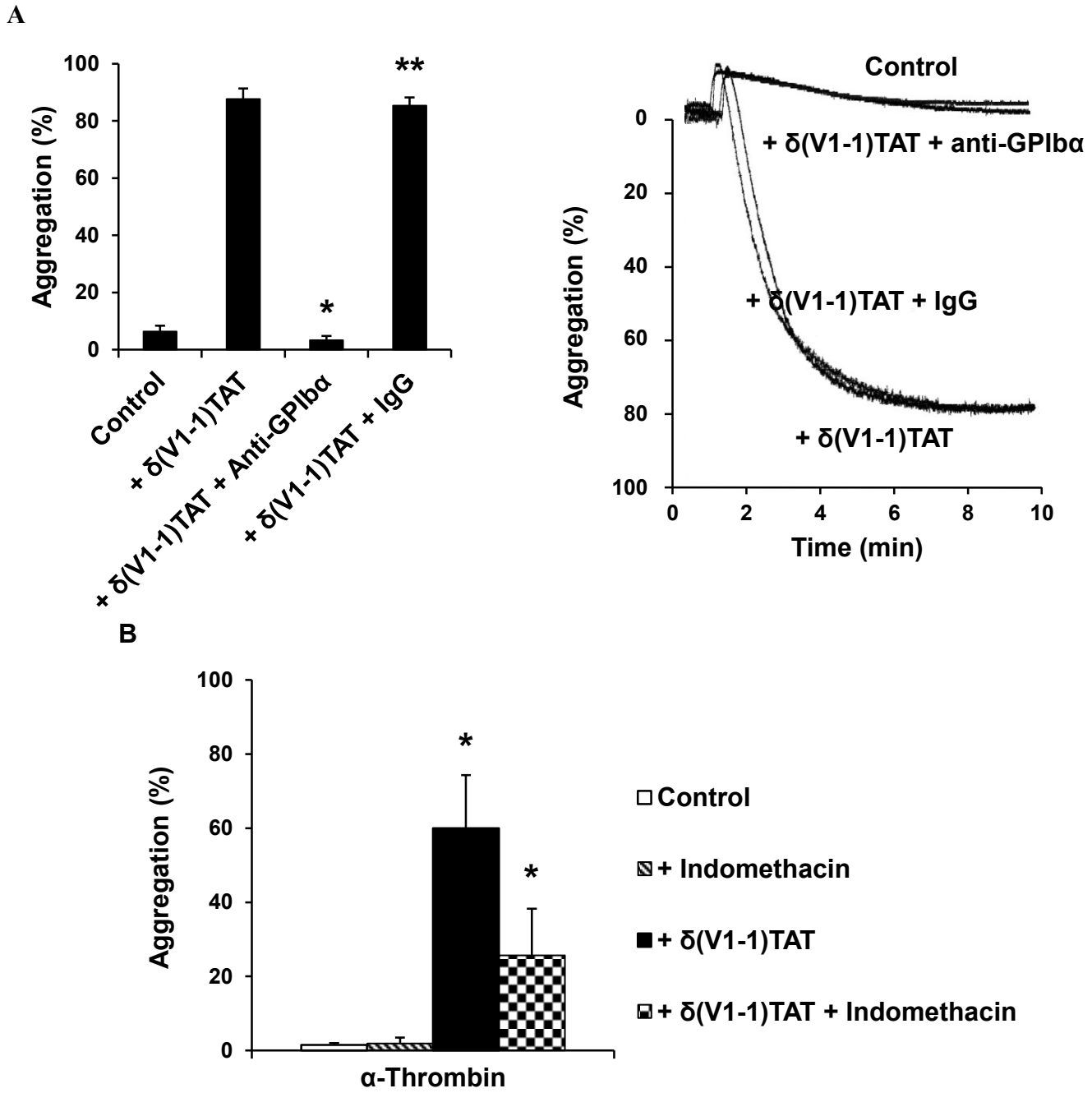


Figure 3

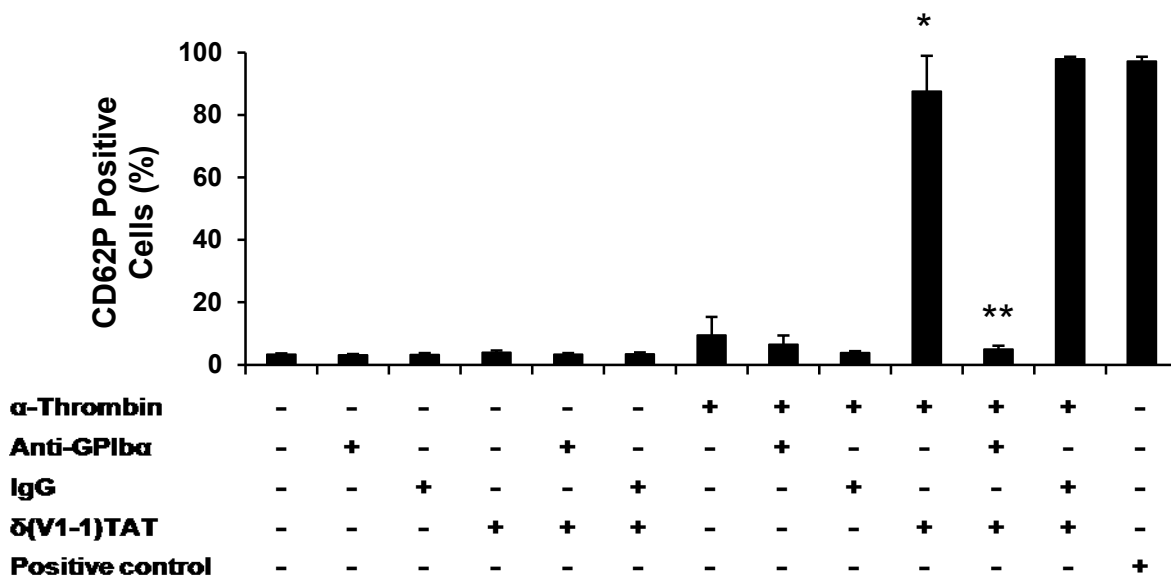
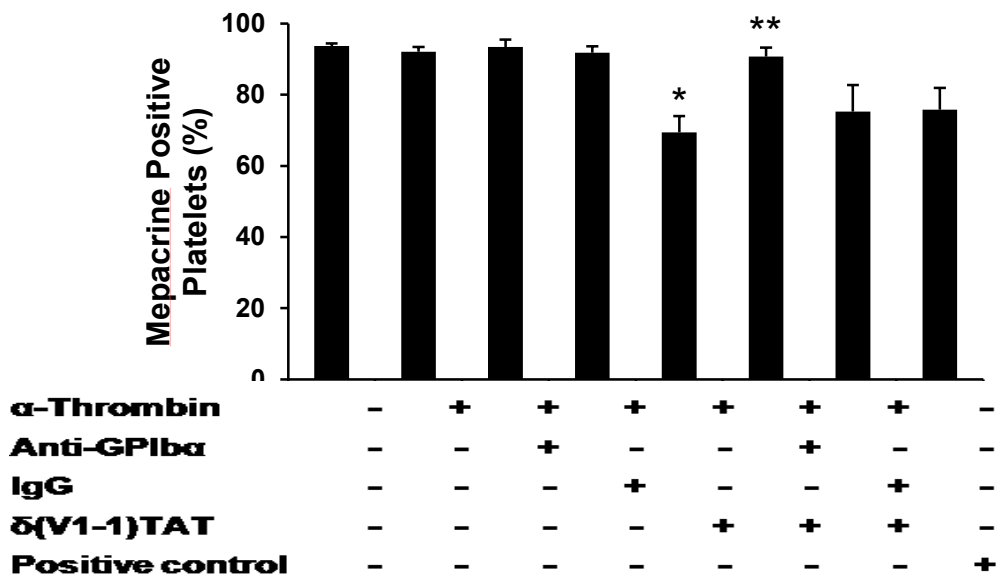
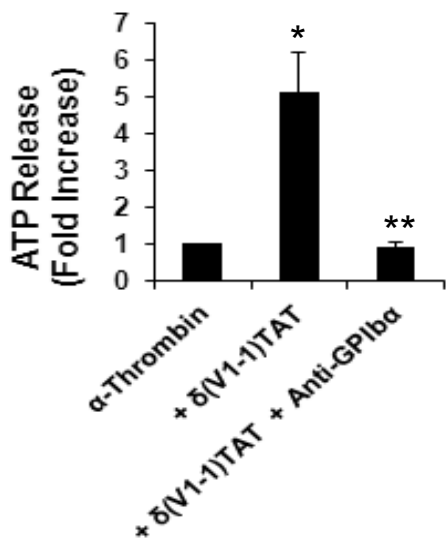


Figure 4

A



B



C

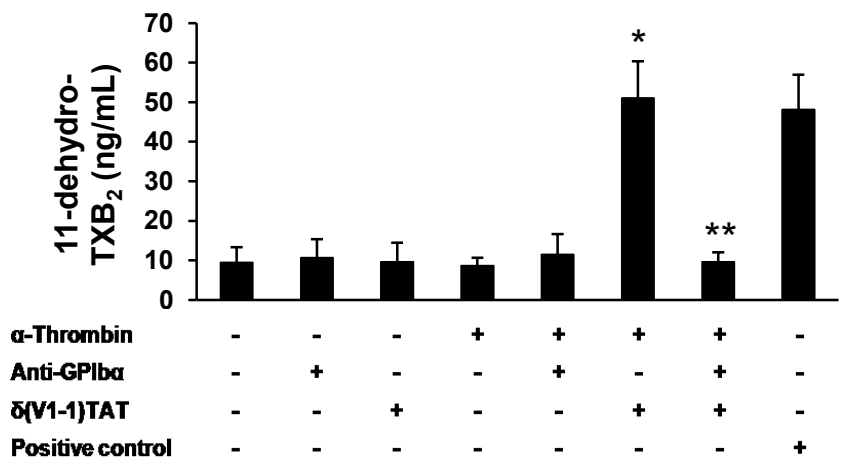


Figure 5

A

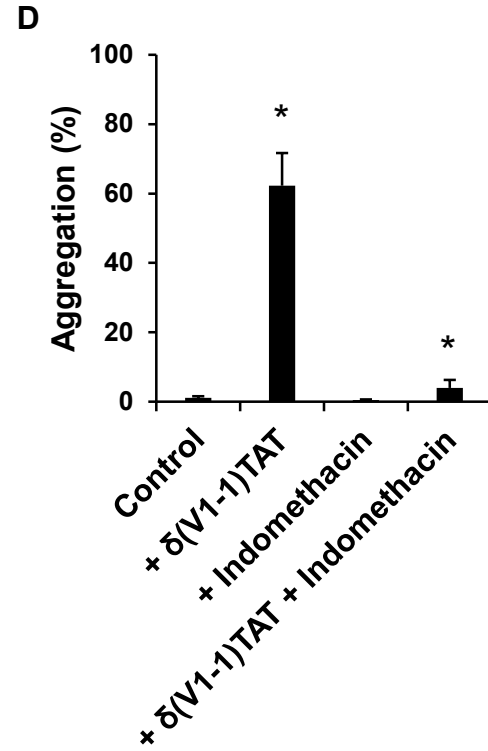
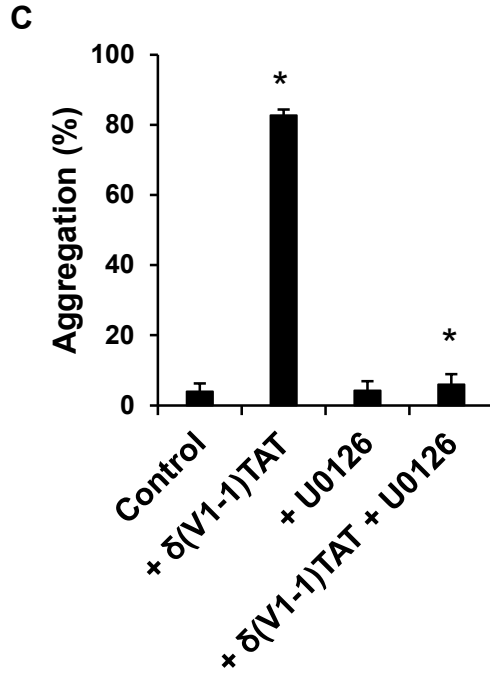
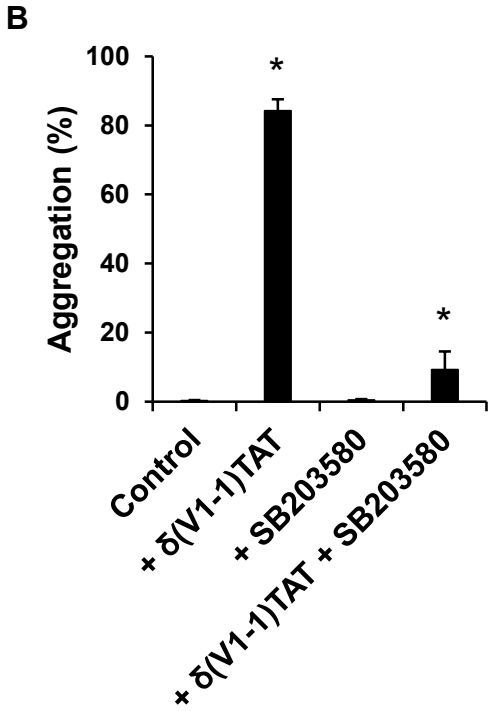
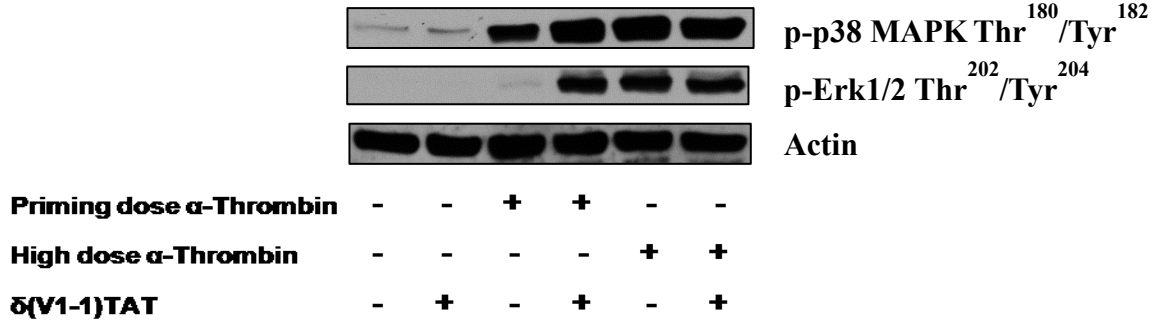


Figure 6

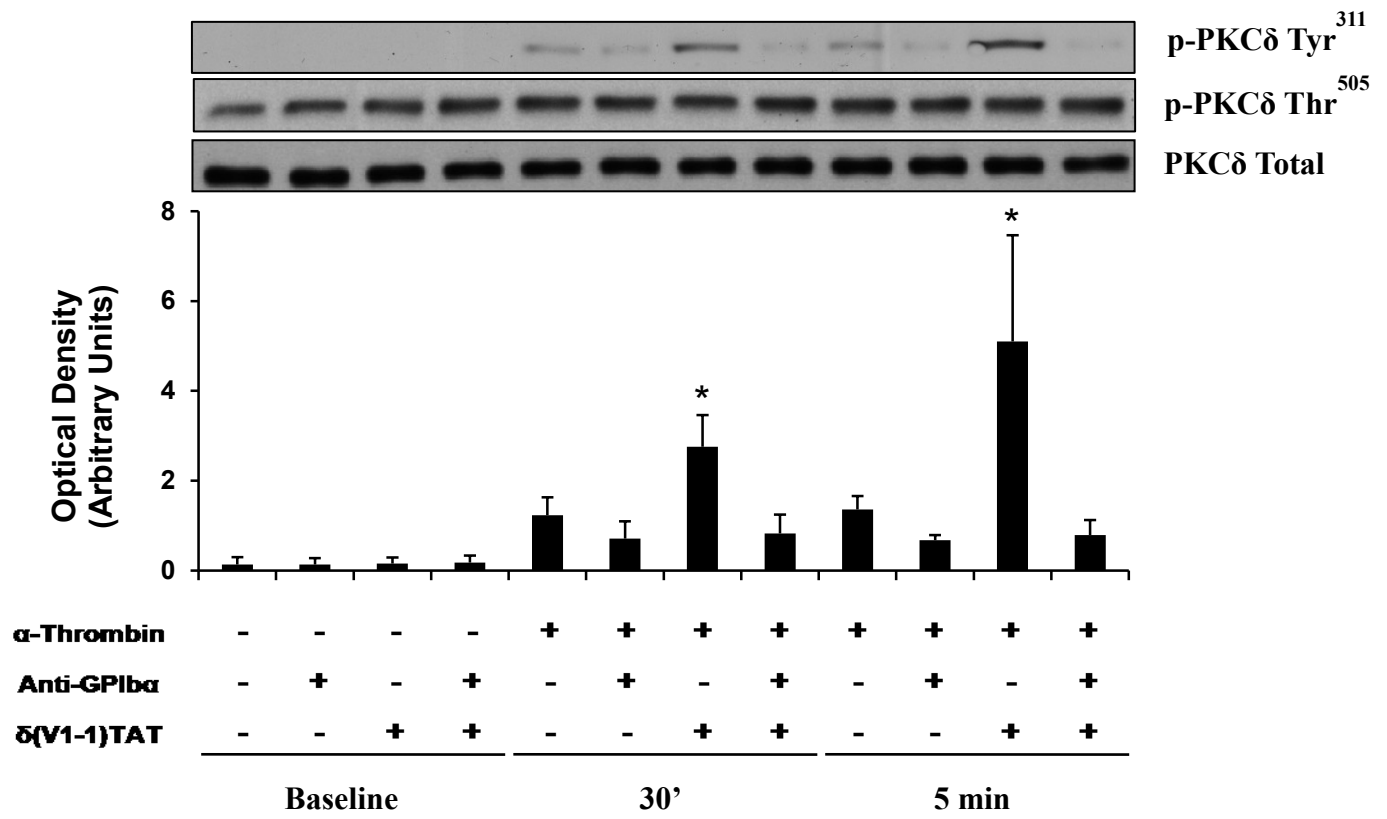
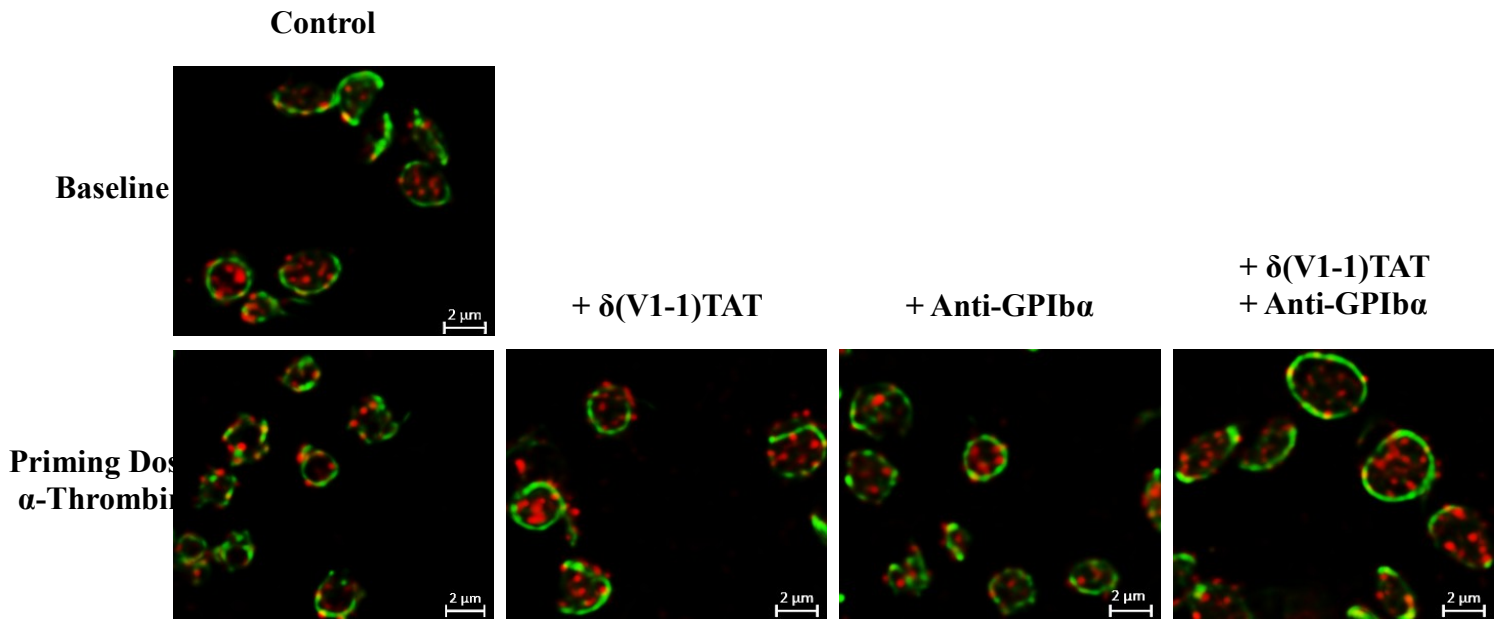
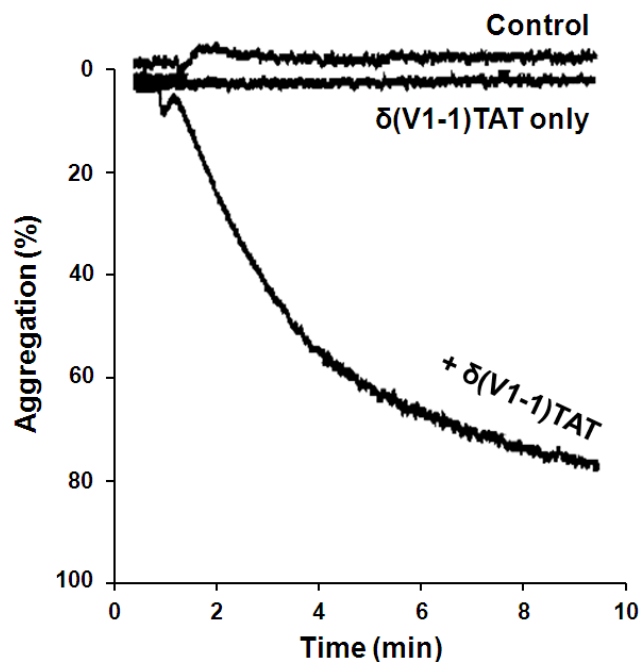


Figure 7

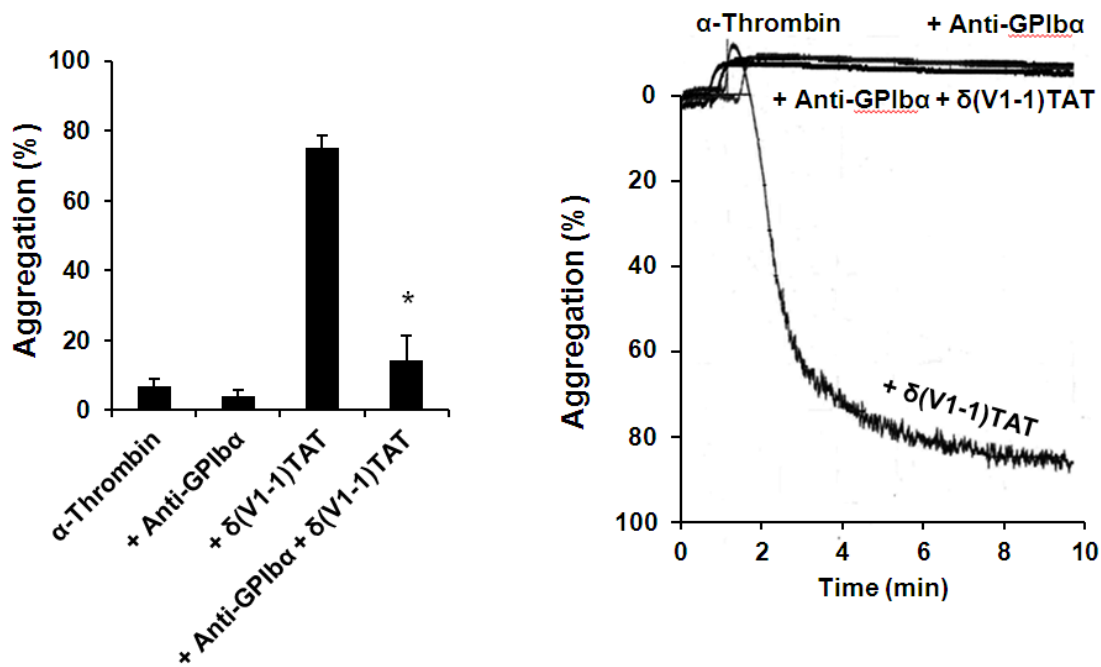


Supplemental Figure I



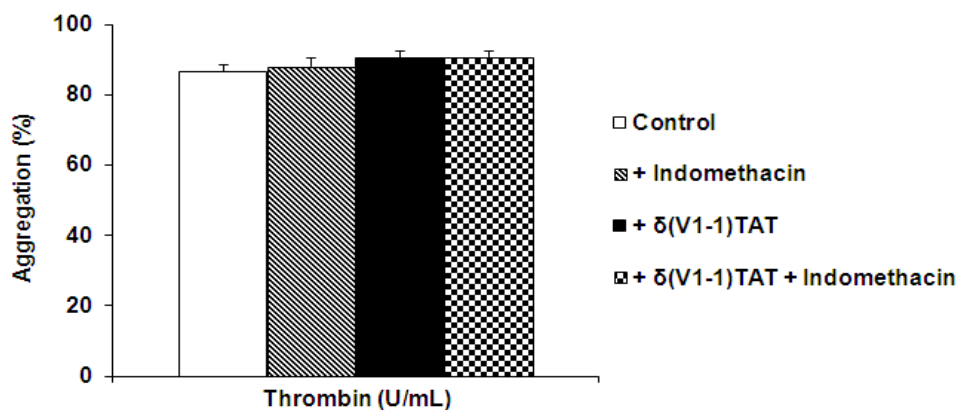
Supplemental Figure I: $\delta(V1-1)TAT$ alone has no effect on platelet aggregation. Platelets were pre-incubated with $\delta(V1-1)TAT$ (1 $\mu\text{mol/L}$) or not for 5 minutes at 37°C and aggregation was either stimulated with 0.0125 U/mL of α -thrombin (Control and + $\delta(V1-1)TAT$) or left unstimulated ($\delta(V1-1)TAT$ only). Traces are representative of aggregation traces (n=3).

Supplemental Figure II



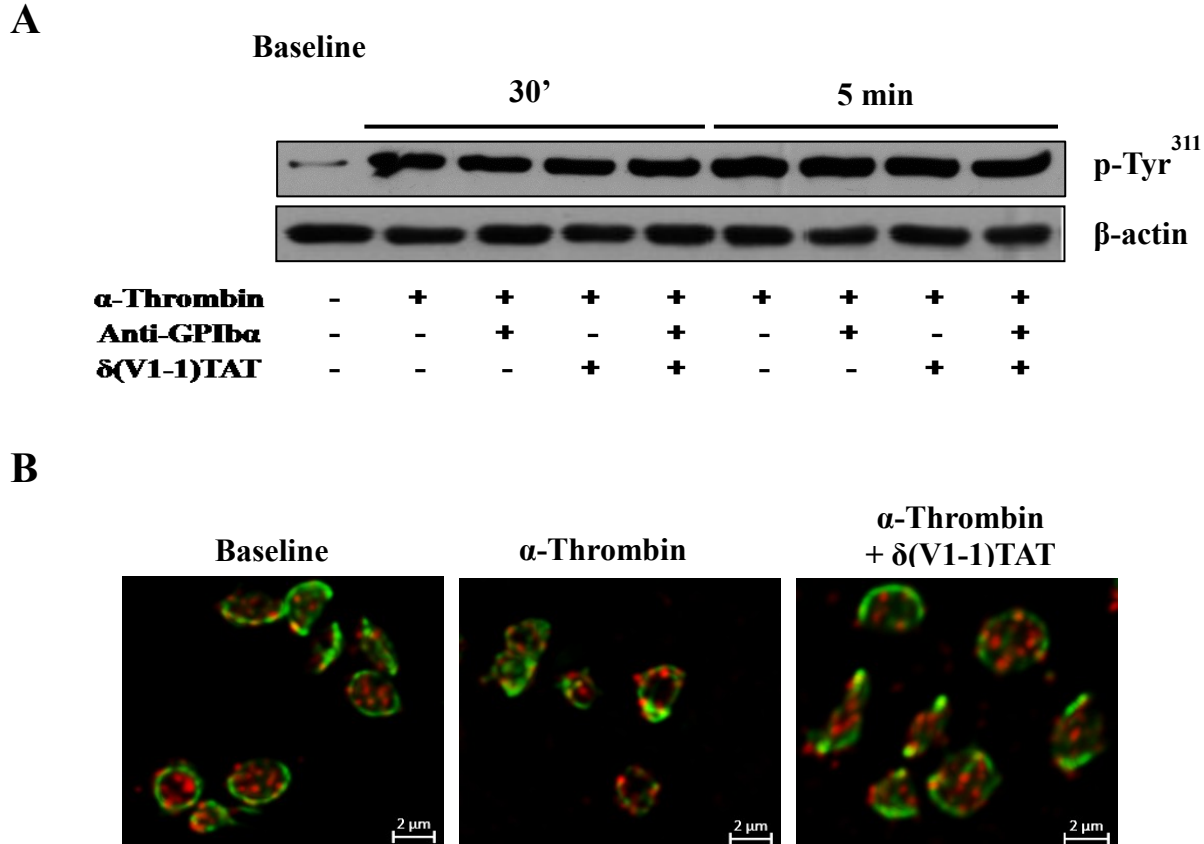
Supplemental Figure II: Pre-treatment with a human anti-GPIIb α antibody prevents δ (V1-1)TAT-induced potentiation of platelet aggregation. Platelets were pre-treated with δ (V1-1)TAT (1 μ mol/L) and/or the human anti-GPIIb α antibody (SZ2, 20 μ g/mL) for 5 minutes at 37°C. Aggregation was then initiated by a low dose of α -thrombin (0.0125 U/mL). (Left) Histogram represents the mean of data \pm SEM of aggregation traces ($n > 4$, * $P < 0.05$ vs. + δ (V1-1)TAT). (Right) Representative traces of platelet aggregation induced by a priming dose (0.0125 U/mL) of α -thrombin.

Supplemental Figure III



Supplemental Figure III: Indomethacin has no effect on platelet aggregation in response to high dose of α -thrombin. Platelets were pre-treated with $\delta(V1-1)TAT$ and/or indomethacin (10 μ mol/L) for 5 minutes at 37°C. Aggregation was then initiated by a high dose of α -thrombin (0.1 U/mL). Histograms represent the mean of data \pm SEM of aggregation traces (indomethacin n = 8).

Supplemental Figure IV



Supplemental Figure IV: PKC δ Phosphorylation is Unchanged by PKC δ Inhibition in Response to a High Dose of α -Thrombin through GPIIb α despite its localization. **A**, Platelets were pre-treated with δ (V1-1)TAT (1 μ M) and/or the human anti-GPIIb α antibody (20 μ g/mL) for 5 minutes at 37°C under shear conditions. Aggregation was then initiated by a high dose of α -thrombin (0.1 U/mL) and the reaction was terminated at the indicated time. Platelet lysates were then analyzed by SDS-PAGE for p-PKC δ Tyr³¹¹. Blots for β -actin are from stripped p-PKC δ Tyr³¹¹ membranes. **B**, δ (V1-1)TAT prevents membrane translocation of PKC δ in response to a high dose of α -thrombin. Representative confocal microscopy images showing platelets double stained for PKC δ (red) and α -tubulin (green) taken at 63X magnification.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. PKC δ negatively regulates human platelet aggregation induced by low doses of α -thrombin. **A**, PKC δ inhibition potentiates platelet aggregation in response to low concentrations of α -thrombin. Platelets were pre-incubated with δ (V1-1)TAT (1 μ mol/L), the scrambled peptide sequence or its vehicle for 5 minutes at 37°C and stimulated with 0.0125, 0.025, 0.05 or 0.1 U/mL of α -thrombin. (*Left*) Histogram represents the mean of data \pm SEM of aggregation traces (Control and δ (V1-1)TAT n=14; scrambled n=3); * P <0.05 + δ (V1-1)TAT *versus* control and + scrambled. (*Right*) Representative traces of platelet aggregation induced by a priming dose (0.0125 U/mL) of α -thrombin. **B**, PKC δ inhibition does not potentiate platelet aggregation in response to γ -thrombin, TRAP-1, TRAP-4 and ristocetin. Platelets were pre-incubated with δ (V1-1)TAT for 5 minutes at 37°C and stimulated with γ -thrombin (10 μ mol/L), TRAP-1 (10 μ mol/L) or TRAP-4 (200 μ mol/L). PRP was used for aggregation experiments with ristocetin (1.5 μ g/mL). Histogram represents the mean of data \pm SEM of aggregation traces (TRAP-1 and TRAP-4 n=8; γ -thrombin and ristocetin n=3).

Figure 2. PKC δ negatively regulates thrombin-induced human platelet aggregation through GPIb α . **A**, Pre-treatment with the human anti-GPIb α antibody prevents δ (V1-1)TAT-induced potentiation of platelet aggregation. Platelets were pre-treated with δ (V1-1)TAT (1 μ mol/L) and/or the human anti-GPIb α antibody (20 μ g/mL) or its isotype IgG control for 5 minutes at 37°C. Aggregation was then initiated by a priming dose (0.0125 U/mL) of α -thrombin. Histogram represents the mean of data \pm SEM of aggregation traces (represented on the right) (n \geq 3); * P <0.05 *versus* + δ (V1-1)TAT; ** P <0.05 *versus* + δ (V1-1)TAT + Anti-GPIb α . **B**, Pre-treatment with the cyclooxygenase inhibitor (indomethacin) partially reverses δ (V1-1)TAT-induced potentiation of platelet aggregation. Platelets were pre-treated with δ (V1-1)TAT and/or indomethacin (1 μ mol/L) for 5 minutes at 37°C. Aggregation was then initiated by a priming dose of α -thrombin. Histogram represents the mean of data \pm SEM of aggregation traces (n=6); * P <0.05 *versus* control; ** P <0.05 *versus* + δ (V1-1)TAT.

Figure 3. PKC δ negatively regulates human platelet P-selectin expression through GPIb α . PKC δ inhibition increases α -granule secretion (percent of CD62P positive platelets) in response to a priming dose of α -thrombin, which is reversed by GPIb α blockade. Platelets were pre-treated with δ (V1-1)TAT (1 μ mol/L) and/or the human anti-GPIb α antibody (20 μ g/mL) or its isotype IgG control for 5 minutes at 37°C. Degranulation was then initiated by a priming dose (0.0125 U/mL) of α -thrombin. 0.1 U/mL of

α -thrombin was used as a positive control. Histogram represents the mean of data \pm SEM of plots for CD62P expression (n=3); * P <0.05 versus priming dose α -thrombin, ** P <0.05 versus priming dose α -thrombin + δ (V1-1)TAT.

Figure 4. PKC δ negatively regulates human platelet secretion through GPIb α . (**A** and **B**) PKC δ inhibition increases dense granule secretion in response to a priming dose of α -thrombin, which is reversed by GPIb α blockade. **B**, ATP release represented as percent of remaining mepacrine labeling. Platelets pre-treated with δ (V1-1)TAT were incubated with the human anti-GPIb α antibody or its isotype IgG control for 5 minutes at 37°C. Degranulation was then initiated by a priming dose of α -thrombin. 0.1 U/mL of α -thrombin was used as a positive control. Histogram represents the mean of data \pm SEM of plots for mepacrine positive platelets (n=3); * P <0.05 versus priming dose α -thrombin, ** P <0.05 versus priming dose α -thrombin + δ (V1-1)TAT. **C**, ATP release represented as fold increase over a priming dose of α -thrombin alone (n=3); * P <0.05 versus α -thrombin, ** P <0.05 versus α -thrombin + δ (V1-1)TAT. **C**, PKC δ inhibition increases TXA $_2$ secretion (its stable metabolite 11-dehydro-TXB $_2$) in response to a priming dose of α -thrombin, which is reversed by GPIb α blockade. Platelets were pre-treated with δ (V1-1)TAT and/or the human anti-GPIb α antibody or its isotype IgG control for 5 minutes at 37°C. Secretion was then initiated by a priming dose of α -thrombin. 0.1 U/mL of α -thrombin was used as a positive control. Histogram represents the mean of data \pm SEM of released 11-dehydro-TXB $_2$ (n=5); * P <0.05 versus priming dose α -thrombin; ** P <0.05 versus priming dose α -thrombin + δ (V1-1)TAT.

Figure 5. Implication of p38 MAPK, Erk1/2 and TXA $_2$. **A**, p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation are increased following PKC δ inhibition in response to a priming dose of α -thrombin. Platelets were pre-treated with δ (V1-1)TAT (1 μ mol/L) for 5 minutes at 37°C under shear conditions. Aggregation was then initiated by a priming dose (0.0125 U/mL) of α -thrombin and the reaction was terminated at 5 minutes. Platelet lysates were then analyzed by SDS-PAGE for p-p38 MAPK Thr 180 /Tyr 182 and p-Erk1/2 Thr 202 /Tyr 204 (n=5). Blots for actin are from a representative stripped membrane. (**B**, **C** and **D**) Pre-treatment with the p38 MAPK inhibitor (SB203580), the Erk1/2 inhibitor (U0126) or the cyclooxygenase inhibitor (indomethacin) reverses δ (V1-1)TAT-induced potentiation of platelet aggregation. Platelets were pre-treated with δ (V1-1)TAT and/or SB203580 (10 μ mol/L) **B**, U0126 (20 μ mol/L) **C**, or indomethacin (10 μ mol/L) **D**, for 5 minutes at 37°C. Aggregation was then initiated by a

priming dose of α -thrombin. Histograms represent the mean of data \pm SEM of aggregation traces (SB203580 and U0126 n=4; indomethacin n=9); *P<0.05 vs control; **P<0.05 vs + δ (V1-1)TAT.

Figure 6. PKC δ phosphorylation is increased by PKC δ inhibition in response to a low dose of α -thrombin through GPIb α . PKC δ phosphorylation is increased by PKC δ inhibition in response to a priming dose of α -thrombin through GPIb α . Platelets were pre-treated with δ (V1-1)TAT (1 μ mol/L) and/or the human anti-GPIb α antibody (20 μ g/mL) for 5 minutes at 37°C under shear conditions. Aggregation was then initiated by a priming dose (0.0125 U/mL) of α -thrombin and the reaction was terminated at the indicated time. Platelet lysates were then analyzed by SDS-PAGE for p-PKC δ Tyr³¹¹ and Thr⁵⁰⁵. Blots for total PKC δ are from stripped p-PKC δ Tyr³¹¹ membranes. Histogram represents the mean of data \pm SEM expressed as arbitrary units of optical density of overlay blots (n=3); *P<0.05.

Figure 7. PKC δ negatively regulates platelet function through membrane relocalization and not intrinsic kinase phosphorylation. δ (V1-1)TAT prevents membrane translocation of PKC δ in response to a priming dose (0.0125 U/mL) of α -thrombin. Representative confocal microscopy images showing platelets double stained for PKC δ (red) and α -tubulin (green) taken at 63X magnification.

Mise en contexte pour le deuxième article:

GPIIb α régule négativement le temps de saignement et la formation des embolies pulmonaires chez la souris *PKC δ ^{-/-}* en réponse à la thrombine

Dans notre première étude, nous avons démontré, par approche pharmacologique, que l'interaction thrombine-GPIIb α régule négativement l'activation et l'agrégation plaquettaire *in vitro*, par l'entremise d'une voie signalétique PKC δ -dépendante, en impliquant la voie signalétique p38 MAPK et Erk1/2 et le TXA₂ comme médiateur secondaire. À ce jour, aucune étude n'a évalué le rôle de cet axe thrombine/GPIIb α /PKC δ dans l'implication physiopathologique des plaquettes et plus particulièrement la formation du thrombus *in vivo*. Cette étude avait donc pour objectif principal de valider, dans un premier temps, par approche génétique (plaquettes provenant de souris *PKC δ ^{-/-}*), les résultats obtenus par approche pharmacologique *in vitro* dans les plaquettes humaines. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés particulièrement au rôle de l'axe thrombine/GPIIb α /PKC δ *in vivo* dans le temps de saignement ainsi que dans la formation du thrombus chez la souris *PKC δ ^{-/-}*.

Contribution des auteurs

Younes Zaid: Planification et exécution de la majorité des expériences, montage des figures, rédaction et correction de l'article.

Ahmed Hachem: Exécution du modèle de thrombose ainsi que l'analyse des données et la correction de l'article.

Walid Mourad: Codirection générale.

Yahye Merhi: Conception du projet de recherche et supervision générale.

ORIGINAL ARTICLE

Thrombin/GPIIb α /PKC δ axis negatively regulates platelet function, bleeding time and pulmonary micro-embolies in mice

Y. ZAID, * A. HACHEM, * W. MOURAD, †§ Y. MERHI, *§

** Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada; † Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; § Université de Montréal, Faculty of Medicine, Montreal, Quebec, Canada.*

Correspondence to Yahye Merhi, PhD, Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8; Tel: +514 376-3330 ext. 3035, Fax: +514 376-1355

Short title: GPIIb α /PKC δ axis in thrombus formation

Word count of abstract: 240

Word count of body: 2727

Total number of figure: 5

Summary

Background: The protein kinase C (PKC) family is essential for platelet function in response to thrombin, which signals and activates platelets *via* protease-activated receptors (PARs) and GPIb α , the low/medium and high affinity receptors in human platelets, respectively. We have previously shown that PKC δ negatively regulates human platelet function in response to thrombin *via* GPIb α , but the implication of the thrombin/GPIb α /PKC δ axis in *in vivo* thrombosis and hemostasis is unknown

Objectives: The current study was designed to determine the role of the thrombin/GPIb α /PKC δ axis in murine platelet aggregation and to investigate the relevance of this axis in regulating thrombus formation.

Methods and Results: In wild type murine platelets, pre-treatment with the specific PKC δ inhibitor δ (V1-1)TAT significantly potentiated platelet aggregation in response to a priming concentration of α -thrombin. This potentiation was prevented by GPIb α blockade. These results were confirmed using a genetic approach with platelets from *PKC δ ^{-/-}* mice, which also show increased aggregation in response to a priming dose of α -thrombin. Moreover, *PKC δ ^{-/-}* mice exhibit significantly decreased *in vivo* tail bleeding times and exacerbated pulmonary thrombo-emboli in response to α -thrombin. Blockade of GPIb α protects *PKC δ ^{-/-}* mice from these effects.

Conclusions: This study adds new insights into the role of PKC δ in platelets downstream of GPIb α , where it negatively regulates thrombus formation in response to thrombin. Thus, the thrombin/GPIb α /PKC δ axis in platelets may represent a critical regulator of platelet function and hemostasis, and dysfunction of this pathway could lead to adverse thrombotic events.

Keywords: platelets; protein kinase C-delta; GPIb-alpha; thrombin; thrombosis.

Introduction

Platelets adhere and aggregate at sites of vascular injury to form a plug, which stops blood loss. Under pathological conditions, excessive platelet accumulation after atherosclerotic plaque rupture can induce occlusive thrombus formation, leading to ischemic complications (Ruggeri 2002). The GPIb α receptor ensures the first step of platelet recruitment to the damaged vessel wall through its binding to von Willebrand factor (VWF) present in the sub-endothelium (Savage, Saldivar et al. 1996). Although VWF represents the main GPIb α ligand, additional ligands of significant importance have been described, namely thrombin (Canobbio, Balduini et al. 2004). Thrombin is the final protease of the coagulation cascade (Macfarlane 1964), and its activity is crucial for the formation of stable blood clots (Lane, Philippou et al. 2005). Indeed, it is generally accepted that GPIb α is the major α -thrombin binding site on the platelet surface, with evidence for high affinity site within its extracellular domain adjacent to the VWF binding site (Sixma, Schiphorst et al. 1991). Thrombin binding to the N-terminal region of GPIb α (His1-Glu282) is inhibited by the anti-GPIb α antibodies VM16d and SZ2 that map to the C-terminal flanking sequence 226 to 268 and to the anionic/sulfated tyrosine sequence 269 to 282 of GPIb α , respectively (Andrews and Berndt 2013).

Platelet activation by low doses of thrombin allows the amplification of thrombus formation and thereby plays an important role in the development of thrombi (Jandrot-Perrus, Bouton et al. 1996). Moreover, we have already shown, in human platelets, that the α -thrombin-GPIb α interaction negatively regulates platelet function *via* PKC δ (Zaid *et al.* in preparation). However, the pathophysiological relevance of α -thrombin binding to platelet GPIb α is still uncertain, and the picture emerging from ongoing studies with targeted animal models is not yet defined.

PKC δ plays a pivotal role in growth regulation and tissue remodeling in other cells (Steinberg 2004) and differentially regulates platelet function. It negatively and positively regulates platelet function in response to GPVI and PAR stimulation, respectively (Crosby and Poole 2003), (Murugappan, Tuluc et al. 2004), (Chari, Getz et al. 2009), (Yacoub, Theoret et al. 2006). Moreover, it was reported, in experiments with *PKC δ ^{-/-}*, that some of the actions mediated by PKC δ including platelet dense granule secretion, might be mediated by PKD2 a major isoform of PKD expressed in both human and murine platelets and can be activated downstream of PAR4 in a Gq-dependent manner (Bhavanasi, Kim et al. 2011). PKC δ also interacts with VASP and negatively regulates platelet

function. In fact, there was marked enhancement of filopodia generation, actin polymerization and platelet aggregation in *PKCδ*^{-/-} upon adhesion to collagen, compared with wild-type platelets (Pula, Schuh et al. 2006). Intrinsic function of PKCs family is regulated by 3 mechanisms: (1) binding of the cofactor that allosterically activates the enzyme, (2) phosphorylation on the activation loop residue that primes the enzyme for catalysis, and (3) interaction with transporter proteins, which position it close to its substrates and regulators (Newton 2001).

In this report, we investigated the implication of PKCδ in platelet function in response to α-thrombin stimulation *via* GPIbα and showed that PKCδ negatively regulates platelet aggregation, bleeding time and thrombo-emboli formation downstream of GPIbα in response to priming concentrations of α-thrombin.

Material and methods

PKCδ inhibitor peptide

PKCδ membrane translocation was selectively inhibited by the δ(V1-1)TAT peptide (Chen, Hahn et al. 2001, Inagaki, Chen et al. 2003). The PKCδ δ(V1-1) interacting sequence of the receptors for activated C kinases (SFNSYELGSL) was coupled to the TAT HIV membrane permeable sequence (YGRKKRRQRRR) through a cysteine-cysteine bridge. Peptide sequencing was performed at CanPeptide. A scrambled sequence of δ(V1-1) (YGRKKRRQRRR/FSNLYLSESG) (CanPeptide) was also synthesized and used as controls.

Animals

PKCδ^{-/-} (C57BL/6 background) mice were a generous gift from Dr. Nakayama (Miyamoto, Nakayama et al. 2002). Their wild type (WT) littermates were used as controls. Mice were bred and housed under pathogen free conditions. Handling and care of mice were in compliance with the guidelines established by the animal care and ethical committee of the Montreal Heart Institute. Gene profiling in *PKCδ*^{-/-} and WT littermates was confirmed by PCR (Fig. S-I).

Preparation of murine platelets

Blood was collected by ventricular puncture from mice (3-4 months; 20–30 g) anesthetized with a mixture of 75 mg kg⁻¹ of Ketamine (Vetalar) and 0.5 mg kg⁻¹ of Medetomidine (Domitor, Pfizer).

Washed platelets were prepared from PRP and resuspended in modified Tyrode buffer to a final concentration of $250 \times 10^6/\text{mL}$ (Yacoub, Hachem et al. 2010).

Measurement of platelet aggregation

Aggregation of mouse platelets was monitored on a four-channel optical aggregometer (Chronolog Corp.) under shear at 37°C, until stabilization of platelet aggregation. Platelets were pre-incubated with δ (V1-1)TAT or its vehicle for 5 minutes at 37°C prior to the addition of a platelet agonist: bovine α -thrombin (Sigma-Aldrich). We also used the rat anti-mouse antibody, clone Xia.B2 (Emfret Analytics) that recognizes and blocks GPIIb/IIIa on mouse platelets (Adam, Kauskot et al. 2010).

F(ab) fragment generation

F(ab) fragments of the Xia.B2 and of its isotype IgG control were generated using the Pierce F(ab) micro preparation kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions, and were dialyzed against PBS to remove sodium azide.

Tail-bleeding time and platelet count

Mice (3-4 months; 20-30 g) were anesthetized by intra-peritoneal injection of a mixture of 75 mg/kg Ketamine and 0.5 mg/kg Medetomidine. α -Thrombin was then injected into the jugular vein (2.5 μ L/g of animal weight) at an adjusted concentration that eventually corresponds to the appropriated concentration. Mice tails were transected at 4 mm from the tip using a scalpel blade and then immediately immersed in 0.9% isotonic saline at 37°C. The bleeding time was defined as the time required for cessation of blood flow.

Murine blood was collected from ventricular puncture into syringes containing one-twentieth blood volume of heparin as anticoagulant. Murine blood was then collected and platelet count was determined with a Coulter counter (Beckman Coulter).

Pulmonary thrombo-embolisms

Following the tail-bleeding time experiments, mice lungs were excised, fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned, stained with Verhoeff and analyzed for the presence of thrombo-emboli within the pulmonary vasculatures (Mustafa, Mispireta et al. 1989). Briefly, samples were visualized using an Olympus BX60 microscope (Olympus imaging America Inc.) and images were captured with a Retiga 2000R camera (QImaging Corporation), visualized and analyzed by the Image Pro Plus 6.2 software (Media Cybernetics).

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. Statistical comparisons were done using a one-way ANOVA, followed by an appropriated test for comparison against a single group. Data with $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

PKC δ negatively regulates mouse platelet aggregation through GPIb α

We have first used a pharmacological approach and showed that similarly to human platelets (Zaid *et al.* in preparation), δ (V1-1)TAT also enhanced platelet aggregation from WT mice in response to a priming dose of α -thrombin (Fig. 1A), while treatment with the control scrambled peptide showed no effect (Fig. 1B). To confirm our pharmacological-based approach, platelets from PKC δ -deficient mice were used. As anticipated, priming but not high concentration of thrombin-induced aggregation was significantly enhanced in platelets from PKC δ ^{-/-} mice, as compared to WT mice (Fig. 1A). Blockade of GPIb α entirely reversed this phenomenon, in both platelets derived from PKC δ ^{-/-} mice and platelets from WT mice pre-treated with δ (V1-1)TAT (Fig. 2). All together, these results indicate that similarly to human platelets, the lack of PKC δ in mice leads to enhanced platelet aggregation in a GPIb α -dependent manner, indicating that the GPIb α /PKC δ axis is a critical negative regulator of thrombin signaling and platelet function.

PKC δ deficiency reduces bleeding times and platelet counts in mice in response to low dose of α -thrombin through GPIb α

The implication of PKC δ downstream of GPIb α signaling in platelets has yet to be explored *in vivo* and this axis could play an important role in pathophysiological conditions. As shown in figure 3A, infusion of a high dose of α -thrombin into both PKC δ ^{-/-} and WT mice drastically reduces tail bleeding time. However, injection of a low dose of α -thrombin into WT mice was without any significant effect on bleeding time. In contrast, PKC δ ^{-/-} mice showed a significant 30% reduction in the tail bleeding time, confirming the *in vitro* potentiation of platelet function in the absence of PKC δ activity in response to a low dose of α -thrombin. Injection of the specific anti-mouse GPIb α blocking antibody into PKC δ ^{-/-} prior to injection of α -thrombin rescues these mice from the decrease in bleeding time (Fig. 3B).

This reduction also correlates with a significant reduction in platelet count in $PKC\delta^{-/-}$ (Fig. 4A). Injection of the specific anti-mouse GPIIb/IIIa blocking antibody into $PKC\delta^{-/-}$ prior to injection of α -thrombin rescues these mice from the decrease in platelet count (Fig. 4B). These results highlight the *in vivo* implication of the thrombin/GPIIb/IIIa/ $PKC\delta$ axis in the potentiation of platelet function.

The efficacy of this antibody was verified and showed to reverse the platelet aggregation potentiation process seen in $PKC\delta^{-/-}$ mice (Fig. S-II).

PKC δ deficiency increases pulmonary thrombo-embolisms in mice in response to low dose of α -thrombin through GPIIb/IIIa

To further investigate the role of $PKC\delta$ /GPIIb/IIIa axis *in vivo*, we assessed thrombo-emboli formation in WT and $PKC\delta^{-/-}$ mice in response to α -thrombin, as it has previously been documented that an increase in platelet activation correlates with an increase in emboli formation (Mustafa, Mispireta et al. 1989). As shown in figure 5, injection of a priming dose of α -thrombin was associated with a significant $\approx 80\%$ increase in thrombus mass in the lung vessels of $PKC\delta^{-/-}$, in comparison with WT mice. This effect was reversed by GPIIb/IIIa blockade, further highlighting the implication of the thrombin/GPIIb/IIIa/ $PKC\delta$ axis in platelet function and thrombus formation. Hence, this cascade seems to be a critical regulator of platelet function aimed at tempering and controlling cellular activation in the presence of suboptimal traces of thrombin.

Discussion

Platelet GPIIb/IIIa constitutes the high affinity receptor for thrombin in human platelets and it may represent a critical mediator of platelet activation and thrombus formation. This might be particularly important during the management of ACS, in cases where PAR antagonists are used as anti-platelet therapy. In addition, it is well established that GPIIb/IIIa contains a high-affinity binding site for α -thrombin on platelets (De Marco, Mazzucato et al. 1991), (Gralnick, Williams et al. 1994), albeit the full implication of this interaction has only recently emerged. Thrombin can activate platelets by either proteolytic or non-proteolytic mechanisms, and intact GPIIb/IIIa facilitates the platelet response to low but not high doses of thrombin (Lopez, Andrews et al. 1998).

The PKC family plays essential roles in regulating functional activities in most mammalian cell types. Regulation of the kinase activity of the PKC family members is complex and involves multiple convergent mechanisms. PKCs are a family of serine/threonine protein kinases that have a wide range of functions. There are three classes of PKCs; conventional PKCs (α , β I, β II, and γ) which require diacylglycerol and Ca^{2+} for activation, novel PKCs (δ , ϵ , η , and θ) which require only diacylglycerol for activation, and atypical PKCs (ζ , ν/λ) which require phospholipids for their activation. We have previously reported that PKC δ is important for platelet function in response to thrombin downstream GPIb α . Indeed, our previous studies show that PKC δ negatively regulates GPb α -mediated dense granule secretion and platelet aggregation. However, the function of PKC δ in thrombus formation has not yet been elucidated.

In addition to a pharmacological-based approach using a specific inhibitor of PKC δ , δ (V1-1)TAT, murine platelets from knockout model were used. As anticipated, a priming but not a high concentration of α -thrombin-induced aggregation was significantly enhanced in platelets from *PKC δ ^{-/-}* mice, as compared to WT mice. In addition, and similarly to human platelets, δ (V1-1)TAT also enhanced platelet aggregation from WT mice in response to a priming dose of α -thrombin. Blockade of GPIb α entirely prevented this phenomenon, in both platelets derived from *PKC δ ^{-/-}* mice and platelets from WT mice pre-treated with δ (V1-1)TAT. These data strongly suggest that PKC δ is an endogenous critical negative regulator of thrombin signaling and platelet function downstream GPIb α .

Previously, Pool's group showed that in PKC δ -deficient platelets, although both filopodial and lamellipodia do form sequentially, as in wild-type platelets, the filopodia do not subsequently disappear, unlike in the wild type, where filopodia are not apparent in the fully spread platelet (Pula, Schuh et al. 2006). This sustained appearance of filopodia in *PKC δ ^{-/-}* platelets also results in more extensive platelet aggregation, which is consistent with our results. The molecular mechanism underlying this functional change involves a physical interaction between PKC δ and the actin regulator vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP). PKC δ was shown to negatively regulate phosphorylation of VASP at Ser¹⁵⁷, reducing filopodial extension or promoting filopodial retraction, and thereby negatively controlling platelet-platelet interaction to limit aggregation (Wentworth, Pula et al. 2006).

As we have shown in a previous study, this potentiation of aggregation, following treatment with $\delta(V1-1)TAT$, was associated with PKC δ phosphorylation on Tyr³¹¹. Thus, we hypothesized that the lack of PKC is synonym of its phosphorylation. Tyr³¹¹ phosphorylation on PKC δ has been linked to increased kinase activity in H₂O₂ treated cells and altered PKC δ down regulation kinetics in cells transformed with Src (Blake, Garcia-Paramio et al. 1999).

The present study provides novel evidence demonstrating that the thrombin/GPIb α /PKC δ axis regulates thrombosis and hemostasis in an *in vivo* setting. *PKC δ ^{-/-}* mice that received a priming dose of α -thrombin had decreased tail bleeding times and platelet counts as compared to WT littermate control mice. In contrast, previous findings have shown no difference in thrombus formation between WT and *PKC δ ^{-/-}* mice in response to FeCl₃ carotid injury (Chari, Getz et al. 2009), probably due to the experimental model. Indeed, our model is thrombin dependent, whereas the FeCl₃ model primarily depends upon collagen fibers found within the sub-endothelial matrix following injury. Furthermore, *PKC δ ^{-/-}* mice pretreated with the F(ab) fragment of a GPIb α blocking antibody prior to α -thrombin injection were protected from decreased tail bleeding times and platelet count, indicating a recovery from the exacerbated platelet responses seen in the absence of PKC δ . In addition, the initial platelet count of KO mice is significantly higher than that of WT mice, which is consistent with a recent study showing that PKC δ deficiency causes enhanced platelet production (Kostyak, Bhavanasi et al. 2014).

Likewise, increases in platelet activation have already been shown to correlate with pulmonary thrombo-emboli formation, as platelets are incorporated within the thrombus masses (Mustafa, Mispireta et al. 1989). In accordance with these findings, our results indicate that the decrease in platelet count observed in *PKC δ ^{-/-}* mice treated with a low dose of α -thrombin correlates with an increase in thrombo-embolisms that localize in the lungs.

In conclusion, the present study has provided further evidence for a specific regulation and functions of PKC δ , and in particular has shown that PKC δ plays a selective role in potentiating the proximal events in the thrombin/GPIb α signaling pathway in mouse platelets leading to thrombus formation. Thus, the thrombin/GPIb α /PKC δ axis in platelets may represent a critical regulator of platelet function and hemostasis, and dysfunction of this pathway could lead to adverse thrombotic events.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Canada.

We thank Dr. Keiichi I. Nakayama and Dr. Keiko Nakayama (Medical Institute of Bio-regulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan) for the PKC δ -null mice. We also thank Marie-Élaine Clavet-Lantier and Marc-Antoine Gillis (Montreal Heart Institute) for their assistance.

Disclosure of Conflict of Interest

The authors state that they have no conflicts of interest.

References

- Adam, F., A. Kauskot, P. Nurden, E. Sulpice, M. F. Hoylaerts, R. J. Davis, J. P. Rosa and M. Bryckaert (2010). "Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation." Blood **115**(20): 4083-4092.
- Andrews, R. K. and M. C. Berndt (2013). "The GPIb-IX-V complex, in Platelets. Third Edition. Editor: Michelson. A.D." Academic Press **195-213**.
- Bhavanasi, D., S. Kim, L. E. Goldfinger and S. P. Kunapuli (2011). "Protein kinase Cdelta mediates the activation of protein kinase D2 in platelets." Biochem Pharmacol **82**(7): 720-727.
- Blake, R. A., P. Garcia-Paramio, P. J. Parker and S. A. Courtneidge (1999). "Src promotes PKCdelta degradation." Cell Growth Differ **10**(4): 231-241.
- Canobbio, I., C. Balduini and M. Torti (2004). "Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex." Cell Signal **16**(12): 1329-1344.
- Chari, R., T. Getz, B. Nagy, Jr., K. Bhavaraju, Y. Mao, Y. S. Bynagari, S. Murugappan, K. Nakayama and S. P. Kunapuli (2009). "Protein kinase C[delta] differentially regulates platelet functional responses." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(5): 699-705.
- Chen, L., H. Hahn, G. Wu, C. H. Chen, T. Liron, D. Schechtman, G. Cavallaro, L. Banci, Y. Guo, R. Bolli, G. W. Dorn, 2nd and D. Mochly-Rosen (2001). "Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11114-11119.
- Crosby, D. and A. W. Poole (2003). "Physical and functional interaction between protein kinase C delta and Fyn tyrosine kinase in human platelets." J Biol Chem **278**(27): 24533-24541.
- De Marco, L., M. Mazzucato, A. Masotti, J. W. Fenton, 2nd and Z. M. Ruggeri (1991). "Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin." J Biol Chem **266**(35): 23776-23783.
- Gralnick, H. R., S. Williams, L. P. McKeown, K. Hansmann, J. W. Fenton, 2nd and H. Krutzsch (1994). "High-affinity alpha-thrombin binding to platelet glycoprotein Ib alpha: identification of two binding domains." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6334-6338.
- Inagaki, K., L. Chen, F. Ikeno, F. H. Lee, K. Imahashi, D. M. Bouley, M. Rezaee, P. G. Yock, E. Murphy and D. Mochly-Rosen (2003). "Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo." Circulation **108**(19): 2304-2307.

Jandrot-Perrus, M., M. C. Bouton, F. Lanza and M. C. Guillin (1996). "Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib." Semin Thromb Hemost **22**(2): 151-156.

Kostyak, J. C., D. Bhavanasi, E. Liverani, S. E. McKenzie and S. P. Kunapuli (2014). "Protein kinase C delta deficiency enhances megakaryopoiesis and recovery from thrombocytopenia." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(12): 2579-2585.

Lane, D. A., H. Philippou and J. A. Huntington (2005). "Directing thrombin." Blood **106**(8): 2605-2612.

Lopez, J. A., R. K. Andrews, V. Afshar-Kharghan and M. C. Berndt (1998). "Bernard-Soulier syndrome." Blood **91**(12): 4397-4418.

Macfarlane, R. G. (1964). "An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier." Nature **202**: 498-499.

Miyamoto, A., K. Nakayama, H. Imaki, S. Hirose, Y. Jiang, M. Abe, T. Tsukiyama, H. Nagahama, S. Ohno, S. Hatakeyama and K. I. Nakayama (2002). "Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta." Nature **416**(6883): 865-869.

Murugappan, S., F. Tuluc, R. T. Dorsam, H. Shankar and S. P. Kunapuli (2004). "Differential role of protein kinase C delta isoform in agonist-induced dense granule secretion in human platelets." J Biol Chem **279**(4): 2360-2367.

Mustafa, M. H., L. A. Mispireta and L. E. Pierce (1989). "Occult pulmonary embolism presenting with thrombocytopenia and elevated fibrin split products." Am J Med **86**(4): 490-491.

Newton, A. C. (2001). "Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions." Chem Rev **101**(8): 2353-2364.

Pula, G., K. Schuh, K. Nakayama, K. I. Nakayama, U. Walter and A. W. Poole (2006). "PKCdelta regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation." Blood **108**(13): 4035-4044.

Ruggeri, Z. M. (2002). "Platelets in atherothrombosis." Nat Med **8**(11): 1227-1234.

Savage, B., E. Saldivar and Z. M. Ruggeri (1996). "Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor." Cell **84**(2): 289-297.

Sixma, J. J., M. E. Schiphorst, C. L. Verweij and H. Pannekoek (1991). "Effect of deletion of the A1 domain of von Willebrand factor on its binding to heparin, collagen and platelets in the presence of ristocetin." Eur J Biochem **196**(2): 369-375.

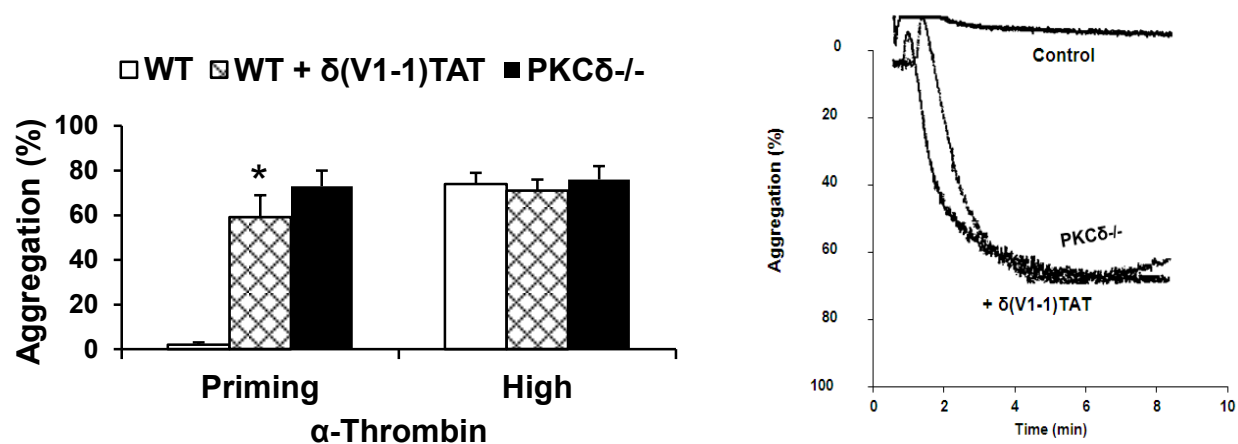
Steinberg, S. F. (2004). "Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta." Biochem J **384**(Pt 3): 449-459.

Yacoub, D., A. Hachem, J. F. Theoret, M. A. Gillis, W. Mourad and Y. Merhi (2010). "Enhanced levels of soluble CD40 ligand exacerbate platelet aggregation and thrombus formation through a CD40-dependent tumor necrosis factor receptor-associated factor-2/Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(12): 2424-2433.

Yacoub, D., J. F. Theoret, L. Villeneuve, H. Abou-Saleh, W. Mourad, B. G. Allen and Y. Merhi (2006). "Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release." J Biol Chem **281**(40): 30024-30035.

Figure 1

A



B

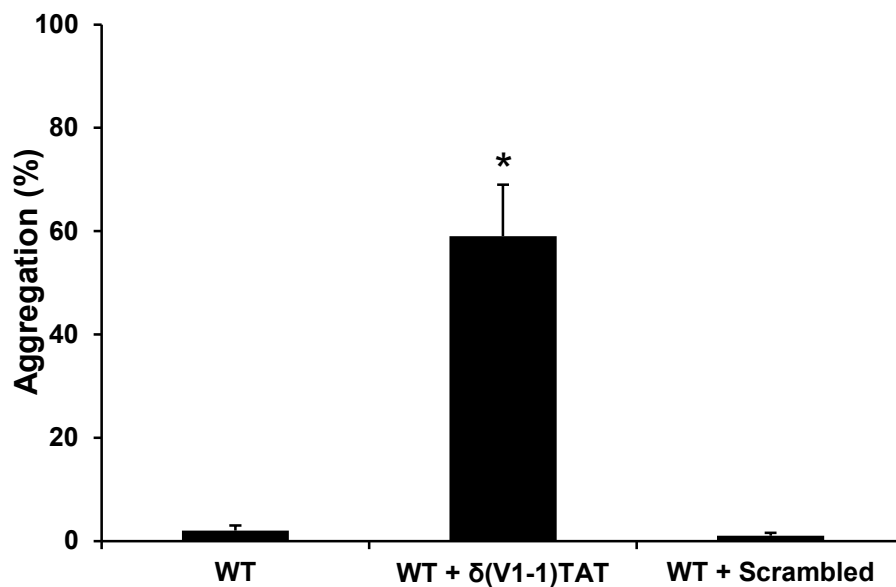


Figure 2

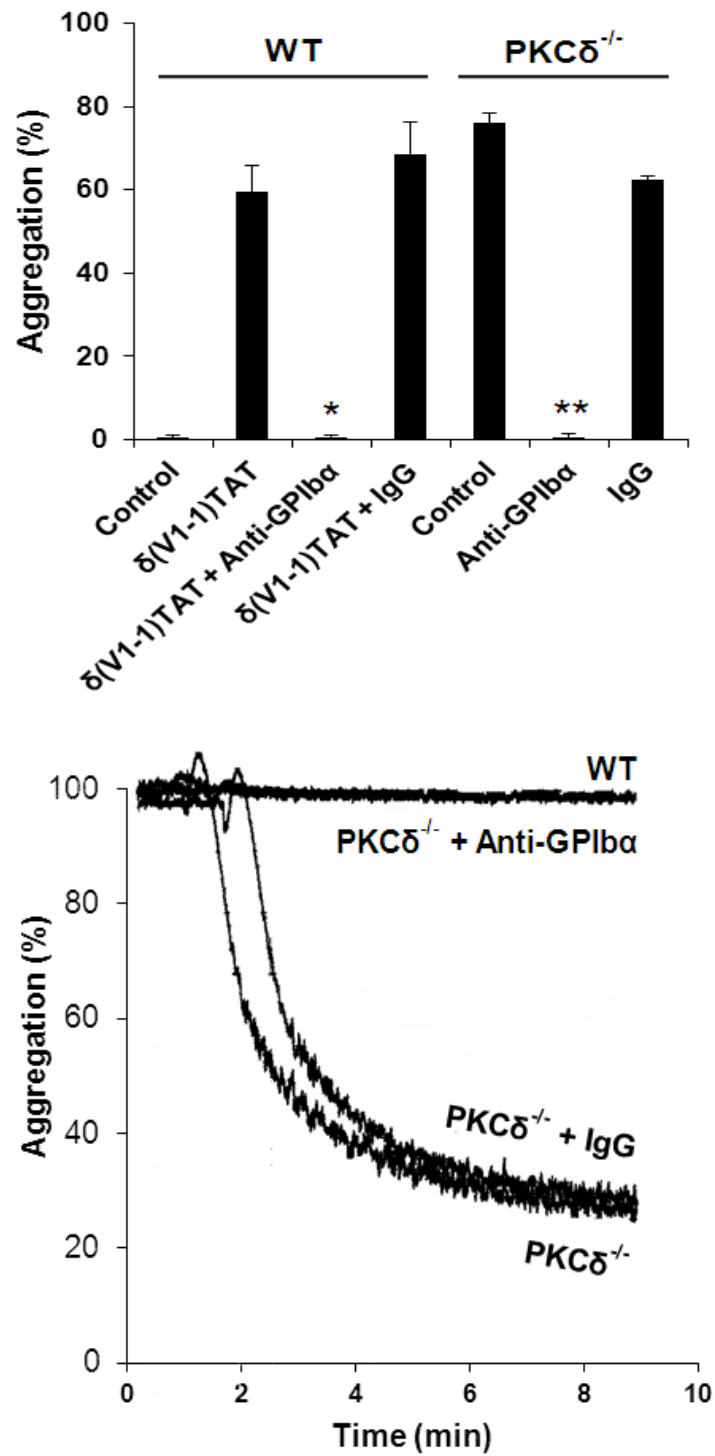


Figure 4

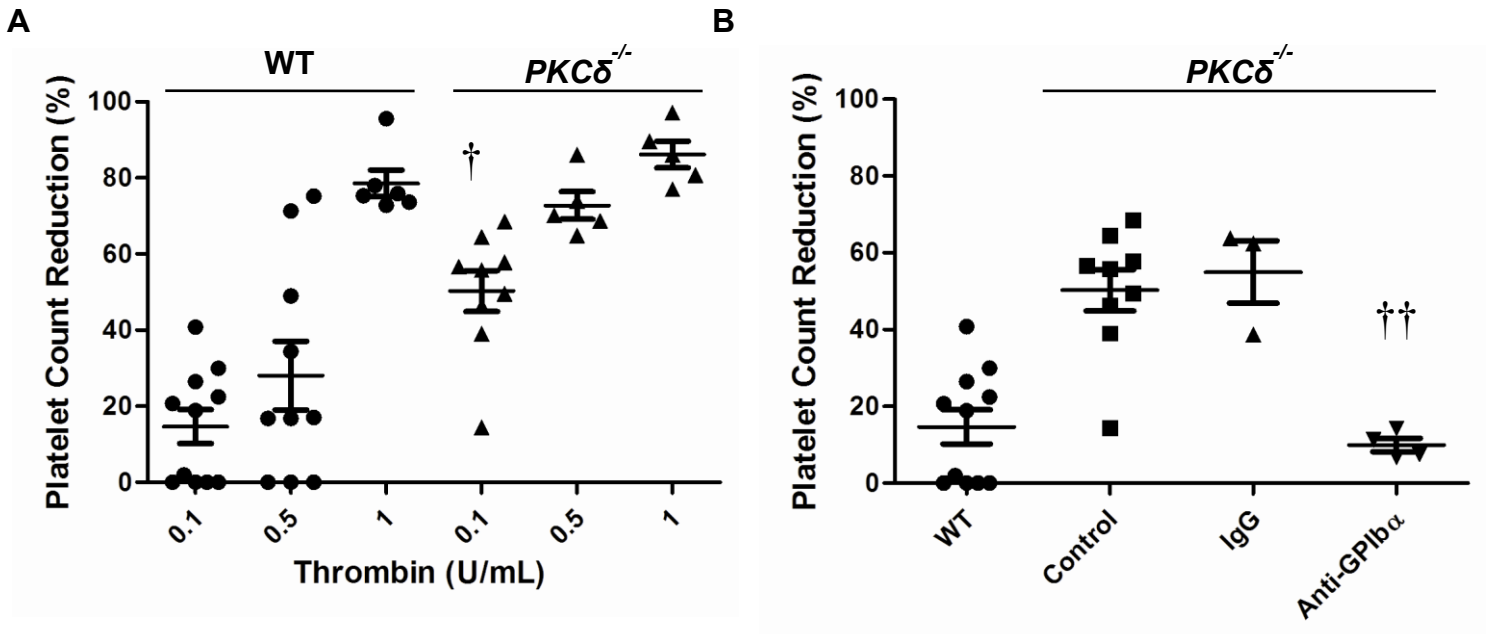
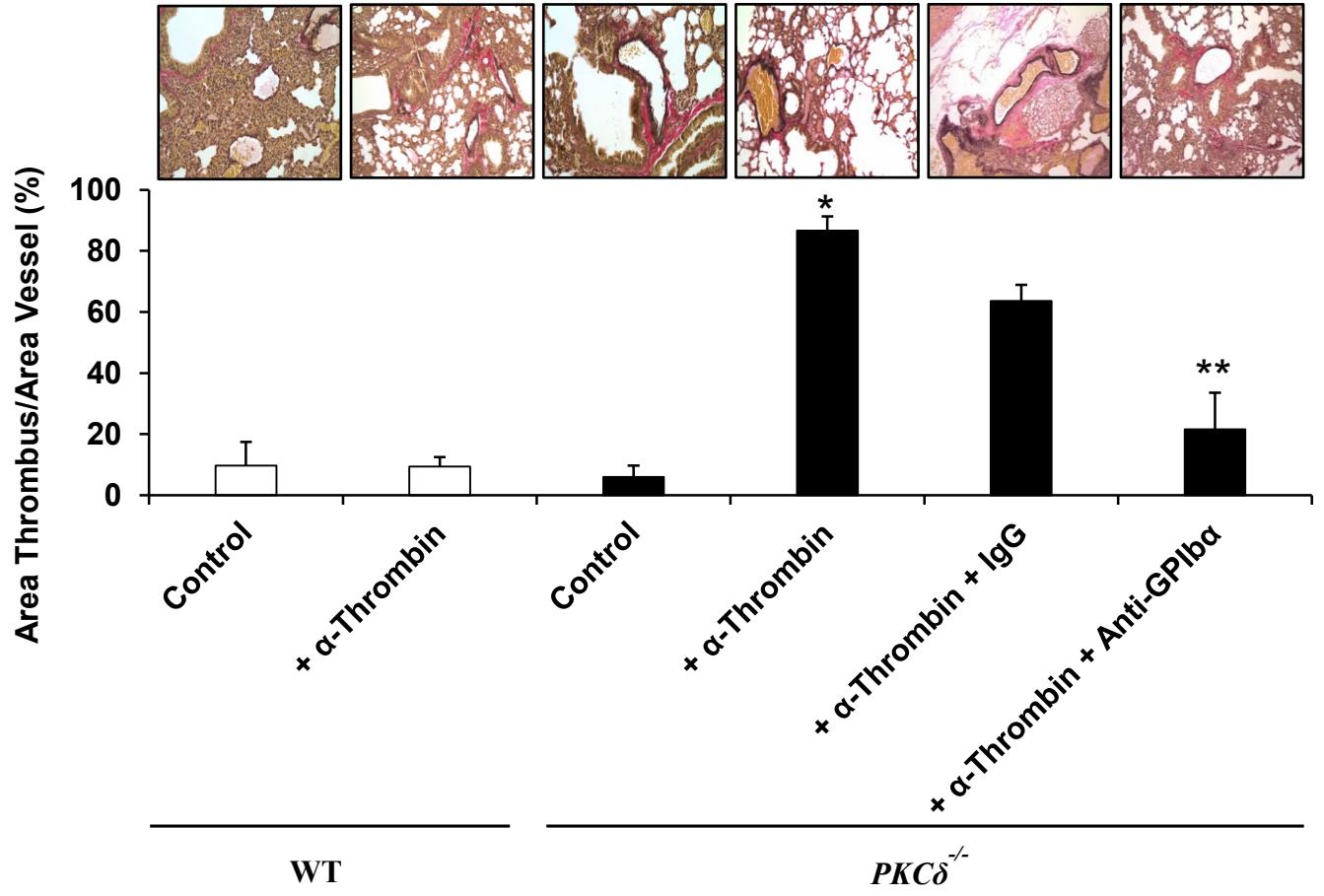
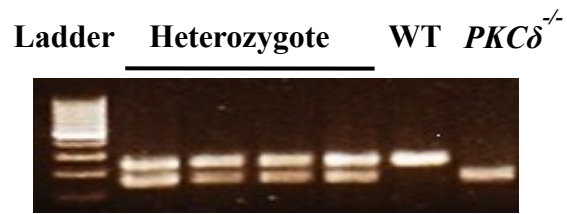


Figure 5

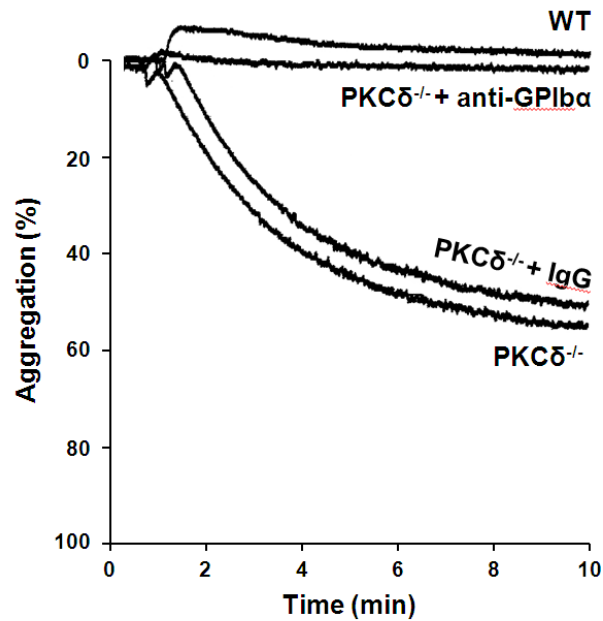


Supplemental Figure I



Supplemental Figure I: Mice genotyping. PCR was performed on DNA obtained from mice ear clips as mentioned in Materials and Methods. PCR products were then run on agarose gel and visualized with UV light. Upper bands represent amplified $PKC\delta$ DNA from WT mice, lower bands represent $PKC\delta$ DNA from $PKC\delta^{-/-}$ mice and double bands represent $PKC\delta$ DNA from heterozygote mice.

Supplemental Figure II



Supplemental Figure II: Anti-GPIb α F(ab) fragment prevents the potentiation of mouse platelet aggregation in *PKC $\delta^{-/-}$* . Platelets were preincubated with 20 μ g/mL of F(ab) fragment of the anti-GPIb α or its IgG isotype control for 5 minutes at 37°C. Aggregation was then initiated by a 0.1 U/mL of α -thrombin. Traces are representative of aggregation traces (n=3).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. PKC δ negatively regulates mouse platelet aggregation through GPIIb α . **A**, PKC δ inhibition in WT mice or its deficiency potentiates platelet aggregation in response to a low but not high dose of α -thrombin. Platelets from *PKC δ ^{-/-}* mice and from WT mice pre-treated with δ (V1-1)TAT (1 μ mol/L) for 5 minutes at 37°C were stimulated with a priming (0.1 U/mL) (n=5) and high (0.5 U/mL) (n=3) doses of α -thrombin; **P*<0.05 versus WT α -thrombin priming. **B**, The scrambled peptide of δ (V1-1)TAT (1 μ mol/L) has no effect on mouse platelet aggregation in response to a low dose of α -thrombin (n=3); **P*<0.05 versus all.

Figure 2. GPIIb α blockade prevents PKC δ deficiency- and δ (V1-1)TAT-induced potentiation of platelet aggregation. Platelets from WT mice pre-treated with δ (V1-1)TAT and from *PKC δ ^{-/-}* mice were incubated with a mouse anti-GPIIb α antibody (20 μ g/mL) or its isotype IgG control for 5 minutes at 37°C. Aggregation was then monitored in the presence of a priming dose of α -thrombin. Histogram represents the mean of data \pm SEM of representative aggregation traces on the right (n=3); **P*<0.05 versus WT δ (V1-1)TAT; ***P*<0.05 vs control *PKC δ ^{-/-}*.

Figure 3. A, PKC δ deficiency reduces bleeding time in response to a low dose of α -thrombin. Mice were injected with low (0.1 U/mL) or high (1 U/mL) doses of α -thrombin into the jugular vein (2.5 μ L/g). The bleeding time was then assessed and defined as the time required for cessation of blood flow. Dot plots represent the bleeding time, for WT (●) and *PKC δ ^{-/-}* (▲) (control n=11, low dose n=10 and high dose n=5); †*P* < 0.05 versus WT low dose thrombin and *PKC δ ^{-/-}* control, **B**, GPIIb α blockade reverses the reduced bleeding time in *PKC δ ^{-/-}* mice in response to a low dose of α -thrombin. *PKC δ ^{-/-}* mice were initially treated with the Fab fragment of the anti-GPIIb α antibody (2 μ g/g) or its isotype control IgG and followed by a low dose of α -thrombin (0.1 U/mL) injection into the jugular vein prior to tail transection. Dot plots represent the bleeding time (WT and control *PKC δ ^{-/-}* n=10, anti-GPIIb α n=4 and IgG n=3); ††*P* < 0.05 versus control and IgG.

Figure 4. A, PKC δ deficiency reduces platelet count in response to a low dose of α -thrombin. Mice were injected with low (0.1 U/mL) or high (1 U/mL) doses of α -thrombin into the jugular vein (2.5 μ L/g). For the platelet count, murine whole blood was retrieved by heart puncture and then assessed with a Coulter counter. Dot plots represent the platelet count reduction as compared to control, for WT

(●) and $PKC\delta^{-/-}$ (▲) (control n=11, low dose n=10 and high dose n=5); † $P < 0.05$ versus WT 0.1 thrombin. **B**, GPIb α blockade reverses the platelet count in $PKC\delta^{-/-}$ mice in response to a low dose of α -thrombin. $PKC\delta^{-/-}$ mice were initially treated with the Fab fragment of the anti-GPIb α antibody (2 μ g/g) or its isotype control IgG and followed by a low dose of α -thrombin (0.1 U/mL) injection into the jugular vein prior to platelet count assessment. Dot plots represent the platelet count reduction as compared to control (WT and control $PKC\delta^{-/-}$ n=10, anti-GPIb α n=4 and IgG n=3); †† $P < 0.05$ versus control and IgG.

Figure 5. PKC δ negatively regulates platelet function and pulmonary thrombo-emboli formation *in vivo* through GPIb α . (*Top*) WT and $PKC\delta^{-/-}$ mice initially treated or not with the F(ab) fragment of the anti-GPIb α antibody (2 μ g/g) or its isotype IgG control and then injected with a priming dose (0.1 U/mL) of α -thrombin into the jugular vein. Lung sections from these mice were stained with Verhoeff and observed by optical microscopy (magnification, $\times 10$). (*Bottom*) Morphometrical quantification of pulmonary thrombo-emboli in WT and $PKC\delta^{-/-}$ mice, represented as the ratio of thrombus area over vessel area (n ≥ 5); * $P < 0.05$ versus WT Control, WT + α -thrombin and $PKC\delta^{-/-}$ Control; ** $P < 0.05$ versus $PKC\delta^{-/-}$ + α -thrombin and $PKC\delta^{-/-}$ + α -thrombin + IgG.

Discussion générale

Trois grandes fonctions contribuent aux propriétés hémostatiques de la plaquette: sa capacité à adhérer à la surface du vaisseau endommagé, à s'activer en réponse à différents agonistes solubles, et à agréger avec d'autres plaquettes adjacentes pour former ce qu'on appelle le clou hémostatique. Son aptitude à focaliser et à amplifier la génération de thrombine participe quant à elle à la consolidation du thrombus en favorisant la coagulation (Ruggeri 2002). Une réaction démesurée de ces mécanismes pourrait mener à la survenue d'une thrombose.

Le complexe GPIb-IX-V, composé de quatre récepteurs transmembranaires: le GPIb α (CD42b), le GPIb β (CD42c), le GPIX (CD42a) et le GPV (CD42d) (Berndt, Shen et al. 2001), permet le recrutement des plaquettes circulantes au niveau d'une brèche vasculaire et conduit à leur adhésion stable. Ce recrutement constitue une étape clé qui précède la mobilisation de l'intégrine α IIb β 3 et l'agrégation plaquettaire (Savage, Cattaneo et al. 2001). Les propriétés réceptrices de ce complexe sont portées essentiellement par le récepteur GPIb α au niveau de son extrémité N-terminale extracellulaire.

La thrombine, enzyme clé de la coagulation, est aussi un puissant agoniste plaquettaire qui peut non seulement cliver les PARs, mais aussi interagir avec le récepteur GPIb α par un mécanisme indépendant de l'activité catalytique (Jamieson 1997).

Le GPIb α comporte en effet un site de haute affinité pour la thrombine. Il a été démontré que son absence chez les patients Bernard-Soulier, ou son inactivation par des anticorps, des peptides ou par clivage enzymatique rend les plaquettes moins réactives à la thrombine (Jamieson 1997). Plusieurs mécanismes ont été avancés pour élucider le rôle de cette interaction thrombine-GPIb α . Selon quelques études, cette liaison permettrait d'augmenter la concentration locale en thrombine, de la protéger de ses inhibiteurs physiologiques ou encore de modifier son affinité pour les récepteurs PARs, indiquant que le récepteur GPIb α sert de cofacteur pour le récepteur PAR-1 (De Candia, Hall et al. 2001), (De Cristofaro, De Candia et al. 2000). D'autres études suggèrent une signalisation intracellulaire propre par un processus indépendant de l'activité enzymatique de la thrombine impliquant plusieurs partenaires intracellulaires y compris les PKCs (Mangin, David et al. 2004), (Dubois, Steiner et al. 2003), (Crosby and Poole 2003). D'autre part, la thrombine bloquée au niveau du site actif et immobilisée sur une surface permet l'adhésion, l'activation de l'intégrine α IIb β 3 et la sécrétion plaquettaire par une voie

dépendante du GPIb α (Adam, Guillin et al. 2003). La liaison de thrombine au récepteur GPIb α entraînerait également l'exposition de phospholipides anioniques impliqués dans l'activité procoagulante des plaquettes (Dormann, Clemetson et al. 2000).

La sous-unité GPIb α du complexe GPIb-IX-V représente alors un médiateur critique de l'activation plaquettaire et la formation du thrombus. Cela pourrait être particulièrement important dans le traitement des patients cardiaques avec syndrome coronarien aigu (SCA), notamment dans les cas où les antagonistes PARs sont utilisés comme thérapie antiplaquettaire. Il a été précédemment prouvé que l'isoforme PKC δ peut négativement et positivement réguler la fonction plaquettaire en réponse à différents agonistes plaquettaires, y compris la thrombine (Crosby and Poole 2003) (Pula, Schuh et al. 2006, Yacoub, Theoret et al. 2006) (Chari, Getz et al. 2009). Par conséquent, ce travail a été conçu pour étudier la fonction plaquettaire en réponse à la thrombine *via* GPIb α ainsi que pour évaluer l'implication de la PKC δ dans ce processus.

Les PKCs occupent une place importante dans le processus de l'agrégation plaquettaire. Plusieurs études ont démontré leur implication dans ce phénomène en réponse à une variété d'agonistes plaquettaires. Par exemple, l'agrégation plaquettaire induite à la thrombine, au collagène et au calcium ionophore A23187 est significativement atténuée en présence d'inhibiteurs sélectifs des PKCs, (Kaibuchi, Takai et al. 1983, Siess and Lapetina 1988, Toullec, Pianetti et al. 1991). De plus, l'activation de l'intégrine α IIb β 3, composante clé du processus de l'agrégation plaquettaire, est bloquée en présence de ces inhibiteurs, ce qui explique l'importance des PKCs dans les mécanismes cellulaires menant au phénomène de l'agrégation plaquettaire (Shattil and Brass 1987).

Cependant, le rôle de chaque isoforme de la famille des PKCs dans le processus de l'agrégation plaquettaire est peu documenté. Toutefois, il a été rapporté que l'isoforme PKC α est essentiel à l'agrégation plaquettaire au Ca²⁺ (Tabuchi, Yoshioka et al. 2003). De plus, plusieurs études ont montré un double rôle de la PKC δ dans l'agrégation plaquettaire (Crosby and Poole 2003, Yacoub, Theoret et al. 2006, Chari, Getz et al. 2009).

Tout d'abord, nous avons trouvé que l'inhibition de la PKC δ ou une déficience en PKC δ potentialise l'agrégation plaquettaire induite par une dose d'amorçage de α -thrombine aussi bien chez l'humain que chez la souris. Cette potentialisation est dépendante du récepteur GPIb α . En second lieu, nous avons

montré une diminution du temps de saignement et une exacerbation de la formation de thromboembolies pulmonaires chez les souris *PKC δ ^{-/-}* en réponse à de faibles doses de α -thrombine.

Nos résultats et ceux des études antérieures suggèrent que la PKC δ régule la fonction plaquettaire dépendamment de la nature et de la concentration de l'agoniste. En effet, la PKC δ régule négativement l'agrégation des plaquettes en réponse au collagène (Crosby and Poole 2003), (Pula, Schuh et al. 2006). En revanche, Chari *et al.* (Chari, Getz et al. 2009) ont montré une inhibition partielle de la sécrétion granulaire dans les plaquettes dérivées de souris *PKC δ ^{-/-}* et dans les plaquettes traitées avec δ (V1-1)TAT (inhibiteur spécifique de la PKC δ) en réponse au TRAP-4 (activateur du récepteur PAR-4). Toutefois, cette réduction de la sécrétion n'a été observée qu'à de faibles doses. À de fortes doses de TRAP-4, aucun effet n'a été enregistré. Il est à signaler que cette étude n'a pas évalué l'agrégation plaquettaire, et la préparation des plaquettes a été faite en présence de l'indométhacine ou l'aspirine (Chari, Getz et al. 2009), ce qui exclut le rôle des médiateurs secondaires (ADP, TXA₂) dans cette signalisation médiée par la PKC δ .

Notre étude, effectuée en l'absence d'inhibiteurs plaquettaires, n'est pas en accord avec ces résultats. Nos résultats montrent en effet que l'inhibition de la production du TXA₂ prévient la potentialisation de l'agrégation enregistrée suite à la stimulation du GPIIb α par la thrombine en absence du PKC δ , indiquant le rôle central du TXA₂ dans ce processus.

En concordance avec nos résultats, lorsque les plaquettes sont stimulées par la convulxine, un agoniste spécifique du GPVI, la PKC δ joue un rôle négatif dans la sécrétion de sérotonine puisque son inhibition a montré une potentialisation de la sécrétion (Murugappan, Tuluc et al. 2004). La régulation de la sécrétion granulaire par la PKC δ dépend ainsi des mécanismes signalétiques par lesquels elle est activée. Selon Crosby et Poole, la régulation négative de la sécrétion de sérotonine par la PKC δ est dépendante de son interaction physique avec la tyrosine kinase Fyn (Crosby and Poole 2003). Suite à l'activation plaquettaire à l'alboaggrégine-A, un puissant agoniste de GPVI et GPIIb-IX-V, la PKC δ s'active et interagit avec Fyn, ce qui module négativement la sécrétion de sérotonine, en plus de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ et l'agrégation plaquettaire (Crosby and Poole 2003).

D'un autre côté, en utilisant deux approches pharmacologique et génétique complémentaires, nous avons démontré que la PKC δ régule négativement la fonction des plaquettes en réponse à de faibles doses mais pas à des doses élevées de α -thrombine, et ceci indépendamment des PARs. L'inhibition spécifique du site de liaison de haute affinité de la thrombine sur la GPIb α , en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques, inverse cette potentialisation de l'agrégation plaquettaire et la sécrétion, ce qui indique que l'axe GPIb α /PKC δ peut moduler l'activation plaquettaire en présence de concentrations sous-optimales de la thrombine.

La phosphorylation des PKCs est un mécanisme de régulation essentiel indispensable pour leur activité. Toutefois, l'implication de la phosphorylation PKC δ dans la signalisation induite par la thrombine en aval du GPIb α reste encore inconnue. La thrombine peut activer les plaquettes soit par une activité protéolytique *via* les PARs ou par un mécanisme non enzymatique *via* le GPIb α (Lopez, Andrews et al. 1998). L'interaction de la thrombine avec GPIb α a deux rôles potentiels (Ramakrishnan, DeGuzman et al. 2001). Tout d'abord, elle est impliquée dans la régulation de la coagulation suite à la localisation du facteur XI à son site sur le GPIb α . De plus, Cette interaction peut induire une signalisation dans les plaquettes selon deux façons: soit en agissant comme un co-facteur pour une activation des PARs dépendante de la thrombine, ou encore par signalisation directe *via* le récepteur GPIb α .

Nos résultats montrent une augmentation de la phosphorylation de la PKC δ sur le site Tyr³¹¹ en présence du δ (V1-1)TAT, qui est prévenue suite au blocage spécifique du GPIb α , ce qui confirme la présence d'un signal déclenché en aval du récepteur GPIb α . Les résultats de la microscopie confocale montrent que la PKC δ , malgré sa phosphorylation, reste bloquée dans le cytoplasme des plaquettes prétraitées avec le δ (V1-1)TAT, et donc est incapable d'exercer son activité qui se produit habituellement à la membrane cytoplasmique.

Des études antérieures ont montré l'implication de Lyn et Src dans la phosphorylation de la PKC δ (Blake, Garcia-Paramio et al. 1999), (Chari, Kim et al. 2009). La signalisation *via* les PARs implique la voie des protéines G, contrairement au GPIb α qui se sert de protéines effectrices telles que le 14-3-3 ζ , la calmoduline, la PI3-kinase et la kinase Src pour induire une signalisation intracellulaire induite par le VWF (Munday, Berndt et al. 2000), (Andrews, Munday et al. 2001), (Wu, Asazuma et al. 2003), (Dai,

Bodnar et al. 2005). Toutefois, en réponse à la thrombine, la voie MAPK est connue pour jouer un rôle important dans l'agrégation plaquettaire en aval du GPIb α (Dubois, Steiner et al. 2003). Dans cette perspective, nous avons trouvé que l'inhibition de la PKC δ augmente à la fois la phosphorylation de p38 MAPK et ERK-1/2, tandis que leur inhibition spécifique inverse la potentialisation de l'agrégation des plaquettes suite à la stimulation du GPIb α par de faibles doses de thrombine en absence de la PKC δ .

En résumé, la famille des PKCs est activement impliquée dans la physiologie plaquettaire et les principaux récepteurs membranaires, tels que le récepteur au collagène (GPVI) et les récepteurs de la thrombine (GPIb-IX-V et PARs), déclenchent tous l'activation de mécanismes signalétiques qui dépendent des PKCs. Cependant, la contribution de chaque membre de la famille des PKCs dans la fonction plaquettaire demeure encore mal élucidée et le défi principal se rapportant à ce domaine d'étude vise justement à identifier les différents mécanismes de régulation qui découlent de chacun de ces isoformes.

La présente étude fournit de nouvelles évidences démontrant que l'axe thrombine/GPIb α /PKC δ régule la thrombose et l'hémostase dans un cadre *in vivo*. En effet, les souris PKC δ ^{-/-} injectées par des doses sous-optimales de α -thrombine ont montré une diminution significative du temps de saignement par rapport à des souris WT. En revanche, des résultats antérieurs n'ont montré aucune différence dans la formation du thrombus entre les souris transgéniques et WT suite à une lésion de la carotide provoquée expérimentalement par le FeCl₃ (Chari, Getz et al. 2009). Néanmoins, cette différence pourrait être expliquée par le fait que notre modèle est dépendant de la thrombine, alors que le modèle FeCl₃ dépend principalement des fibres de collagène présentes au niveau de la matrice sous-endothéliale exposée après la lésion. Par ailleurs, les souris PKC δ ^{-/-} injectées par le fragment Fab d'un anticorps bloquant le GPIb α ont montré une protection contre la diminution du temps de saignements.

Cette hyperactivité plaquettaire a été déjà associée à la formation de thrombo-embolies pulmonaires (Mustafa, Mispireta et al. 1989). Les souris PKC δ ^{-/-} injectées préalablement par le fragment Fab de l'anti-GPIb α ont montré moins de thrombo-embolies présentes dans le système vasculaire des poumons suite à une stimulation par la thrombine, ce qui indique une diminution de l'activation des plaquettes dans la circulation périphérique.

Au terme de cette étude, nous pourrions dire que suite à une stimulation par de faibles doses de thrombine, le récepteur GPIb α régule négativement l'activation et l'agrégation plaquettaires ainsi que la formation du thrombus. Cette régulation semble être principalement dépendante de la PKC δ , mais aussi du TXA $_2$ et de la voie des MAPK. La figure 5.1 met en évidence cette nouvelle voie de signalisation déclenchée par l'axe GPIb α -PKC δ en réponse à de faibles doses de thrombine. Le signal transmis par le GPIb α (récepteur membranaire) à la PKC δ (protéine intracellulaire) passe probablement par plusieurs molécules. Des protéines impliquées dans la modulation de la réponse plaquettaire suite à l'interaction vWR-GPIb α telles que la calmoduline, le 14-3-3, la PI3-K et les protéines de la famille Src, pourraient également jouer un rôle dans la régulation des plaquettes suite à l'activation spécifique du site de la thrombine sur le récepteur GPIb α .

De plus, le complexe SPL/RGS/SHP-1, en conditions physiologiques, permet de maintenir l'état de repos des plaquettes en maximisant l'impact de la PGI $_2$, alors que suite à un endommagement vasculaire, le complexe libère progressivement des protéines RGS afin de limiter l'activation des plaquettes (inhibition des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)) et fournir alors un mécanisme d'homéostasie temporel entre les événements pro- et anti-thrombotiques (Ma, Cierniewska et al. 2012).

D'un autre côté, il est bien documenté que la PKC δ interagit avec la SHP-1 dans les plaquettes ainsi que dans d'autres types cellulaires (Chari, Kim et al. 2009, Geraldès, Hiraoka-Yamamoto et al. 2009). Ceci nous amène à supposer que la PKC δ régule négativement la fonction plaquettaire par l'intermédiaire du complexe SPL/RGS/SHP-1.

Par ailleurs, GRK2, une protéine de la famille des récepteurs kinases couplés aux protéines G, est aussi impliquée dans l'inhibition de la famille des RCPG (Penela, Murga et al. 2010). Le rôle de la famille des PKCs dans la phosphorylation de GRK2 (Krasel, Dammeier et al. 2001), pourrait aussi expliquer la régulation négative de la fonction plaquettaire par la PKC δ observée dans nos résultats.

Quoique le GPIb α possède toutes les propriétés réceptrices du complexe GPIb-IX-V, la sous-unité glycoprotéine V (GPV) de ce complexe est, semble-t-il, capable de moduler la réponse des plaquettes aux deux plus forts agonistes physiologiques, la thrombine et le collagène. La thrombine clive

Conclusion et perspectives

Quoiqu'une diminution considérable de la mortalité due aux maladies cardiovasculaires ait été enregistrée depuis quelques décennies, ces pathologies demeurent une des premières causes de décès dans les pays occidentaux. Ces dernières années ont été marquées par l'apparition de nouveaux agents antiplaquettaires, ciblant particulièrement des récepteurs/molécules de surface (clopidogrel, ticagrelor, anti-GPIIb/IIIa, et l'anti-PAR-1), et il ne serait pas surprenant de voir apparaître, dans les années à venir, d'autres innovations pharmacologiques ciblant des voies de signalisation spécifique à l'activation plaquettaire. Dans ce contexte, les résultats de cette étude mettent en évidence une nouvelle voie de signalisation plaquettaire qui pourrait faire l'objet d'une cible thérapeutique dans les réactions thrombotiques. En effet, à travers ce travail, nous avons montré, pour la première fois, que le récepteur GPIIb α régule négativement la fonction plaquettaire et la formation des thrombo-embolies pulmonaires *via* la PKC δ , en réponse à de faibles concentrations de thrombine. Ceci a été démontré par une approche pharmacologique à l'aide d'un inhibiteur spécifique de la translocation de la PKC δ à la membrane, ainsi qu'avec une approche génétique en utilisant des plaquettes provenant de souris déficientes en PKC δ . L'absence ou l'inhibition de la PKC δ prédispose les plaquettes à devenir plus réactives en réponse à des doses sous-optimales de thrombine. Ce phénomène d'hyperréactivité des plaquettes a été associé à une relâche accrue de granules, de génération de TXA₂ et une phosphorylation de la PKC δ sur la Tyr³¹¹. Par ailleurs, une étude menée *in vivo* chez des souris transgéniques PKC δ ^{-/-} a montré, suite à une injection par α -thrombine, une diminution significative du temps de saignement ainsi qu'une formation de thrombo-embolies pulmonaires. En bloquant le GPIIb α , ces effets ont été renversés.

Tel que discuté plus haut, la sous-unité GPV du complexe GPIb-IX-V, ADAM17 qui est une enzyme clé dans la modulation de GPV, ainsi que le complexe SPL/RGS/SHP-1 sont d'autres molécules intracellulaires qui n'ont pas été concernées par cette étude et qui pourraient probablement être de bonnes candidates pour faire l'objet d'expériences futures afin de décortiquer davantage cette nouvelle voie de signalisation. Il serait en effet intéressant de vérifier si le GPV est clivé en réponse à de faibles doses de thrombine et si l'inhibition d'ADAM17 pourrait prévenir les effets enregistrés dans l'activation et l'agrégation des plaquettes. L'étude de la phosphorylation de SHP-1 sur différents sites potentiels pourrait être aussi une indication de son implication dans cette voie de signalisation. En effet, nos résultats préliminaires (non publiés) montrent une phosphorylation du SHP-1 sur la Tyr⁵³⁶ en

absence de l'activité de PKC δ et en réponse à de faibles doses de thrombine. Il serait également plus judicieux d'évaluer l'implication de chaque isoforme de la famille des PKCs suite à l'interaction thrombine-GPIIb α .

Cependant, les questions spécifiques que soulève notre étude et qui méritent d'être examinées sont:

- 1- Quels sont les autres partenaires intracellulaires de la PKC δ impliqués dans la signalisation via l'axe thrombine-GPIIb α -PKC δ ?
- 2- PAR-1 peut-il jouer le rôle de co-facteur pour le récepteur GPIIb α ?
- 3- Quelle est la relation entre la phosphorylation de la PKC δ et son activité?

Ce travail a permis de dégager de nouvelles pistes intéressantes basées sur le ciblage du site de liaison de la thrombine sur le récepteur GPIIb α . Cette interaction régule négativement l'activation plaquettaire, l'agrégation et la formation du thrombus en réponse à des concentrations sous-optimales de thrombine. Ainsi, la modulation de cette voie pourrait éventuellement constituer une cible dans la prévention et le traitement du SCA. Au-delà de l'aspect pharmacologique, ces études améliorent notre compréhension de la signalisation en aval du GPIIb α et des mécanismes cellulaires et moléculaires dans la régulation de l'activation et l'agrégation des plaquettes ainsi que la formation du thrombus.

Références bibliographiques

- Adam, F., M. C. Bouton, M. G. Huisse and M. Jandrot-Perrus (2003). "Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib alpha." Trends Mol Med **9**(11): 461-464.
- Adam, F., M. C. Guillin and M. Jandrot-Perrus (2003). "Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin." Eur J Biochem **270**(14): 2959-2970.
- Adam, F., A. Kauskot, P. Nurden, E. Sulpice, M. F. Hoylaerts, R. J. Davis, J. P. Rosa and M. Bryckaert (2010). "Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation." Blood **115**(20): 4083-4092.
- Anderson, C. L., G. W. Chacko, J. M. Osborne and J. T. Brandt (1995). "The Fc receptor for immunoglobulin G (Fc gamma RII) on human platelets." Semin Thromb Hemost **21**(1): 1-9.
- Andonegui, G., S. M. Kerfoot, K. McNagny, K. V. Ebbert, K. D. Patel and P. Kubes (2005). "Platelets express functional Toll-like receptor-4." Blood **106**(7): 2417-2423.
- Andrews, R. K. and M. C. Berndt (2013). "The GPIb-IX-V complex, in Platelets. Third Edition. Editor: Michelson. A.D." Academic Press **195-213**.
- Andrews, R. K., J. A. Lopez and M. C. Berndt (1997). "Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation." Int J Biochem Cell Biol **29**(1): 91-105.
- Andrews, R. K., A. D. Munday, C. A. Mitchell and M. C. Berndt (2001). "Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex." Blood **98**(3): 681-687.
- Arzamendi, D., F. Dandachli, J. F. Theoret, G. Ducrocq, M. Chan, W. Mourad, J. C. Gilbert, R. G. Schaub, J. F. Tanguay and Y. Merhi (2011). "An anti-von Willebrand factor aptamer reduces platelet adhesion among patients receiving aspirin and clopidogrel in an ex vivo shear-induced arterial thrombosis." Clin Appl Thromb Hemost **17**(6): E70-78.
- Aslam, R., E. R. Speck, M. Kim, A. R. Crow, K. W. Bang, F. P. Nestel, H. Ni, A. H. Lazarus, J. Freedman and J. W. Semple (2006). "Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo." Blood **107**(2): 637-641.
- Baglia, F. A., K. O. Badellino, C. Q. Li, J. A. Lopez and P. N. Walsh (2002). "Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin." J Biol Chem **277**(3): 1662-1668.

Baldassare, J. J., P. A. Henderson, D. Burns, C. Loomis and G. J. Fisher (1992). "Translocation of protein kinase C isozymes in thrombin-stimulated human platelets. Correlation with 1,2-diacylglycerol levels." J Biol Chem **267**(22): 15585-15590.

Balduini, C. L., A. Savoia and M. Seri (2013). "Inherited thrombocytopenias frequently diagnosed in adults." J Thromb Haemost **11**(6): 1006-1019.

Balendran, A., G. R. Hare, A. Kieloch, M. R. Williams and D. R. Alessi (2000). "Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms." FEBS Lett **484**(3): 217-223.

Barr, A. J., L. F. Brass and D. R. Manning (1997). "Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor.G protein coupling." J Biol Chem **272**(4): 2223-2229.

Becker, R. C., D. J. Moliterno, L. K. Jennings, K. S. Pieper, J. Pei, A. Niederman, K. M. Ziada, G. Berman, J. Strony, D. Joseph, K. W. Mahaffey, F. Van de Werf, E. Veltri, R. A. Harrington and T.-P. Investigators (2009). "Safety and tolerability of SCH 530348 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II study." Lancet **373**(9667): 919-928.

Becker, R. P. and P. P. De Bruyn (1976). "The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation." Am J Anat **145**(2): 183-205.

Beer, A. J. and M. Schwaiger (2008). "Imaging of integrin alphavbeta3 expression." Cancer Metastasis Rev **27**(4): 631-644.

Bellemain, A., J.-P. Collet and G. Montalescot (2008). "Nouveaux antiagrégants plaquettaires." Elsevier Masson SAS. Presse Med **37**: 1055–1068.

Bernard, J. and J. Soulier (1948). "Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire hémorragique congénitale." Presse Médicale **56**(65).

Berndt, M. C., Y. Shen, S. M. Dopheide, E. E. Gardiner and R. K. Andrews (2001). "The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex." Thromb Haemost **86**(1): 178-188.

Bhavanasi, D., S. Kim, L. E. Goldfinger and S. P. Kunapuli (2011). "Protein kinase Cdelta mediates the activation of protein kinase D2 in platelets." Biochem Pharmacol **82**(7): 720-727.

Bhavanasi, D., J. C. Kostyak, J. Swindle, L. E. Kilpatrick and S. P. Kunapuli (2015). "CGX1037 is a novel PKC isoform delta selective inhibitor in platelets." Platelets **26**(1): 2-9.

Biondi, R. M. (2004). "Phosphoinositide-dependent protein kinase 1, a sensor of protein conformation." Trends Biochem Sci **29**(3): 136-142.

Bizzozero, G. (1869). "Sul midollo delle ossa. ." Il Morgagni.

Blake, R. A., P. Garcia-Paramio, P. J. Parker and S. A. Courtneidge (1999). "Src promotes PKCdelta degradation." Cell Growth Differ **10**(4): 231-241.

Blake, R. A., G. L. Schieven and S. P. Watson (1994). "Collagen stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 but not phospholipase C-gamma 1 in human platelets." FEBS Lett **353**(2): 212-216.

Bledzka, K., S. S. Smyth and E. F. Plow (2013). "Integrin alphaIIb beta3: From Discovery to Efficacious Therapeutic Target." Circ Res **112**(8): 1189-1200.

Bonnefoy-Berard, N., Y. C. Liu, M. von Willebrand, A. Sung, C. Elly, T. Mustelin, H. Yoshida, K. Ishizaka and A. Altman (1995). "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10142-10146.

Borissoff, J. I., H. M. Spronk and H. ten Cate (2011). "The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis." N Engl J Med **364**(18): 1746-1760.

Bouvard, D., C. Brakebusch, E. Gustafsson, A. Aszodi, T. Bengtsson, A. Berna and R. Fassler (2001). "Functional consequences of integrin gene mutations in mice." Circ Res **89**(3): 211-223.

Bradford, H. N., R. A. Pixley and R. W. Colman (2000). "Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation." J Biol Chem **275**(30): 22756-22763.

Brass, L. F., D. R. Manning, K. Cichowski and C. S. Abrams (1997). "Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond." Thromb Haemost **78**(1): 581-589.

Brass, L. F., C. C. Shaller and E. J. Belmonte (1987). "Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin." J Clin Invest **79**(4): 1269-1275.

Bridson, S. J. and S. P. Watson (1999). "Evidence for the involvement of p59fyn and p53/56lyn in collagen receptor signalling in human platelets." Biochem J **338 (Pt 1)**: 203-209.

Brill, A., T. A. Fuchs, A. K. Chauhan, J. J. Yang, S. F. De Meyer, M. Kollnberger, T. W. Wakefield, B. Lammle, S. Massberg and D. D. Wagner (2011). "von Willebrand factor-mediated

platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models." Blood **117**(4): 1400-1407.

Buensuceso, C. S., A. Obergfell, A. Soriani, K. Eto, W. B. Kiosses, E. G. Arias-Salgado, T. Kawakami and S. J. Shattil (2005). "Regulation of outside-in signaling in platelets by integrin-associated protein kinase C beta." J Biol Chem **280**(1): 644-653.

Bynagari, Y. S., B. Nagy, Jr., F. Tuluc, K. Bhavaraju, S. Kim, K. V. Vijayan and S. P. Kunapuli (2009). "Mechanism of activation and functional role of protein kinase Ceta in human platelets." J Biol Chem **284**(20): 13413-13421.

Calderwood, D. A., S. J. Shattil and M. H. Ginsberg (2000). "Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling." J Biol Chem **275**(30): 22607-22610.

Calverley, D. C., T. J. Kavanagh and G. J. Roth (1998). "Human signaling protein 14-3-3zeta interacts with platelet glycoprotein Ib subunits Ibalpha and Ibbeta." Blood **91**(4): 1295-1303.

Canobbio, I., C. Balduini and M. Torti (2004). "Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex." Cell Signal **16**(12): 1329-1344.

Canobbio, I., S. Reineri, F. Sinigaglia, C. Balduini and M. Torti (2004). "A role for p38 MAP kinase in platelet activation by von Willebrand factor." Thromb Haemost **91**(1): 102-110.

Celikel, R., R. A. McClintock, J. R. Roberts, G. L. Mendolicchio, J. Ware, K. I. Varughese and Z. M. Ruggeri (2003). "Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha." Science **301**(5630): 218-221.

Chari, R., T. Getz, B. Nagy, Jr., K. Bhavaraju, Y. Mao, Y. S. Bynagari, S. Murugappan, K. Nakayama and S. P. Kunapuli (2009). "Protein kinase C[delta] differentially regulates platelet functional responses." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(5): 699-705.

Chari, R., S. Kim, S. Murugappan, A. Sanjay, J. L. Daniel and S. P. Kunapuli (2009). "Lyn, PKC-delta, SHIP-1 interactions regulate GPVI-mediated platelet-dense granule secretion." Blood **114**(14): 3056-3063.

Chen, L., H. Hahn, G. Wu, C. H. Chen, T. Liron, D. Schechtman, G. Cavallaro, L. Banci, Y. Guo, R. Bolli, G. W. Dorn, 2nd and D. Mochly-Rosen (2001). "Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11114-11119.

Chung, S. H., J. Polgar and G. L. Reed (2000). "Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets." J Biol Chem **275**(33): 25286-25291.

Clemetson, K. J. (1995). "Platelet activation: signal transduction via membrane receptors." Thromb Haemost **74**(1): 111-116.

Clemetson, K. J. and J. M. Clemetson (1994). "Molecular abnormalities in Glanzmann's thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome, and platelet-type von Willebrand's disease." Curr Opin Hematol **1**(5): 388-393.

Clemetson, K. J. and J. M. Clemetson (2001). "Platelet collagen receptors." Thromb Haemost **86**(1): 189-197.

Cognasse, F., H. Hamzeh, P. Chavarin, S. Acquart, C. Genin and O. Garraud (2005). "Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets." Immunol Cell Biol **83**(2): 196-198.

Cohen, S., A. Braiman, G. Shubinsky, A. Ohayon, A. Altman and N. Isakov (2009). "PKCtheta is required for hemostasis and positive regulation of thrombin-induced platelet aggregation and alpha-granule secretion." Biochem Biophys Res Commun **385**(1): 22-27.

Coleman, R. A., S. P. Grix, S. A. Head, J. B. Louttit, A. Mallett and R. L. Sheldrick (1994). "A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein." Prostaglandins **47**(2): 151-168.

Coughlin, S. R. (2000). "Thrombin signalling and protease-activated receptors." Nature **407**(6801): 258-264.

Coughlin, S. R. (2005). "Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology." J Thromb Haemost **3**(8): 1800-1814.

Coughlin, S. R., T. K. Vu, D. T. Hung and V. I. Wheaton (1992). "Characterization of a functional thrombin receptor. Issues and opportunities." J Clin Invest **89**(2): 351-355.

Crabos, M., R. Imber, T. Woodtli, D. Fabbro and P. Erne (1991). "Different translocation of three distinct PKC isoforms with tumor-promoting phorbol ester in human platelets." Biochem Biophys Res Commun **178**(3): 878-883.

Cramer, E. M., D. Meyer, R. le Menn and J. Breton-Gorius (1985). "Eccentric localization of von Willebrand factor in an internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-Palade bodies." Blood **66**(3): 710-713.

Cranmer, S. L., I. Pikovski, P. Mangin, P. E. Thompson, T. Domagala, M. Frazzetto, H. H. Salem and S. P. Jackson (2005). "Identification of a unique filamin A binding region within the cytoplasmic domain of glycoprotein Ibalpha." Biochem J **387**(Pt 3): 849-858.

Cranmer, S. L., P. Ulsemer, B. M. Cooke, H. H. Salem, C. de la Salle, F. Lanza and S. P. Jackson (1999). "Glycoprotein (GP) Ib-IX-transfected cells roll on a von Willebrand factor matrix under

flow. Importance of the GPIb/actin-binding protein (ABP-280) interaction in maintaining adhesion under high shear." J Biol Chem **274**(10): 6097-6106.

Crosby, D. and A. W. Poole (2002). "Interaction of Bruton's tyrosine kinase and protein kinase C theta in platelets. Cross-talk between tyrosine and serine/threonine kinases." J Biol Chem **277**(12): 9958-9965.

Crosby, D. and A. W. Poole (2003). "Physical and functional interaction between protein kinase C delta and Fyn tyrosine kinase in human platelets." J Biol Chem **278**(27): 24533-24541.

Cunningham, J. G., S. C. Meyer and J. E. Fox (1996). "The cytoplasmic domain of the alpha-subunit of glycoprotein (GP) Ib mediates attachment of the entire GP Ib-IX complex to the cytoskeleton and regulates von Willebrand factor-induced changes in cell morphology." J Biol Chem **271**(19): 11581-11587.

Dai, K., R. Bodnar, M. C. Berndt and X. Du (2005). "A critical role for 14-3-3zeta protein in regulating the VWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications." Blood **106**(6): 1975-1981.

Dangelmaier, C., J. Jin, J. B. Smith and S. P. Kunapuli (2001). "Potentiation of thromboxane A₂-induced platelet secretion by G_i signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway." Thromb Haemost **85**(2): 341-348.

Dangelmaier, C., B. K. Manne, E. Liverani, J. Jin, P. Bray and S. P. Kunapuli (2014). "PKD1 selectively phosphorylates Thr(308) on Akt and contributes to human platelet functional responses." Thromb Haemost **111**(3): 508-517.

De Candia, E. (2012). "Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history." Thromb Res **129**(3): 250-256.

De Candia, E., S. W. Hall, S. Rutella, R. Landolfi, R. K. Andrews and R. De Cristofaro (2001). "Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets." J Biol Chem **276**(7): 4692-4698.

De Cristofaro, R., E. De Candia, R. Landolfi, S. Rutella and S. W. Hall (2001). "Structural and functional mapping of the thrombin domain involved in the binding to the platelet glycoprotein Ib." Biochemistry **40**(44): 13268-13273.

De Cristofaro, R., E. De Candia, S. Rutella and J. I. Weitz (2000). "The Asp(272)-Glu(282) region of platelet glycoprotein Ibalpha interacts with the heparin-binding site of alpha-thrombin

and protects the enzyme from the heparin-catalyzed inhibition by antithrombin III." J Biol Chem **275**(6): 3887-3895.

De Marco, L., M. Mazzucato, A. Masotti, J. W. Fenton, 2nd and Z. M. Ruggeri (1991). "Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin." J Biol Chem **266**(35): 23776-23783.

De Marco, L., M. Mazzucato, A. Masotti and Z. M. Ruggeri (1994). "Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein Ib alpha." J Biol Chem **269**(9): 6478-6484.

Diener, J. L., H. A. Daniel Lagasse, D. Duerschmied, Y. Merhi, J. F. Tanguay, R. Hutabarat, J. Gilbert, D. D. Wagner and R. Schaub (2009). "Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779." J Thromb Haemost **7**(7): 1155-1162.

Djellas, Y., J. M. Manganello, K. Antonakis and G. C. Le Breton (1999). "Identification of Galpha13 as one of the G-proteins that couple to human platelet thromboxane A2 receptors." J Biol Chem **274**(20): 14325-14330.

Dopheide, S. M., M. J. Maxwell and S. P. Jackson (2002). "Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor." Blood **99**(1): 159-167.

Dormann, D., K. J. Clemetson and B. E. Kehrel (2000). "The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity." Blood **96**(7): 2469-2478.

Dorsam, R. T. and S. P. Kunapuli (2004). "Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation." J Clin Invest **113**(3): 340-345.

Du, X., J. E. Fox and S. Pei (1996). "Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib alpha." J Biol Chem **271**(13): 7362-7367.

Dubois, C., L. Panicot-Dubois, G. Merrill-Skoloff, B. Furie and B. C. Furie (2006). "Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo." Blood **107**(10): 3902-3906.

Dubois, C., B. Steiner, N. Kieffer and S. C. Reigner (2003). "Thrombin binding to GPIbalpha induces platelet aggregation and fibrin clot retraction supported by resting alphaIIb beta3 interaction with polymerized fibrin." Thromb Haemost **89**(5): 853-865.

Dubois, C., B. Steiner and S. C. Meyer Reigner (2004). "Contribution of PAR-1, PAR-4 and GPIIb/IIIa in intracellular signaling leading to the cleavage of the beta3 cytoplasmic domain during thrombin-induced platelet aggregation." Thromb Haemost **91**(4): 733-742.

Dumas, J. J., R. Kumar, J. Seehra, W. S. Somers and L. Mosyak (2003). "Crystal structure of the GPIIb/IIIa-thrombin complex essential for platelet aggregation." Science **301**(5630): 222-226.

Dyson, J. M., A. D. Munday, A. M. Kong, R. D. Huysmans, M. Matzaris, M. J. Layton, H. H. Nandurkar, M. C. Berndt and C. A. Mitchell (2003). "SHIP-2 forms a tetrameric complex with filamin, actin, and GPIIb-IX-V: localization of SHIP-2 to the activated platelet actin cytoskeleton." Blood **102**(3): 940-948.

Fabre, J. E., M. Nguyen, A. Latour, J. A. Keifer, L. P. Audoly, T. M. Coffman and B. H. Koller (1999). "Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice." Nat Med **5**(10): 1199-1202.

Farid, N. A., C. D. Payne, D. S. Small, K. J. Winters, C. S. Ernest, 2nd, J. T. Brandt, C. Darstein, J. A. Jakubowski and D. E. Salazar (2007). "Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently." Clin Pharmacol Ther **81**(5): 735-741.

Feigin, V. L., C. M. Lawes, D. A. Bennett and C. S. Anderson (2003). "Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century." Lancet Neurol **2**(1): 43-53.

Feng, S., J. C. Resendiz, X. Lu and M. H. Kroll (2003). "Filamin A binding to the cytoplasmic tail of glycoprotein IIb/IIIa regulates von Willebrand factor-induced platelet activation." Blood **102**(6): 2122-2129.

Fenton, J. W., 2nd (1995). "Thrombin functions and antithrombotic intervention." Thromb Haemost **74**(1): 493-498.

Francesconi, M. A., R. Deana, A. Girolami, E. Pontara and A. Casonato (1993). "Platelet aggregation induced by plasma from type IIB von Willebrand's disease patients is associated with an increase in cytosolic Ca²⁺ concentration." Thromb Haemost **70**(4): 697-701.

Francischetti, I. M., F. A. Ghazaleh, R. A. Reis, C. R. Carlini and J. A. Guimaraes (1998). "Convulxin induces platelet activation by a tyrosine-kinase-dependent pathway and stimulates tyrosine phosphorylation of platelet proteins, including PLC gamma 2, independently of integrin alpha IIb beta 3." Arch Biochem Biophys **353**(2): 239-250.

Freeman, A. K. and D. K. Morrison (2011). "14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression." Semin Cell Dev Biol **22**(7): 681-687.

Fuentes, Q. E., Q. F. Fuentes, V. Andres, O. M. Pello, J. Font de Mora and G. I. Palomo (2013). "Role of platelets as mediators that link inflammation and thrombosis in atherosclerosis." Platelets **24**(4): 255-262.

Furie, B. and B. C. Furie (2008). "Mechanisms of thrombus formation." N Engl J Med **359**(9): 938-949.

Furman, M. I., L. Liu, S. E. Benoit, R. C. Becker, M. R. Barnard and A. D. Michelson (1998). "The cleaved peptide of the thrombin receptor is a strong platelet agonist." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3082-3087.

Gachet, C. (2005). "The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs." Pharmacol Ther **108**(2): 180-192.

Gardiner, E. E., J. F. Arthur, M. C. Berndt and R. K. Andrews (2005). "Role of calmodulin in platelet receptor function." Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents **3**(4): 283-287.

Gawaz, M., K. Brand, T. Dickfeld, G. Pogatsa-Murray, S. Page, C. Bogner, W. Koch, A. Schomig and F. Neumann (2000). "Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis." Atherosclerosis **148**(1): 75-85.

George, J. N. (2000). "Platelets." Lancet **355**(9214): 1531-1539.

Geraldes, P., J. Hiraoka-Yamamoto, M. Matsumoto, A. Clermont, M. Leitges, A. Marette, L. P. Aiello, T. S. Kern and G. L. King (2009). "Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy." Nat Med **15**(11): 1298-1306.

Gobbi, G., P. Mirandola, C. Carubbi, E. Masselli, S. M. Sykes, F. Ferraro, A. Nouvenne, J. N. Thon, J. E. Italiano, Jr. and M. Vitale (2013). "Proplatelet generation in the mouse requires PKCepsilon-dependent RhoA inhibition." Blood **122**(7): 1305-1311.

Golebiewska, E. M. and A. W. Poole (2015). "Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond." Blood Rev **29**(3): 153-162.

Grabarek, J., M. Raychowdhury, K. Ravid, K. C. Kent, P. J. Newman and J. A. Ware (1992). "Identification and functional characterization of protein kinase C isozymes in platelets and HEL cells." J Biol Chem **267**(14): 10011-10017.

Gralnick, H. R., S. Williams, L. P. McKeown, K. Hansmann, J. W. Fenton, 2nd and H. Krutzsch (1994). "High-affinity alpha-thrombin binding to platelet glycoprotein Ib alpha: identification of two binding domains." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6334-6338.

Gratacap, M. P., J. P. Herault, C. Viala, A. Ragab, P. Savi, J. M. Herbert, H. Chap, M. Plantavid and B. Payrastre (2000). "FcgammaRIIA requires a Gi-dependent pathway for an efficient stimulation of phosphoinositide 3-kinase, calcium mobilization, and platelet aggregation." Blood **96**(10): 3439-3446.

Gu, M., X. Xi, G. D. Englund, M. C. Berndt and X. Du (1999). "Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3) using a reconstituted mammalian cell expression model." J Cell Biol **147**(5): 1085-1096.

Guerrero, J. A., G. Shafirstein, S. Russell, K. I. Varughese, T. Kanaji, J. Liu, T. K. Gartner, W. Baumler, G. E. Jarvis and J. Ware (2008). "In vivo relevance for platelet glycoprotein Ibalpha residue Tyr276 in thrombus formation." J Thromb Haemost **6**(4): 684-691.

Guinebault, C., B. Payrastre, G. Mauco, M. Breton, M. Plantavid and H. Chap (1994). "Rapid and transient translocation of PLC-gamma 1 to the cytoskeleton of thrombin-stimulated platelets. Evidence for a role of tyrosine kinases." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **40**(5): 687-693.

Hachem, A., D. Yacoub, Y. Zaid, W. Mourad and Y. Merhi (2012). "Involvement of nuclear factor kappaB in platelet CD40 signaling." Biochem Biophys Res Commun **425**(1): 58-63.

Hall, K. J., M. T. Harper, K. Gilio, J. M. Cosemans, J. W. Heemskerk and A. W. Poole (2008). "Genetic analysis of the role of protein kinase Ctheta in platelet function and thrombus formation." PLoS One **3**(9): e3277.

Harper, M. T., M. J. Mason, S. O. Sage and A. G. Harper (2010). "Phorbol ester-evoked Ca²⁺ signaling in human platelets is via autocrine activation of P(2X1) receptors, not a novel non-capacitative Ca²⁺ entry." J Thromb Haemost **8**(7): 1604-1613.

Harper, M. T. and A. W. Poole (2010). "Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation." J Thromb Haemost **8**(3): 454-462.

Hartwig, J. H. (2006). "The platelet: form and function." Semin Hematol **43**(1 Suppl 1): S94-100.

Hartwig, J. H. and J. E. Italiano, Jr. (2006). "Cytoskeletal mechanisms for platelet production." Blood Cells Mol Dis **36**(2): 99-103.

Hassan, M. I., A. Saxena and F. Ahmad (2012). "Structure and function of von Willebrand factor." Blood Coagul Fibrinolysis **23**(1): 11-22.

Hennan, J. K., R. E. Swillo, G. A. Morgan, C. E. Leik, J. M. Brooks, G. D. Shaw, R. G. Schaub, D. L. Crandall and G. P. Vlasuk (2006). "Pharmacologic inhibition of platelet vWF-GPIb alpha interaction prevents coronary artery thrombosis." Thromb Haemost **95**(3): 469-475.

Hers, I., J. Donath, G. van Willigen and J. W. Akkerman (1998). "Differential involvement of tyrosine and serine/threonine kinases in platelet integrin alphaIIb beta3 exposure." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(3): 404-414.

Hirata, M., Y. Hayashi, F. Ushikubi, Y. Yokota, R. Kageyama, S. Nakanishi and S. Narumiya (1991). "Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor." Nature **349**(6310): 617-620.

Hollopeter, G., H. M. Jantzen, D. Vincent, G. Li, L. England, V. Ramakrishnan, R. B. Yang, P. Nurden, A. Nurden, D. Julius and P. B. Conley (2001). "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs." Nature **409**(6817): 202-207.

Holmsen, H. and H. J. Weiss (1979). "Secretable storage pools in platelets." Annu Rev Med **30**: 119-134.

Humphrey, J. H. and C. C. Toh (1954). "Absorption of serotonin (5-hydroxytryptamine) and histamine by dog platelets." J Physiol **124**(2): 300-304.

Huo, Y. and K. F. Ley (2004). "Role of platelets in the development of atherosclerosis." Trends Cardiovasc Med **14**(1): 18-22.

Huo, Y., A. Schober, S. B. Forlow, D. F. Smith, M. C. Hyman, S. Jung, D. R. Littman, C. Weber and K. Ley (2003). "Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E." Nat Med **9**(1): 61-67.

Husted, S. and J. J. van Giezen (2009). "Ticagrelor: the first reversibly binding oral P2Y12 receptor antagonist." Cardiovasc Ther **27**(4): 259-274.

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.

Idris, I., S. Gray and R. Donnelly (2001). "Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes." Diabetologia **44**(6): 659-673.

Ihizumi, T., A. Hattori, M. Sanada and M. Muto (1977). "Megakaryocyte and platelet formation: a scanning electron microscope study in mouse spleen." Arch Histol Jpn **40**(4): 305-320.

Inagaki, K., L. Chen, F. Ikeno, F. H. Lee, K. Imahashi, D. M. Bouley, M. Rezaee, P. G. Yock, E. Murphy and D. Mochly-Rosen (2003). "Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo." Circulation **108**(19): 2304-2307.

Inoue, O., K. Suzuki-Inoue, W. L. Dean, J. Frampton and S. P. Watson (2003). "Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2." J Cell Biol **160**(5): 769-780.

Jackson, S. P. (2007). "The growing complexity of platelet aggregation." Blood **109**(12): 5087-5095.

Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker and C. R. Minick (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." J Clin Invest **52**(11): 2745-2756.

Jakubowski, J. A., K. J. Winters, H. Naganuma and L. Wallentin (2007). "Prasugrel: a novel thienopyridine antiplatelet agent. A review of preclinical and clinical studies and the mechanistic basis for its distinct antiplatelet profile." Cardiovasc Drug Rev **25**(4): 357-374.

Jamieson, G. A. (1997). "Pathophysiology of platelet thrombin receptors." Thromb Haemost **78**(1): 242-246.

Jandrot-Perrus, M., M. C. Bouton, F. Lanza and M. C. Guillin (1996). "Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib." Semin Thromb Hemost **22**(2): 151-156.

Jantzen, H. M., L. Gousset, V. Bhaskar, D. Vincent, A. Tai, E. E. Reynolds and P. B. Conley (1999). "Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation." Thromb Haemost **81**(1): 111-117.

Jin, J., J. L. Daniel and S. P. Kunapuli (1998). "Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets." J Biol Chem **273**(4): 2030-2034.

Jung, S. M. and M. Moroi (2000). "Activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1): its mechanism and participation in the physiological functions of platelets." Trends Cardiovasc Med **10**(7): 285-292.

Jurk, K., K. J. Clemetson, P. G. de Groot, M. F. Brodde, M. Steiner, N. Savion, D. Varon, J. J. Sixma, H. Van Aken and B. E. Kehrel (2003). "Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor." FASEB J **17**(11): 1490-1492.

Kahn, M. L., M. Nakanishi-Matsui, M. J. Shapiro, H. Ishihara and S. R. Coughlin (1999). "Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin." J Clin Invest **103**(6): 879-887.

Kahn, M. L., Y. W. Zheng, W. Huang, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff, R. V. Farese, Jr., C. Tam and S. R. Coughlin (1998). "A dual thrombin receptor system for platelet activation." Nature **394**(6694): 690-694.

Kaibuchi, K., Y. Takai, M. Sawamura, M. Hoshijima, T. Fujikura and Y. Nishizuka (1983). "Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation." J Biol Chem **258**(11): 6701-6704.

Kenney, D. M. and R. W. Linck (1985). "The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band." J Cell Sci **78**: 1-22.

Kheifets, V. and D. Mochly-Rosen (2007). "Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function." Pharmacol Res **55**(6): 467-476.

Klages, B., U. Brandt, M. I. Simon, G. Schultz and S. Offermanns (1999). "Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets." J Cell Biol **144**(4): 745-754.

Knezevic, I., C. Borg and G. C. Le Breton (1993). "Identification of Gq as one of the G-proteins which copurify with human platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors." J Biol Chem **268**(34): 26011-26017.

Konopatskaya, O., K. Gilio, M. T. Harper, Y. Zhao, J. M. Cosemans, Z. A. Karim, S. W. Whiteheart, J. D. Molkenin, P. Verkade, S. P. Watson, J. W. Heemskerk and A. W. Poole (2009). "PKC α regulates platelet granule secretion and thrombus formation in mice." J Clin Invest **119**(2): 399-407.

Konopatskaya, O., S. A. Matthews, M. T. Harper, K. Gilio, J. M. Cosemans, C. M. Williams, M. N. Navarro, D. A. Carter, J. W. Heemskerk, M. Leitges, D. Cantrell and A. W. Poole (2011). "Protein kinase C mediates platelet secretion and thrombus formation through protein kinase D2." Blood **118**(2): 416-424.

Kostyak, J. C., D. Bhavanasi, E. Liverani, S. E. McKenzie and S. P. Kunapuli (2014). "Protein kinase C delta deficiency enhances megakaryopoiesis and recovery from thrombocytopenia." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(12): 2579-2585.

Kostyak, J. C. and S. P. Kunapuli (2014). "PKC θ is dispensable for megakaryopoiesis." Platelets: 1-2.

Krasel, C., S. Dammeier, R. Winstel, J. Brockmann, H. Mischak and M. J. Lohse (2001). "Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin." J Biol Chem **276**(3): 1911-1915.

Kroll, M. H., T. S. Harris, J. L. Moake, R. I. Handin and A. I. Schafer (1991). "von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation." J Clin Invest **88**(5): 1568-1573.

Kroll, M. H., J. D. Hellums, Z. Guo, W. Durante, K. Razdan, J. K. Hrbolich and A. I. Schafer (1993). "Protein kinase C is activated in platelets subjected to pathological shear stress." J Biol Chem **268**(5): 3520-3524.

Kunishima, S., T. Imai, M. Hamaguchi and H. Saito (2006). "Novel heterozygous missense mutation in the second leucine rich repeat of GPIb α affects GPIb/IX/V expression and results in macrothrombocytopenia in a patient initially misdiagnosed with idiopathic thrombocytopenic purpura." Eur J Haematol **76**(4): 348-355.

Lane, D. A., H. Philippou and J. A. Huntington (2005). "Directing thrombin." Blood **106**(8): 2605-2612.

Lankhof, H., M. van Hoeij, M. E. Schiphorst, M. Bracke, Y. P. Wu, M. J. Ijsseldijk, T. Vink, P. G. de Groot and J. J. Sixma (1996). "A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III." Thromb Haemost **75**(6): 950-958.

Lechtenberg, B. C., S. M. Freund and J. A. Huntington (2014). "GpIb α interacts exclusively with exosite II of thrombin." J Mol Biol **426**(4): 881-893.

Leger, A. J., L. Covic and A. Kuliopulos (2006). "Protease-activated receptors in cardiovascular diseases." Circulation **114**(10): 1070-1077.

Lenz, T. L. and D. E. Hilleman (2000). "Aggrenox: a fixed-dose combination of aspirin and dipyridamole." Ann Pharmacother **34**(11): 1283-1290.

Leon, C., C. Vial, C. Gachet, P. Ohlmann, B. Hechler, J. P. Cazenave, A. Lecchi and M. Cattaneo (1999). "The P2Y₁ receptor is normal in a patient presenting a severe deficiency of ADP-induced platelet aggregation." Thromb Haemost **81**(5): 775-781.

Leslie, M. (2010). "Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets." Science **328**(5978): 562-564.

Li, Z., M. K. Delaney, K. A. O'Brien and X. Du (2010). "Signaling during platelet adhesion and activation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(12): 2341-2349.

Lindemann, S., B. Kramer, P. Seizer and M. Gawaz (2007). "Platelets, inflammation and atherosclerosis." J Thromb Haemost **5 Suppl 1**: 203-211.

Liu, L., J. Freedman, A. Hornstein, J. W. Fenton, 2nd, Y. Song and F. A. Ofofu (1997). "Binding of thrombin to the G-protein-linked receptor, and not to glycoprotein Ib, precedes thrombin-mediated platelet activation." J Biol Chem **272**(3): 1997-2004.

Liu, W. S. and C. A. Heckman (1998). "The sevenfold way of PKC regulation." Cell Signal **10**(8): 529-542.

Lopez, J. A., R. K. Andrews, V. Afshar-Kharghan and M. C. Berndt (1998). "Bernard-Soulier syndrome." Blood **91**(12): 4397-4418.

Ma, P., A. Cierniewska, R. Signarvic, M. Cieslak, H. Kong, A. J. Sinnamon, R. R. Neubig, D. K. Newman, T. J. Stalker and L. F. Brass (2012). "A newly identified complex of spinophilin and the tyrosine phosphatase, SHP-1, modulates platelet activation by regulating G protein-dependent signaling." Blood **119**(8): 1935-1945.

Macfarlane, R. G. (1964). "An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier." Nature **202**: 498-499.

Mammadova-Bach, E., V. Ollivier, S. Loyau, M. Schaff, B. Dumont, R. Favier, G. Freyburger, V. Latger-Cannard, B. Nieswandt, C. Gachet, P. H. Mangin and M. Jandrot-Perrus (2015). "Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation." Blood **126**(5): 683-691.

Mangin, P., T. David, V. Lavaud, S. L. Cranmer, I. Pikovski, S. P. Jackson, M. C. Berndt, J. P. Cazenave, C. Gachet and F. Lanza (2004). "Identification of a novel 14-3-3zeta binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ibalpha." Blood **104**(2): 420-427.

Mangin, P. H., N. Receveur, V. Wurtz, T. David, C. Gachet and F. Lanza (2009). "Identification of five novel 14-3-3 isoforms interacting with the GPIb-IX complex in platelets." J Thromb Haemost **7**(9): 1550-1555.

Manka, D., S. B. Forlow, J. M. Sanders, D. Hurwitz, D. K. Bennett, S. A. Green, K. Ley and I. J. Sarembock (2004). "Critical role of platelet P-selectin in the response to arterial injury in apolipoprotein-E-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(6): 1124-1129.

Maxwell, M. J., Y. Yuan, K. E. Anderson, M. L. Hibbs, H. H. Salem and S. P. Jackson (2004). "SHIP1 and Lyn Kinase Negatively Regulate Integrin alpha IIb beta 3 signaling in platelets." J Biol Chem **279**(31): 32196-32204.

May, A. E., P. Seizer and M. Gawaz (2008). "Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): s5-10.

Mazurov, A. V., D. V. Vinogradov, T. N. Vlasik, V. S. Repin, W. J. Booth and M. C. Berndt (1991). "Characterization of an antiglycoprotein Ib monoclonal antibody that specifically inhibits platelet-thrombin interaction." Thromb Res **62**(6): 673-684.

Mazzucato, M., L. D. Marco, A. Masotti, P. Pradella, W. F. Bahou and Z. M. Ruggeri (1998). "Characterization of the initial alpha-thrombin interaction with glycoprotein Ib alpha in relation to platelet activation." J Biol Chem **273**(4): 1880-1887.

Meyer, S. C., S. Zuerbig, C. C. Cunningham, J. H. Hartwig, T. Bissell, K. Gardner and J. E. Fox (1997). "Identification of the region in actin-binding protein that binds to the cytoplasmic domain of glycoprotein IBalpha." J Biol Chem **272**(5): 2914-2919.

Michelson, A. D. (2011). "Advances in antiplatelet therapy." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2011**: 62-69.

Miller, J. L., V. A. Lyle and D. Cunningham (1992). "Mutation of leucine-57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib alpha leucine tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease." Blood **79**(2): 439-446.

Mirza, H., V. A. Schmidt, C. K. Derian, J. Jesty and W. F. Bahou (1997). "Mitogenic responses mediated through the proteinase-activated receptor-2 are induced by expressed forms of mast cell alpha- or beta-tryptases." Blood **90**(10): 3914-3922.

Miura, Y., T. Takahashi, S. M. Jung and M. Moroi (2002). "Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen." J Biol Chem **277**(48): 46197-46204.

Miyamoto, A., K. Nakayama, H. Imaki, S. Hirose, Y. Jiang, M. Abe, T. Tsukiyama, H. Nagahama, S. Ohno, S. Hatakeyama and K. I. Nakayama (2002). "Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta." Nature **416**(6883): 865-869.

Mochly-Rosen, D. and A. S. Gordon (1998). "Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity." FASEB J **12**(1): 35-42.

Mochly-Rosen, D., H. Khaner and J. Lopez (1991). "Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3997-4000.

Mochly-Rosen, D., H. Khaner, J. Lopez and B. L. Smith (1991). "Intracellular receptors for activated protein kinase C. Identification of a binding site for the enzyme." J Biol Chem **266**(23): 14866-14868.

Moiz, B. and A. Rashid (2013). "BSS misdiagnosed as ITP." Blood **122**(10): 1693.

Moog, S., P. Mangin, N. Lenain, C. Strassel, C. Ravanat, S. Schuhler, M. Freund, M. Santer, M. Kahn, B. Nieswandt, C. Gachet, J. P. Cazenave and F. Lanza (2001). "Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation." Blood **98**(4): 1038-1046.

Morrison, D. (1994). "14-3-3: modulators of signaling proteins?" Science **266**(5182): 56-57.

Munday, A. D., M. C. Berndt and C. A. Mitchell (2000). "Phosphoinositide 3-kinase forms a complex with platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and 14-3-3zeta." Blood **96**(2): 577-584.

Murugappan, S., H. Shankar, S. Bhamidipati, R. T. Dorsam, J. Jin and S. P. Kunapuli (2005). "Molecular mechanism and functional implications of thrombin-mediated tyrosine phosphorylation of PKCdelta in platelets." Blood **106**(2): 550-557.

Murugappan, S., F. Tuluc, R. T. Dorsam, H. Shankar and S. P. Kunapuli (2004). "Differential role of protein kinase C delta isoform in agonist-induced dense granule secretion in human platelets." J Biol Chem **279**(4): 2360-2367.

Mustafa, M. H., L. A. Mispireta and L. E. Pierce (1989). "Occult pulmonary embolism presenting with thrombocytopenia and elevated fibrin split products." Am J Med **86**(4): 490-491.

Nagy, B., Jr., K. Bhavaraju, T. Getz, Y. S. Bynagari, S. Kim and S. P. Kunapuli (2009). "Impaired activation of platelets lacking protein kinase C-theta isoform." Blood **113**(11): 2557-2567.

Nakanishi-Matsui, M., Y. W. Zheng, D. J. Sulciner, E. J. Weiss, M. J. Ludeman and S. R. Coughlin (2000). "PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin." Nature **404**(6778): 609-613.

Nalefski, E. A. and A. C. Newton (2001). "Membrane binding kinetics of protein kinase C betaII mediated by the C2 domain." Biochemistry **40**(44): 13216-13229.

Neuhaus, M. K., J. Steffel and H.-J. Beer (2008). "Inhibiteurs de l'adhésivité plaquettaire." Forum Med Suisse **8**: 50-57.

Newton, A. C. (2001). "Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions." Chem Rev **101**(8): 2353-2364.

Nieswandt, B., B. Aktas, A. Moers and U. J. Sachs (2005). "Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models." J Thromb Haemost **3**(8): 1725-1736.

Nieswandt, B. and S. P. Watson (2003). "Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?" Blood **102**(2): 449-461.

Noris, P., S. Perrotta, R. Bottega, A. Pecci, F. Melazzini, E. Civaschi, S. Russo, S. Magrin, G. Loffredo, V. Di Salvo, G. Russo, M. Casale, D. De Rocco, C. Grignani, M. Cattaneo, C. Baronci, A. Dragani, V. Albano, M. Jankovic, S. Scianguetta, A. Savoia and C. L. Balduini (2012). "Clinical and laboratory features of 103 patients from 42 Italian families with inherited thrombocytopenia derived from the monoallelic Ala156Val mutation of GPIIb/IIIa (Bolzano mutation)." Haematologica **97**(1): 82-88.

Nystedt, S., K. Emilsson, A. K. Larsson, B. Strombeck and J. Sundelin (1995). "Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2." Eur J Biochem **232**(1): 84-89.

Offermanns, S., K. L. Laugwitz, K. Spicher and G. Schultz (1994). "G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 504-508.

Offermanns, S., C. F. Toombs, Y. H. Hu and M. I. Simon (1997). "Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice." Nature **389**(6647): 183-186.

Ofosu, F. A. (2003). "Protease activated receptors 1 and 4 govern the responses of human platelets to thrombin." Transfus Apher Sci **28**(3): 265-268.

Okada, Y., B. R. Copeland, R. Fitridge, J. A. Koziol and G. J. del Zoppo (1994). "Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion." Stroke **25**(9): 1847-1853; discussion 1853-1844.

Ozat, M., T. Gungor, S. Barun, B. Demirogullari, L. K. Sokmensuer, O. Gulbahar, D. GURSOY and S. Muftuoglu (2009). "The effects of iloprost, a prostacyclin analogue, in experimental ischaemia/reperfusion injury in rat ovaries." Exp Toxicol Pathol **61**(5): 519-527.

Parise, L. V. (1999). "Integrin alpha(IIb)beta(3) signaling in platelet adhesion and aggregation." Curr Opin Cell Biol **11**(5): 597-601.

Patrono, C., B. Collier, G. A. FitzGerald, J. Hirsh and G. Roth (2004). "Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy." Chest **126**(3 Suppl): 234S-264S.

Pears, C. J., K. Thornber, J. M. Auger, C. E. Hughes, B. Grygielska, M. B. Prottly, A. C. Pearce and S. P. Watson (2008). "Differential roles of the PKC novel isoforms, PKCdelta and PKCepsilon, in mouse and human platelets." PLoS One **3**(11): e3793.

Penela, P., C. Murga, C. Ribas, V. Lafarga and F. Mayor, Jr. (2010). "The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets." Br J Pharmacol **160**(4): 821-832.

Piotrowicz, R. S., R. P. Orzechowski, D. J. Nugent, K. Y. Yamada and T. J. Kunicki (1988). "Glycoprotein Ic-IIa functions as an activation-independent fibronectin receptor on human platelets." J Cell Biol **106**(4): 1359-1364.

Polgar, J., W. S. Lane, S. H. Chung, A. K. Houg and G. L. Reed (2003). "Phosphorylation of SNAP-23 in activated human platelets." J Biol Chem **278**(45): 44369-44376.

Poole, A. W., G. Pula, I. Hers, D. Crosby and M. L. Jones (2004). "PKC-interacting proteins: from function to pharmacology." Trends Pharmacol Sci **25**(10): 528-535.

Prevost, N., J. V. Mitsios, H. Kato, J. E. Burke, E. A. Dennis, T. Shimizu and S. J. Shattil (2009). "Group IVA cytosolic phospholipase A2 (cPLA2alpha) and integrin alphaIIb beta3 reinforce each other's functions during alphaIIb beta3 signaling in platelets." Blood **113**(2): 447-457.

Prospective Studies, C., S. Lewington, G. Whitlock, R. Clarke, P. Sherliker, J. Emberson, J. Halsey, N. Qizilbash, R. Peto and R. Collins (2007). "Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths." Lancet **370**(9602): 1829-1839.

Pula, G., D. Crosby, J. Baker and A. W. Poole (2005). "Functional interaction of protein kinase Calpha with the tyrosine kinases Syk and Src in human platelets." J Biol Chem **280**(8): 7194-7205.

Pula, G., K. Schuh, K. Nakayama, K. I. Nakayama, U. Walter and A. W. Poole (2006). "PKCdelta regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation." Blood **108**(13): 4035-4044.

- Pytela, R., M. D. Pierschbacher and E. Ruoslahti (1985). "A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(17): 5766-5770.
- Quinn, M. J. and D. J. Fitzgerald (1999). "Ticlopidine and clopidogrel." Circulation **100**(15): 1667-1672.
- Rabie, T., A. Strehl, A. Ludwig and B. Nieswandt (2005). "Evidence for a role of ADAM17 (TACE) in the regulation of platelet glycoprotein V." J Biol Chem **280**(15): 14462-14468.
- Radley, J. M. and C. J. Haller (1982). "The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer?" Blood **60**(1): 213-219.
- Ramakrishnan, V., F. DeGuzman, M. Bao, S. W. Hall, L. L. Leung and D. R. Phillips (2001). "A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1823-1828.
- Raslova, H., L. Roy, C. Vourc'h, J. P. Le Couedic, O. Brison, D. Metivier, J. Feunteun, G. Kroemer, N. Debili and W. Vainchenker (2003). "Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification." Blood **101**(2): 541-544.
- Rasmussen, U. B., V. Vouret-Craviari, S. Jallat, Y. Schlesinger, G. Pages, A. Pavirani, J. P. Lecocq, J. Pouyssegur and E. Van Obberghen-Schilling (1991). "cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization." FEBS Lett **288**(1-2): 123-128.
- Robinson, K., D. Jones, Y. Patel, H. Martin, J. Madrazo, S. Martin, S. Howell, M. Elmore, M. J. Finnen and A. Aitken (1994). "Mechanism of inhibition of protein kinase C by 14-3-3 isoforms. 14-3-3 isoforms do not have phospholipase A2 activity." Biochem J **299** (Pt 3): 853-861.
- Romo, G. M., J. F. Dong, A. J. Schade, E. E. Gardiner, G. S. Kansas, C. Q. Li, L. V. McIntire, M. C. Berndt and J. A. Lopez (1999). "The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin." J Exp Med **190**(6): 803-814.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis is an inflammatory disease." Am Heart J **138**(5 Pt 2): S419-420.
- Ruggeri, Z. M. (2002). "Platelets in atherothrombosis." Nat Med **8**(11): 1227-1234.
- Ruoslahti, E. and E. Engvall (1997). "Integrins and vascular extracellular matrix assembly." J Clin Invest **99**(6): 1149-1152.
- Sadler, J. E. (2005). "New concepts in von Willebrand disease." Annu Rev Med **56**: 173-191.

Saelman, E. U., H. K. Nieuwenhuis, K. M. Hese, P. G. de Groot, H. F. Heijnen, E. H. Sage, S. Williams, L. McKeown, H. R. Gralnick and J. J. Sixma (1994). "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 **83**(5): 1244-1250.

Salzman, E. W. and H. Weisenberger (1972). "Role of cyclic AMP in platelet function." Adv Cyclic Nucleotide Res **1**: 231-247.

Savage, B., F. Almus-Jacobs and Z. M. Ruggeri (1998). "Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow." Cell **94**(5): 657-666.

Savage, B., M. Cattaneo and Z. M. Ruggeri (2001). "Mechanisms of platelet aggregation." Curr Opin Hematol **8**(5): 270-276.

Savage, B., E. Saldivar and Z. M. Ruggeri (1996). "Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor." Cell **84**(2): 289-297.

Savi, P., P. Beauverger, C. Labouret, M. Delfaud, V. Salel, M. Kaghad and J. M. Herbert (1998). "Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation." FEBS Lett **422**(3): 291-295.

Savoia, A., A. Pastore, D. De Rocco, E. Civaschi, M. Di Stazio, R. Bottega, F. Melazzini, V. Bozzi, A. Pecci, S. Magrin, C. L. Balduini and P. Noris (2011). "Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations." Haematologica **96**(3): 417-423.

Schade, A. J., M. Arya, S. Gao, R. Diz-Kucukkaya, B. Anvari, L. V. McIntire, J. A. Lopez and J. F. Dong (2003). "Cytoplasmic truncation of glycoprotein Ib alpha weakens its interaction with von Willebrand factor and impairs cell adhesion." Biochemistry **42**(7): 2245-2251.

Schechtman, D. and D. Mochly-Rosen (2001). "Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction." Oncogene **20**(44): 6339-6347.

Schmidt, V. A., W. C. Nierman, D. R. Maglott, L. D. Cupit, K. A. Moskowitz, J. A. Wainer and W. F. Bahou (1998). "The human proteinase-activated receptor-3 (PAR-3) gene. Identification within a Par gene cluster and characterization in vascular endothelial cells and platelets." J Biol Chem **273**(24): 15061-15068.

Shaklai, M. and M. Tavassoli (1978). "Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process." J Ultrastruct Res **62**(3): 270-285.

Shattil, S. J. and L. F. Brass (1987). "Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators." J Biol Chem **262**(3): 992-1000.

Shattil, S. J., H. Kashiwagi and N. Pampori (1998). "Integrin signaling: the platelet paradigm." Blood **91**(8): 2645-2657.

Shiraki, R., N. Inoue, S. Kawasaki, A. Takei, M. Kadotani, Y. Ohnishi, J. Ejiri, S. Kobayashi, K. Hirata, S. Kawashima and M. Yokoyama (2004). "Expression of Toll-like receptors on human platelets." Thromb Res **113**(6): 379-385.

Siess, W. and E. G. Lapetina (1988). "Ca²⁺ mobilization primes protein kinase C in human platelets. Ca²⁺ and phorbol esters stimulate platelet aggregation and secretion synergistically through protein kinase C." Biochem J **255**(1): 309-318.

Simon, D. I., Z. Chen, H. Xu, C. Q. Li, J. Dong, L. V. McIntire, C. M. Ballantyne, L. Zhang, M. I. Furman, M. C. Berndt and J. A. Lopez (2000). "Platelet glycoprotein Iba α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)." J Exp Med **192**(2): 193-204.

Sixma, J. J., M. E. Schiphorst, C. L. Verweij and H. Pannekoek (1991). "Effect of deletion of the A1 domain of von Willebrand factor on its binding to heparin, collagen and platelets in the presence of ristocetin." Eur J Biochem **196**(2): 369-375.

Soltoff, S. P. (2007). "Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKC δ ." Trends Pharmacol Sci **28**(9): 453-458.

Sonnenberg, A., P. W. Modderman and F. Hogervorst (1988). "Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6." Nature **336**(6198): 487-489.

Soslau, G., R. Class, D. A. Morgan, C. Foster, S. T. Lord, P. Marchese and Z. M. Ruggeri (2001). "Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib." J Biol Chem **276**(24): 21173-21183.

Steinberg, S. F. (2004). "Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase C δ ." Biochem J **384**(Pt 3): 449-459.

Steinberg, S. F. (2008). "Structural basis of protein kinase C isoform function." Physiol Rev **88**(4): 1341-1378.

Steinman, D. A., T. L. Poepping, M. Tambasco, R. N. Rankin and D. W. Holdsworth (2000). "Flow patterns at the stenosed carotid bifurcation: effect of concentric versus eccentric stenosis." Ann Biomed Eng **28**(4): 415-423.

Stoll, G., C. Kleinschnitz and B. Nieswandt (2008). "Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment." Blood **112**(9): 3555-3562.

Strehl, A., I. C. Munnix, M. J. Kuijpers, P. E. van der Meijden, J. M. Cosemans, M. A. Feijge, B. Nieswandt and J. W. Heemskerk (2007). "Dual role of platelet protein kinase C in thrombus formation: stimulation of pro-aggregatory and suppression of procoagulant activity in platelets." J Biol Chem **282**(10): 7046-7055.

Stuart, M. J. (1983). "Prostaglandins and hemostasis: an overview." Adv Pediatr **30**: 321-364.

Sudlow, C. (2005). "What is the role of dipyridamole in long-term secondary prevention after an ischemic stroke or transient ischemic attack?" CMAJ **173**(9): 1024-1026.

Tabuchi, A., A. Yoshioka, T. Higashi, R. Shirakawa, H. Nishioka, T. Kita and H. Horiuchi (2003). "Direct demonstration of involvement of protein kinase Calpha in the Ca²⁺-induced platelet aggregation." J Biol Chem **278**(29): 26374-26379.

Teng, R. and K. Butler (2010). "Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist, in healthy subjects." Eur J Clin Pharmacol **66**(5): 487-496.

Toker, A., C. A. Ellis, L. A. Sellers and A. Aitken (1990). "Protein kinase C inhibitor proteins. Purification from sheep brain and sequence similarity to lipocortins and 14-3-3 protein." Eur J Biochem **191**(2): 421-429.

Toker, A., L. A. Sellers, B. Amess, Y. Patel, A. Harris and A. Aitken (1992). "Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1/14-3-3) from sheep brain. Amino acid sequence of phosphorylated forms." Eur J Biochem **206**(2): 453-461.

Tomer, A. (2004). "Platelet activation as a marker for in vivo prothrombotic activity: detection by flow cytometry." J Biol Regul Homeost Agents **18**(2): 172-177.

Toullec, D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle and et al. (1991). "The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C." J Biol Chem **266**(24): 15771-15781.

Tsuji, M., Y. Ezumi, M. Arai and H. Takayama (1997). "A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets." J Biol Chem **272**(38): 23528-23531.

Tuckwell, D., D. A. Calderwood, L. J. Green and M. J. Humphries (1995). "Integrin alpha 2 I-domain is a binding site for collagens." J Cell Sci **108 (Pt 4)**: 1629-1637.

Uff, S., J. M. Clemetson, T. Harrison, K. J. Clemetson and J. Emsley (2002). "Crystal structure of the platelet glycoprotein Ib(alpha) N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation." J Biol Chem **277**(38): 35657-35663.

Ulrichs, H., M. Udvardy, P. J. Lenting, I. Pareyn, N. Vandeputte, K. Vanhoorelbeke and H. Deckmyn (2006). "Shielding of the A1 domain by the D'D3 domains of von Willebrand factor modulates its interaction with platelet glycoprotein Ib-IX-V." J Biol Chem **281**(8): 4699-4707.

Varga-Szabo, D., I. Pleines and B. Nieswandt (2008). "Cell adhesion mechanisms in platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 403-412.

Vettore, S., R. Scandellari, S. Moro, A. M. Lombardi, M. Scapin, M. L. Randi and F. Fabris (2008). "Novel point mutation in a leucine-rich repeat of the GPIbalpha chain of the platelet von Willebrand factor receptor, GPIb/IX/V, resulting in an inherited dominant form of Bernard-Soulier syndrome affecting two unrelated families: the N41H variant." Haematologica **93**(11): 1743-1747.

Vial, C., B. Hechler, C. Leon, J. P. Cazenave and C. Gachet (1997). "Presence of P2X1 purinoceptors in human platelets and megakaryoblastic cell lines." Thromb Haemost **78**(6): 1500-1504.

Violin, J. D. and A. C. Newton (2003). "Pathway illuminated: visualizing protein kinase C signaling." IUBMB Life **55**(12): 653-660.

Vu, T. K., D. T. Hung, V. I. Wheaton and S. R. Coughlin (1991). "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation." Cell **64**(6): 1057-1068.

Vu, T. K., V. I. Wheaton, D. T. Hung, I. Charo and S. R. Coughlin (1991). "Domains specifying thrombin-receptor interaction." Nature **353**(6345): 674-677.

Wadanoli, M., D. Sako, G. D. Shaw, R. G. Schaub, Q. Wang, B. Tchernychev, J. Xu, T. J. Porter and Q. Huang (2007). "The von Willebrand factor antagonist (GPG-290) prevents coronary thrombosis without prolongation of bleeding time." Thromb Haemost **98**(2): 397-405.

Wall, J. E., M. Buijs-Wilts, J. T. Arnold, W. Wang, M. M. White, L. K. Jennings and C. W. Jackson (1995). "A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents." Br J Haematol **89**(2): 380-385.

Ward, C. M., R. K. Andrews, A. I. Smith and M. C. Berndt (1996). "Mocarhagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrand factor receptor glycoprotein

Ibalpha. Identification of the sulfated tyrosine/anionic sequence Tyr-276-Glu-282 of glycoprotein Ibalpha as a binding site for von Willebrand factor and alpha-thrombin." Biochemistry **35**(15): 4929-4938.

Watson, S. P., J. M. Auger, O. J. McCarty and A. C. Pearce (2005). "GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets." J Thromb Haemost **3**(8): 1752-1762.

Weber, C. (2005). "Killing two birds with one stone: targeting chemokine receptors in atherosclerosis and HIV infection." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(12): 2448-2450.

Weber, C. (2005). "Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime." Circ Res **96**(6): 612-616.

Wentworth, J. K., G. Pula and A. W. Poole (2006). "Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets." Biochem J **393**(Pt 2): 555-564.

White, J. G. and M. Krumwiede (1987). "Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets." Blood **69**(4): 1196-1203.

Williams, C. M., M. T. Harper and A. W. Poole (2014). "PKCalpha negatively regulates in vitro proplatelet formation and in vivo platelet production in mice." Platelets **25**(1): 62-68.

Williamson, D., I. Pikovski, S. L. Cranmer, P. Mangin, N. Mistry, T. Domagala, S. Chehab, F. Lanza, H. H. Salem and S. P. Jackson (2002). "Interaction between platelet glycoprotein Ibalpha and filamin-1 is essential for glycoprotein Ib/IX receptor anchorage at high shear." J Biol Chem **277**(3): 2151-2159.

Winokur, R. and J. H. Hartwig (1995). "Mechanism of shape change in chilled human platelets." Blood **85**(7): 1796-1804.

Wu, Y., N. Asazuma, K. Satoh, Y. Yatomi, T. Takafuta, M. C. Berndt and Y. Ozaki (2003). "Interaction between von Willebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinase in human platelets: role of phosphoinositide 3-kinase." Blood **101**(9): 3469-3476.

Xiao, B., S. J. Smerdon, D. H. Jones, G. G. Dodson, Y. Soneji, A. Aitken and S. J. Gamblin (1995). "Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways." Nature **376**(6536): 188-191.

Xu, W. F., H. Andersen, T. E. Whitmore, S. R. Presnell, D. P. Yee, A. Ching, T. Gilbert, E. W. Davie and D. C. Foster (1998). "Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6642-6646.

Yacoub, D., A. Hachem, J. F. Theoret, M. A. Gillis, W. Mourad and Y. Merhi (2010). "Enhanced levels of soluble CD40 ligand exacerbate platelet aggregation and thrombus formation through a CD40-dependent tumor necrosis factor receptor-associated factor-2/Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(12): 2424-2433.

Yacoub, D., J. F. Theoret, L. Villeneuve, H. Abou-Saleh, W. Mourad, B. G. Allen and Y. Merhi (2006). "Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release." J Biol Chem **281**(40): 30024-30035.

Yin, H., J. Liu, Z. Li, M. C. Berndt, C. A. Lowell and X. Du (2008). "Src family tyrosine kinase Lyn mediates VWF/GPIb-IX-induced platelet activation via the cGMP signaling pathway." Blood **112**(4): 1139-1146.

Yonemoto, W., M. L. McGlone, B. Grant and S. S. Taylor (1997). "Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in Escherichia coli." Protein Eng **10**(8): 915-925.

Yoshioka, A., R. Shirakawa, H. Nishioka, A. Tabuchi, T. Higashi, H. Ozaki, A. Yamamoto, T. Kita and H. Horiuchi (2001). "Identification of protein kinase Calpha as an essential, but not sufficient, cytosolic factor for Ca²⁺-induced alpha- and dense-core granule secretion in platelets." J Biol Chem **276**(42): 39379-39385.

Yuan, Y., S. Kulkarni, P. Ulsemer, S. L. Cranmer, C. L. Yap, W. S. Nesbitt, I. Harper, N. Mistry, S. M. Dopheide, S. C. Hughan, D. Williamson, C. de la Salle, H. H. Salem, F. Lanza and S. P. Jackson (1999). "The von Willebrand factor-glycoprotein Ib/V/IX interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells." J Biol Chem **274**(51): 36241-36251.

Zeller, J. A., D. Tschoepe and C. Kessler (1999). "Circulating platelets show increased activation in patients with acute cerebral ischemia." Thromb Haemost **81**(3): 373-377.

Liste des publications

- Tidjane N, Hachem A, **Zaid Y**, Merhi Y, Gaboury L, Girolami JP, Couture R. A primary role for kinin B1 receptor in inflammation, organ damage, and lethal thrombosis in a rat model of septic shock in diabetes. *European Journal of Inflammation* 2015, 13(1) 40–52.
- Senhaji N, Diakité B, Serbati N, **Zaid Y**, Badre W, Nadifi S. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms: New data and a meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2014 Dec 10;14:206.
- El Kadmiri N, **Zaid Y**, Hamzi K, Nadifi S, Slassi I, El Moutawakil B. Clinical presentation of Moroccan cases with Alzheimer's disease. *Encephale.* 2014 Dec;40(6):481-6.
- El Kadmiri N, Zaid N, **Zaid Y**, Tadevosyan A, Hachem A, Dubé MP, Hamzi K, El Moutawakil B, Slassi I, Nadifi S. Novel presenilin mutations within Moroccan patients with Early-Onset Alzheimer's Disease. *Neuroscience.* 2014 Jun 6;269:215-22.
- El Kadmiri N, Zaid N, Hachem A, **Zaid Y**, Dubé MP, Hamzi K, El Moutawakil B, Slassi I, Nadifi S. Novel mutations in the amyloid precursor protein gene within Moroccan patients with Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 2014 Jun;53(2):189-95.
- Bou Khzam L, Boulahya R, Abou-Saleh H, Hachem A, **Zaid Y**, Merhi Y. Soluble CD40 ligand stimulates the pro-angiogenic function of peripheral blood angiogenic outgrowth cells *via* increased release of matrix metalloproteinase-9. *PLoS One.* 2013 Dec 16;8(12):e84289.
- Bou Khzam L, Hachem A, **Zaid Y**, Boulahya R, Mourad W, Merhi Y. Soluble CD40 ligand impairs the anti-platelet function of peripheral blood angiogenic outgrowth cells *via* increased production of reactive oxygen species. *Thromb Haemost.* 2013 May;109(5):940-7.
- Hachem A, Yacoub D, **Zaid Y**, Mourad W, Merhi Y. Involvement of nuclear factor κ B in platelet CD40 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Aug 17;425(1):58-63.

- **Zaid Y***, Habti N*, Benzakour G*, Naya A, Nourichafi N, Mifdal H, Motaouakkil S, Oudghiri M. Analyses of the effect of para-phenylenediamine (Takaout Roumia) on the osmotic stability of Human erythrocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2010; 2:101-107.

*(Note: *These authors contributed equally to this work.)*

Articles en préparation de soumission

- **Zaid Y**, Hachem A, Mrad R, Yacoub D, Martel C, Villeneuve L, Lordkipanidzé M, Mourad W, Merhi Y. PKC δ negatively regulates thrombin-induced platelet activation and aggregation via p38 MAPK, Erk1/2 and TXA2 downstream of GPIb α .

- **Zaid Y**, Hachem A, Mourad W, Merhi Y. Thrombin/GPIb α /PKC δ axis negatively regulates platelet function, bleeding time and pulmonary micro-embolies in mice.

- Mountassif D, Fabre L, **Zaid Y**, Halawani D, Rouiller I. Long range conformational change in the AAA ATPase p97: N-domain mutation R155P induces a conformation change in the D2 domain.

- Mountassif D, Fabre L, Basu K, **Zaid Y**, Bostina M, Rouiller I. A major conformational change in the hIBMPFTD ATPase p97 mutant R155P upon ATP binding.