

Université de Montréal

La signalisation du Brain-Derived Neurotrophic Factor et ses récepteurs dans les plaquettes

par Imane Boukhatem

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de MSc

en sciences pharmaceutiques

option pharmacologie

Avril, 2019

© Imane Boukhatem, 2019

Résumé

Initialement découvert au cerveau, le *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) est un facteur de croissance dont les mécanismes de relâche et la signalisation ont été bien étudiés dans le système nerveux central. Il est aussi retrouvé en concentrations importantes dans la circulation où il est emmagasiné dans les plaquettes avec des niveaux pouvant atteindre 100 à 1000 fois ceux des neurones. Malgré l'abondance du BDNF dans les plaquettes, sa fonction dans la physiologie plaquettaire n'a jamais été étudiée. Le but de ce projet était donc d'investiguer le rôle du BDNF dans la fonction plaquettaire et les mécanismes de signalisation impliqués dans la réponse plaquettaire au BDNF. Lorsque les plaquettes sont isolées et re-suspendues dans un tampon physiologique dépourvu de protéines plasmatiques, le BDNF induit une agrégation plaquettaire complète et biphasique qui dépend des voies secondaires de l'agrégation. La neurotrophine NT4 ainsi qu'un anticorps activateur du récepteur TrkB ont tous les deux induit une agrégation plaquettaire similaire à celle du BDNF suggérant un récepteur commun, le TrkB. Par immunobuvardage, cytométrie en flux et microscopie électronique, nous avons pu confirmer que les plaquettes expriment une forme tronquée du récepteur TrkB, au niveau intracellulaire et à leur surface. Les tests fonctionnels nous ont mené à impliquer les voies de rhoGTPase Rac1, la protéine kinase C (PKC) et la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt dans l'agrégation plaquettaire induite par le BDNF. Une fois activées par le BDNF, les plaquettes relâchent plusieurs cytokines proinflammatoires et proangiogéniques qui peuvent jouer un rôle important dans le maintien et la réparation de l'intégrité vasculaire. Parmi les agents relâchés, on retrouve des facteurs de croissances comme le PDGF et le VEGF, mais aussi des chimiokines comme l'IL8 et ENA-78. Finalement, lorsque les expériences d'agrégation ont été répétées en plasma

riche en plaquettes, l'effet pro-agrégant du BDNF était perdu, possiblement via une liaison de BDNF avec la protéine plasmatique α 2-macroglobuline (α 2M). Cette liaison à α 2M, suggérée par des expériences de co-immunoprécipitation, réduit la biodisponibilité du BDNF et pourrait aider à contenir la réponse plaquettaire au BDNF aux sites de lésions vasculaires.

Mots-clés : BDNF, plaquettes, agrégation, TrkB, tyrosine kinase, signalisation

Abstract

The Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a growth factor that was initially discovered in the brain. BDNF has both an autocrine and a paracrine role in neurons and its release and signaling mechanisms have been extensively studied in the central nervous system. Surprisingly, large quantities of BDNF have been reported in circulation, where it is essentially stored in platelets with concentrations reaching 100-1000-fold those of neurons. Despite this abundance, the function of BDNF in platelet biology has not been explored. Thus, this project sought to investigate the effect of BDNF on platelet function and the mechanisms underlying platelet responses to BDNF. In washed platelets, BDNF induced complete biphasic platelet aggregation that in part relied on amplification from secondary mediators. The low-affinity agonist neurotrophin-4 and an activating antibody raised against the canonical BDNF receptor TrkB induced similar platelet responses, implicating TrkB. Platelets express, both at their surface and in their intracellular compartment, a truncated form of TrkB lacking a tyrosine kinase domain. The BDNF-induced aggregation of washed platelets was prevented by inhibitors of the Rac1, PKC, and PI3K/Akt. Platelets exposed to BDNF secreted pro-angiogenic and pro-inflammatory cytokines, which may play a role in maintaining vascular homeostasis. Finally, in platelet-rich plasma, exogenous BDNF failed to induce aggregation and BDNF immunoprecipitates contained α 2-macroglobulin immunoreactivity. Hence, platelets are rich in BDNF, which induce platelet aggregation via TrkB activation. The restriction of BDNF bioavailability by plasma protein binding may serve to target BDNF-mediated platelet activation to sites of vascular injury.

Keywords : BDNF, platelets, aggregation, TrkB, tyrosine kinase, signaling

Table des matières

RÉSUMÉ.....	I
ABSTRACT.....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	X
REMERCIEMENTS	XII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1: PLAQUETTES.....	2
ORIGINE ET STRUCTURE DES PLAQUETTES	2
FONCTION PLAQUETTAIRE	3
RÉCEPTEURS ET SIGNALISATION PLAQUETTAIRE.....	4
1. Récepteurs couplés à la protéine G	5
1.1 Récepteurs de la thrombine	5
1.2 Récepteurs de l'ADP.....	6
1.3 Récepteur de la thromboxane A ₂	7
1.4 Récepteurs de la famille des prostaglandines	8
2. Les récepteurs à tyrosine kinase.....	8
2.1 GPVI et FCγR.....	8
2.2 CLEC-2	9
2.3 P-selectine (CD62P).....	9
2.4 Récepteur de la thrombopoïétine (c-mpl)	10
2.5 Récepteurs de la protéine GAS6	10
2.6 Autres protéines membranaires	10
CD36:	10
3. Intégrines.....	11
3.1 αIIbβ3 :	11
3.2 α2β1 :	11
SÉCRÉTION PLAQUETTAIRE	12
1. α-granules	12
2. Granules denses.....	14
3. Lysosomes.....	14
4. Mécanismes de sécrétion granulaires :	15
5. Sécrétome inflammatoire et angiogénique plaquettaire	16
CIBLES ANTIPLAQUETTAIRES	17
1. Aspirine.....	17
2. Inhibiteurs de la voie de l'ADP	17
3. Inhibiteur de la voie de la thrombine	18
4. Inhibiteur de l'intégrine αIIbβ3.....	19
5. Inhibiteur du GPVI	19
6. Inhibiteurs de tyrosine kinases	20

CHAPITRE 2: BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR	21
SYNTHÈSE DU BDNF	21
RÔLE ET RÉCEPTEURS DU BDNF DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL	22
1. <i>TrkB</i> dans le système nerveux central	22
2. <i>P75^{NTR}</i> dans le système nerveux central	25
3. Récepteurs du BDNF et son rôle dans le système cardiovasculaire	25
CHAPITRE 3: BDNF DANS LES PLAQUETTES	28
PRÉSENCE DE BDNF DANS LES PLAQUETTES	28
TRKB ET P75 ^{NTR} DANS LES PLAQUETTES	29
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	30
HYPOTHÈSE	30
OBJECTIFS	30
CHAPITRE 4: PLATELETS EXPRESS A TRUNCATED FORM OF THE TRKB RECEPTOR INVOLVED IN BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR SIGNALING	31
CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT	31
ABSTRACT	34
INTRODUCTION	35
MATERIALS AND METHODS	36
MATERIALS	36
PARTICIPANT SELECTION	37
BLOOD COLLECTION AND PLATELET ISOLATION	37
LIGHT TRANSMISSION AGGREGOMETRY	38
PROTEIN PHOSPHORYLATION	38
FLOW CYTOMETRY	38
CONFOCAL MICROSCOPY	39
IMMUNOPRECIPITATION	39
ANALYSIS OF THE PLATELET SECRETOME	39
STATISTICAL ANALYSES	40
RESULTS	40
BDNF INDUCES PLATELET AGGREGATION	40
PLATELETS EXPRESS A TRUNCATED FORM OF THE TRKB RECEPTOR	40
OTHER LIGANDS OF TRKB ALSO INDUCE PLATELET AGGREGATION	41
BDNF INDUCES PLATELET AGGREGATION THROUGH A KINASE-DEPENDENT MECHANISM	41
BDNF-INDUCED PLATELET RESPONSES DO NOT REQUIRE ACTIVATION OF NON-RECEPTOR PROTEIN TYROSINE KINASES SRC AND SYK	42
RHO GTPASE RAC-1 IS INVOLVED IN BDNF-INDUCED PLATELET AGGREGATION	42
BDNF IS SEQUESTERED IN PLASMA BY A ₂ -MACROGLOBULIN	43
BDNF INDUCES PLATELET SECRETION	44
DISCUSSION	44
TRKB EXPRESSION IN PLATELETS	45
PLATELET-SECRETED BDNF AS A PARACRINE REGULATOR IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM	46
ACKNOWLEDGEMENTS	47

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS.....	47
DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST.....	47
REFERENCES.....	48
FIGURE LEGENDS.....	53
FIGURES :.....	57
FIGURE 1.....	57
FIGURE 2.....	58
FIGURE 3.....	59
FIGURE 4.....	60
FIGURE 5.....	61
FIGURE 6.....	62
FIGURE 7.....	63
DISCUSSION.....	64
RÉSUMÉ DES RÉSULTATS MAJEURS.....	64
BDNF COMME ACTIVATEUR PLAQUETTAIRE VIA TRKB.....	64
SIGNALISATION NEURONALE VS PLAQUETTAIRE INDUITE PAR LE BDNF.....	65
SÉCRÉTION PLAQUETTAIRE INDUITE PAR LE BDNF.....	65
MÉCANISMES DE RÉGULATION DE BDNF EN CIRCULATION.....	66
LES PLAQUETTES COMME VECTEURS DE MOLÉCULES NEUROACTIVES.....	67
CONCLUSION.....	69
RÉFÉRENCES.....	I

Liste des tableaux

Tableau I. Tableau résumé du contenu des α -granules. Repris, adapté et traduit avec permission de (Yadav et Storrie, 2017), tableau I. Publié Par Platelets et sous licence de Taylor & Francis. 13

Liste des figures

- Figure 1. Rôle des cytokines dans la mégacaryopoïèse et production de plaquettes matures. Repris avec permission de (Kaushansky, 1998), figure 2. Publié dans The New England Journal Of Medecine et sous licence de Massachusetts Medical Society. 2
- Figure 2. Clivage, activation et signalisation du récepteur PAR₁. La thrombine lie la queue N-terminal du récepteur et la clive pour générer une nouvelle queue N-terminal. L'activation du récepteur induit le couplage à différentes protéines G qui active différentes voies de signalisation. Repris avec la permission de (Soh, Dores, Chen et Trejo, 2010), figure1. Publié par British Journal of Pharmacology et sous licence de John Wiley et Sons. 5
- Figure 3. Schéma résumé de la signalisation des récepteurs de l'ADP, récepteurs couplés à la protéine G. Repris avec la permission de (Gurbel et al., 2015), figure 2. Publié par Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. Sous licence de Springer Nature..... 7
- Figure 4. Signalisation du collagène via le récepteur GPVI et FCγR. Sur les plaquettes. Repris avec permission de (Dutting, Bender et Nieswandt, 2012), figure 2. Publié par Trends in Pharmacological Sciences et sous licence de Elsevier 2019 8
- Figure 5. Image de microscopie électronique de plaquettes humaines fixées. Les α-granules sont indiquées par un α et les granules denses par un d. Échelle de 500nm. 12
- Figure 6. Schéma illustrant les étapes de sécrétion granulaire. Repris avec permission de (Flaumenhaft, 2003), figure 1. Publié par le journal Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology et sous licence de Wolters Kluwer Health, Inc. 15
- Figure 7. Schéma du clivage des protéines précurseurs du BDNF. 21
- Figure 8. Signalisation du récepteur TrkB dans les neurones. BDNF active plusieurs voies de signalisation qui mènent à la promotion de la survie cellulaire et la plasticité synaptique. Repris avec permission de (Minichiello, 2009), figure 1. Publié par Nature Reviews Neuroscience et sous licence de Springer Nature. 22

Figure 9. Immunobuvardage montrant la présence du BDNF dans les plaquettes de volontaires sains humains, de rats, mais pas de souris. Le BDNF et le proBDNF recombinants étaient utilisés comme contrôles positifs. Repris avec permission de (Chacon-Fernandez et al., 2016), figure 1. Publié par Journal of Biological Chemistry et sous licence de CC-BY..... 28

Liste des sigles et des abréviations

AC: Adénylate cyclase

ADP: Adénosine diphosphate

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

CHP: Cellules hématopoïétiques pluripotentes

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

COX-1: Cyclooxygénase-1

DAG: Diacylglycérols

EGF: Epidermal growth factor

FGF: Fibroblast growth factor

GAS6: Growth arrest specific 6

GPVI: Glycoprotein VI

Ig: Immunoglobuline

Ig-like C2: Immunoglobulin-like C2

IL-1 β : Interleukine-1 β

IL-8: Interleukine-8

IP3: Inositol triphosphate

ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

LAT: Linker for activation of T cells

PARs: Protease Activated Receptors

PDGF: Platelet-derived growth factor

PF4: Platelet factor 4

PGE₂: Prostaglandine

PGH₂: Prostaglandine H₂

PGI₂: Prostacycline

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PKC: Protéine kinase C

PLA₂: Phospholipase A₂

PLC: Phospholipase C

PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1

RANTES: Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted

SDF-1: Stromal cell-derived factor 1

SNAPs: Soluble NSF Attachment Proteins

SNAREs: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptors

STXBP: Syntaxin binding proteins

TKIsL: Inhibiteurs de tyrosine kinase

TP: Récepteur au TxA₂

TPO: Thrombopoïétine

TrkB: Tropomyosin-related kinase B

TxA₂: Thromboxane A₂

VAMPs: Vesicular Associated Membrane Proteins

VEGF: Vascular endothelial growth factor

vWF: Facteur de von Willebrand

Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de recherche Dr Marie Lordkipanidzé pour avoir été une directrice hors-pair, pour ses précieux conseils et son aide qu'elle n'a jamais cessé d'apporter tout au long de ma maîtrise. Je la remercie pour sa confiance inébranlable et de m'avoir appris à toujours me dépasser afin de donner le meilleur de moi-même dans tout ce que j'entreprends.

Je remercie également mon co-directeur, Dr Bruce Allen, pour son support constant, ses nombreux conseils, sa bonne humeur et pour m'avoir accueilli chaleureusement dans son laboratoire. Merci à son équipe pour leur aide et leurs conseils.

Pour leurs mots d'encouragements, leur travail impeccable au laboratoire et leur constante bonne humeur, j'aimerais remercier Mélanie Welman, Samuel Fleury et Jessica Le Blanc.

Pour leur coopération pour les prélèvements et leur aide précieuse, je remercie les infirmiers de recherche Maryse Tremblay, Sarah Samson et George Gabor-Popa.

Pour leurs suggestions et recommandations, je remercie les membres de mon comité consultatif, Dr Éric Thorin et Dr Gaétan Mayer.

Pour son apport scientifique à ce projet et ses conseils, je remercie Dr Uri Saragovi.

Merci aux chercheurs et aux étudiants du centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal qui ont participé de près ou de loin à mon apprentissage et particulièrement l'équipe du Dr Guylaine Ferland.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon mémoire.

Enfin, merci à ma famille pour leur soutien continu et leur patience.

Introduction

Le Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) est une neurotrophine identifiée dans les années 1980. Cette protéine médie une variété de fonctions biologiques au niveau neuronal et cardiovasculaire. Elle est impliquée dans l'inflammation et l'angiogenèse. Ce travail de maîtrise étend le répertoire de cette neurotrophine en étudiant son rôle dans les plaquettes.

De leur importance vitale dans l'hémostase jusqu'à leur implication dans l'inflammation, l'angiogenèse et la réponse immunitaire, les plaquettes ont été le sujet de très nombreux travaux ces dernières années. En effet, considérées comme un réservoir ambulatoire de protéines et de facteurs de croissance, elles sont stratégiquement placées pour médier plusieurs réponses physiologiques et en très peu de temps. Dans leur cargo, les plaquettes emmagasinent des quantités considérables de BDNF dont l'origine est encore débattue étant donnée la nature anucléée des plaquettes. Les prochains chapitres couvrent la physiologie plaquettaire et celle du BDNF et de ses récepteurs dans le système nerveux central et cardiovasculaire afin de placer les éléments de ce travail de recherche.

L'article « *Platelets express a truncated form of the TrkB receptor involved in Brain-Derived Neurotrophic Factor signaling* » constitue le cœur de ce travail de maîtrise sur le BDNF et la signalisation plaquettaire. Cet article a été soumis au journal *Blood*.

Chapitre 1: Plaquettes

Origine et structure des plaquettes

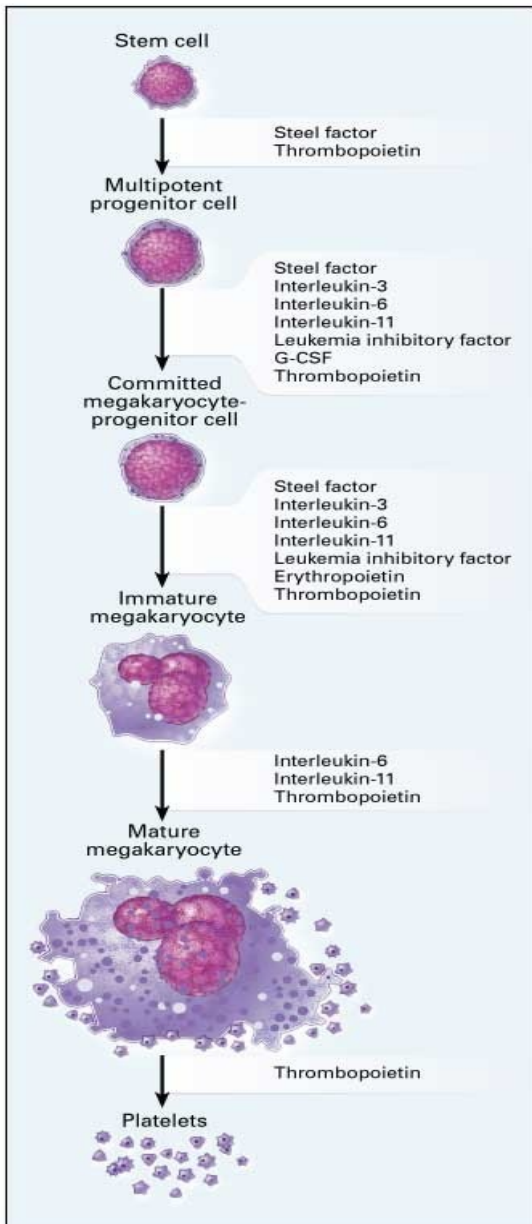


Figure 1. Rôle des cytokines dans la mégacaryopoïèse et production de plaquettes matures. Repris avec permission de (1), figure 2. Publié dans The New England Journal Of Medicine et sous licence de Massachusetts Medical Society.

Les plaquettes dérivent d'un processus complexe appelé mégacaryopoïèse qui implique la différenciation de cellules hématopoïétiques pluripotentes (CHP) en mégacaryocytes et éventuellement des plaquettes. Les CHP se différencient en deux lignées : lymphoïde et myéloïde.(2) Cette dernière lignée se différencie à son tour pour former plusieurs cellules sanguines dont les érythrocytes, les macrophages et les plaquettes. La différenciation des cellules progénitrices myéloïdes implique plusieurs cytokines et facteurs de croissances spécifiques à chaque étape de différenciation (figure 1). (3) Pour les plaquettes, les CHP se différencient en mégacaryocytes, des cellules polyploïdes, qui forment des extensions pro-plaquettaires pour se fragmenter et donner

naissance à des plaquettes anucléées.(2-5) Étant des cellules anucléées dérivées des mégacaryocytes, les plaquettes héritent de la majorité de leurs protéines de ces dernières et peuvent réguler la mégacaryopoïèse grâce à la thrombopoïétine (TPO) et son récepteur c-mpl qui sont présents sur les deux types cellulaires. (6)

Les plaquettes sont des petites cellules discoïdes d'environ 2 à 5µM de diamètre avec une courte durée de vie en circulation d'environ 10 jours. (7) L'absence du noyau et le rôle des plaquettes dans l'hémostase leur procure une structure assez unique. Le cytosquelette plaquettaire est formé d'un réseau dense de filaments d'actine et de microtubules de tubuline. Ce réseau de filaments subit un réarrangement important durant l'activation plaquettaire permettant à ces dernières de changer de forme pour passer d'une forme discoïde à une forme aplatie avec des pseudopodes.(7-9) Les plaquettes contiennent plusieurs organelles : mitochondrie, lysosomes et différentes granules. Durant l'activation, les plaquettes relâchent une multitude de petites molécules, protéines et facteurs de croissance qui sont généralement emmagasinés dans leurs granules, soient les granules denses et les α -granules. Ces granules sont préformées dans les mégacaryocytes et continuent leur maturation dans les plaquettes.(10-12) Les plus larges et les plus abondants sont les α -granules qui contiennent des protéines d'adhésion, différents récepteurs membranaires (Glycoprotéine VI -GPVI- et α IIb β III), du fibrinogène, de la fibronectine, le facteur de von Willebrand et des facteurs de croissance comme le *platelet-derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF).(13, 14) Quant à elles, les granules denses contiennent des petites molécules solubles et qui sont souvent relâchées rapidement telles que l'ADP, la sérotonine, des cations comme le Ca^{2+} et le Mg^{2+} et une partie de la p-sélectine plaquettaire.(15, 16) Grâce à leur grande diversité protéomique, les plaquettes jouent un rôle primaire dans l'hémostase puisqu'en contact avec un vaisseau lésé, les plaquettes s'activent et déclenchent une rétroaction positive permettant le recrutement d'autres plaquettes au site de lésion, la relâche de différents facteurs importants de la coagulation et ainsi le colmatage de la brèche vasculaire. (17)

Fonction plaquettaire

Du point de vue plaquettaire, la formation d'un thrombus se divise en trois étapes distinctes. Au site de lésion, les plaquettes reconnaissent l'endothélium endommagé et y adhèrent grâce au facteur de von Willebrand (vWF) exposé qui se lie au complexe GPIb-IX-V sur la membrane plaquettaire.(18, 19) Cette étape est appelée l'adhésion. Après l'adhésion et via le récepteur GPVI, les plaquettes interagissent avec le collagène exposé au site de lésion induisant ainsi une activation plaquettaire.(17) Cette activation déclenche une cascade de

signalisation menant à la dégranulation et ainsi la sécrétion de plusieurs agonistes plaquettaires comme l'adénosine diphosphate (ADP) et la thromboxane A₂ (TxA₂), qui sont responsables de la voie secondaire de l'agrégation et l'amplification du signal.(20) Ces agonistes, une fois relâchés, vont agir de façon autocrine et paracrine en liant leurs récepteurs plaquettaires (P2Y et le récepteur à la thromboxane respectivement) afin d'induire une augmentation du calcium intraplaquettaire et ainsi la formation du complexe membranaire α IIb β 3 (gpIIb/IIIa).(20, 21) Ce récepteur va lier le fibrinogène disponible en circulation et va permettre aux plaquettes de se lier entre elles induisant ainsi la dernière étape qui est l'agrégation plaquettaire. Une fois le rouage de l'agrégation plaquettaire lancé, ces agrégats vont former un thrombus stable grâce à la conversion de fibrinogène en fibrine via l'activation de facteurs impliqués dans la coagulation.(18-21)

Récepteurs et signalisation plaquettaire

Les plaquettes jouent un rôle majeur dans l'hémostase, mais étant anucléées, elles ne peuvent pas synthétiser de nouvelles protéines en cas de lésion ou dommage vasculaire, c'est pour cela qu'elles naissent tout équipées des récepteurs et protéines nécessaires à la réponse hémostatique. Cette section aborde les récepteurs majeurs impliqués dans l'agrégation plaquettaire, leur signalisation et leur différents rôles dans l'hémostase et la thrombose.

1. Récepteurs couplés à la protéine G

1.1 Récepteurs de la thrombine

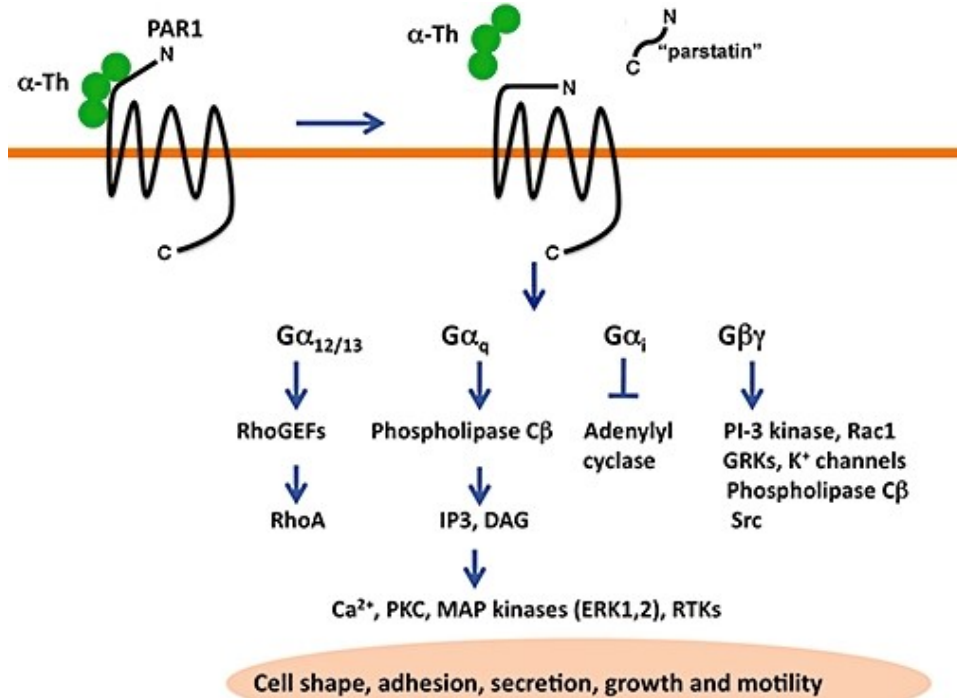


Figure 2. Clivage, activation et signalisation du récepteur PAR₁. La thrombine lie la queue N-terminal du récepteur et la clive pour générer une nouvelle queue N-terminal. L'activation du récepteur induit le couplage à différentes protéines G qui active différentes voies de signalisation. Repris avec la permission de (22), figure1. Publié par British Journal of Pharmacology et sous licence de John Wiley et Sons.

La thrombine est un agoniste important dans l'agrégation plaquettaire et le processus de coagulation de façon générale.(23) Les récepteurs à la thrombine sont des récepteurs couplés à la protéine G et ayant 7 domaines transmembranaires. Contrairement aux récepteurs classiques, ils ont un système d'activation particulier, d'où leur nom, les *Protease Activated Receptors* (PARs). PAR₁ et PAR₄ sont les principaux récepteurs à la thrombine retrouvés sur les plaquettes. Chez l'humain, le récepteur PAR₁ a une plus grande affinité à la thrombine que le PAR₄.(24) Au site d'une lésion vasculaire, les facteurs de coagulation entrent en contact avec le facteur tissulaire exprimé à la surface des cellules épithéliales. Ce dernier permettra l'activation du facteur Xa, qui à l'aide du facteur Va, induira la formation de la thrombine.(25) Étant une protéase, la thrombine se liera aux récepteurs PAR₁ et induit le clivage de leurs domaine N-terminal et ainsi l'exposition d'un nouveau domaine N-terminal qui agira comme agoniste du

récepteur PAR₁ (figure 2).(26) Cette activation induit un couplage à la protéine G_q et G_{12/13} principalement. La protéine G_q active la rhoGTPase RhoA qui mène à un changement de forme du cytosquelette des plaquettes. La protéine G_{12/13} induit la phosphorylation de la protéine kinase C (PKC), la génération d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérols (DAG) et ainsi une augmentation du calcium intracellulaire et une dégranulation permettant la relâche des médiateurs secondaires de l'agrégation. (27-29)

1.2 Récepteurs de l'ADP

L'ADP est l'un des agonistes primaires dans l'activation plaquettaire et un joueur majeur dans la rétroaction positive des plaquettes.(30) Pour exercer son rôle, l'ADP se lie à deux récepteurs couplés à la protéine G, soit le récepteur P2Y₁ et le récepteur P2Y₁₂. Quand même qu'ils font partie de la même famille des récepteurs purinergiques, les deux récepteurs sont couplés différemment et induisent des réponses plaquettaires indépendantes. (28) La liaison de l'ADP au récepteur P2Y₁₂ induit le couplage à la protéine G_{ai2} principalement qui bloque l'action de l'adénylate cyclase (AC) et ainsi la production de l'AMPc. Indépendamment de l'AMPc, l'activation du récepteur P2Y₁₂ active aussi la voie PI3K qui induit la phosphorylation de la protéine kinase B/Akt (PKB/Akt) et l'activation de la RhoGTPase Rap1. PKB/Akt est responsable de l'activation de l'intégrine α IIb β 3 et la RhoGTPase Rap1 contribue au maintien de cette activation. De son côté, le récepteur P2Y₁ est couplé à la protéine G_{aq} qui induit la phosphorylation de la PLC β et la cumulation de calcium intraplaquettaire qui mène à la relâche des granules plaquettaires (figure 3). Cette activation induit aussi un changement de forme du cytosquelette et une agrégation plaquettaire. (28, 29, 31, 32)

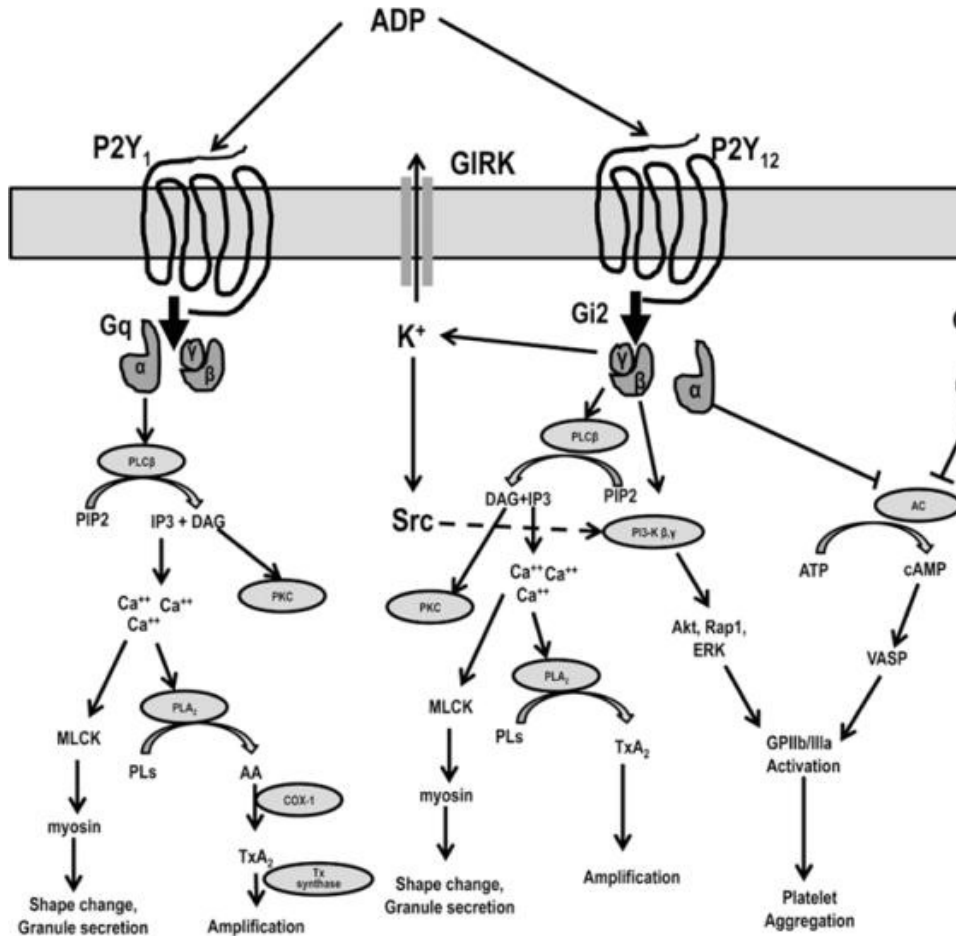


Figure 3. Schéma résumé de la signalisation des récepteurs de l'ADP, récepteurs couplés à la protéine G. Repris avec la permission de (31), figure 2. Publié par Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. Sous licence de Springer Nature.

1.3 Récepteur de la thromboxane A_2

Le TxA_2 est le résultat du métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase-1 COX-1 plaquettaire. Ce composé est relâché à la suite d'une activation plaquettaire et est considéré comme un des médiateurs de la voie secondaire de l'agrégation. Il est aussi rapidement dégradé quand il atteint le plasma (<1 minute).(33) Le récepteur au TxA_2 (TP) est un récepteur couplé à la protéine G (G_{aq} , G_{i2} et $G_{\alpha_{12/13}}$) qui induit l'activation de la RhoGTPase RhoA et les phospholipase A2 et C (PLA_2 et PLC).(34) Cette activation mène au réarrangement du cytosquelette plaquettaire ainsi que l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$. À noter que le récepteur du thromboxane fait aussi partie des récepteurs de la famille des prostaglandines puisque le thromboxane est un prostanoloïde dérivé de l'acide arachidonique. (35, 36)

1.4 Récepteurs de la famille des prostaglandines

Relâché par les cellules endothéliales, la prostacycline (PGI_2) se lie à son récepteur plaquettaire et maintient les plaquettes dans un état de repos. Le récepteur de la prostacycline est un récepteur couplé à la protéine G_s qui permet l'activation de l'adénylate cyclase (AC) et ainsi augmente la synthèse de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir d'ATP. L'AMPc joue un rôle inhibiteur dans les plaquettes en réduisant les concentrations intracellulaires du calcium. (28)

D'un côté, la prostaglandine (PGE_2) peut jouer un rôle de potentiateur d'activation plaquettaire en inhibant la production d'AMPc dans la réponse à l'ADP, mais elle peut aussi agir comme inhibiteur d'agrégation à plus grandes concentrations.(37, 38)

2. Les récepteurs à tyrosine kinase

2.1 GPVI et $FC\gamma R$

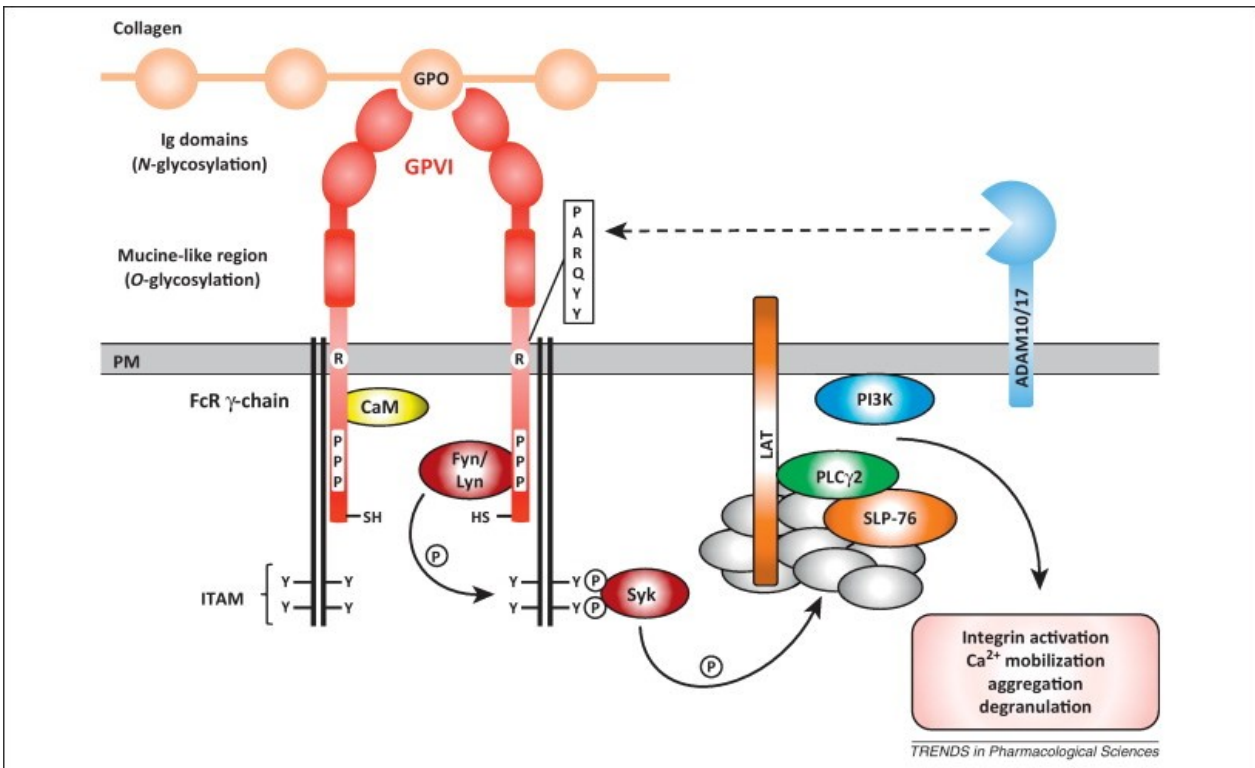


Figure 4. Signalisation du collagène via le récepteur GPVI et $FC\gamma R$. Sur les plaquettes. Repris avec permission de (39), figure 2. Publié par Trends in Pharmacological Sciences et sous licence de Elsevier 2019

Le récepteur GPVI est un récepteur de la famille des immunoglobulines. Il lie le collagène et est l'un des récepteurs les plus importants sur les plaquettes. Tout seul, le récepteur GPVI ne peut pas induire l'activation plaquettaire puisqu'il ne possède pas de domaine signalétique. Cependant, GPVI traduit le signal via un autre récepteur de la famille des immunoglobulines, le récepteur FC- γ R.(40) En se dimérisant au FC- γ R, GPVI induit la phosphorylation du domaine *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) de ce dernier via les kinases de la famille des Src (Fyn et Lyn). Cette phosphorylation induit la phosphorylation en aval de la kinase Syk et le déclenchement du signalosome du *linker for activation of T cells* (LAT).(40-42) Ce dernier active la phosphorylation de PLC et la voie PI3K/Akt.(42) Cette phosphorylation active à son tour le métabolisme du Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en IP3, la phosphorylation de la PKC et l'augmentation des concentrations intracellulaires du calcium. Cette cascade induira le changement de forme du cytosquelette plaquettaire, la dégranulation et l'activation de l'intégrine α IIb β 3 (figure 4). (43)

2.2 CLEC-2

CLEC-2 est un récepteur de la famille des C-type lectin et il est retrouvé sur les plaquettes, les mégacaryocytes et les cellules dendritiques. Il a été identifié suite à sa liaison à la rhodocytine, une protéine du venin de vipère, mais il peut aussi lier la podoplanine qui est une protéine surexprimée au site d'inflammation et dans plusieurs tumeurs.(44, 45) La signalisation de ce récepteur ne diffère pas beaucoup de celle du récepteur GPVI puisqu'il traduit le signal via le domaine ITAM du récepteur FC- γ R (figure 4).(46, 47)

2.3 P-selectine (CD62P)

La p-selectine (CD62P) est une sélectine du type *C-type lectin* faisant partie des protéines d'adhésion plaquettaires et qui est emmagasinée dans les granules plaquettaires. Après une activation et donc une dégranulation, les granules fusionnent avec la membrane plaquettaire et la p-selectine est exposée à la surface.(48) Le principal ligand de la p-selectine est le *p-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1), mais la p-selectine peut lier d'autres glycanes sur d'autres cellules permettant le renforcement de l'adhésion plaquettaire.(48, 49)

2.4 Récepteur de la thrombopoïétine (c-mpl)

Le récepteur c-mpl (ou CD110) est un récepteur classique à tyrosine kinase. Son ligand primaire est la TPO et il est présent sur plusieurs cellules hématopoïétiques dont les plaquettes et les mégacaryocytes. Dans les mégacaryocytes, la TPO joue un rôle dans la maturation et le développement des mégacaryocytes ainsi que la production des plaquettes. Dans les plaquettes, le c-mpl participe à l'internalisation de TPO et à sa dégradation, régulant ainsi la biodisponibilité de TPO circulant et ainsi la production de nouvelles plaquettes par les mégacaryocytes. (50, 51)

2.5 Récepteurs de la protéine GAS6

Les récepteurs de la protéine *Growth arrest specific 6* (Gas6) (Axl, Sky et Mer) ont été rapportés dans les plaquettes humaines et de souris.(52) Ce sont des récepteurs à tyrosine kinase classique donc une déficience ou une inhibition abolit la réponse plaquettaire à l'ADP, le collagène et la thrombine. Chez la souris, la déficience en ces récepteurs protège contre la thrombose sans augmentation du risque d'hémorragie.(53) Ces récepteurs semblent aussi être impliqués dans la stabilisation du thrombus, mais le mécanisme et la signalisation impliqués sont encore méconnus.(54)

2.6 Autres protéines membranaires

CD36:

CD36 (aussi appelé GPIV ou GPIIb) est une glycoprotéine faisant partie de la famille des récepteurs scavenger et qui est impliqué dans l'athérosclérose en régulant certains processus inflammatoires, la signalisation des lipoprotéines et l'angiogenèse.(55) Il est présent sur plusieurs types cellulaires dont les plaquettes. Une déficience a été rapportée chez 4 à 7% de personnes issues de populations asiatique et africaine.(56, 57) Cependant, le phénotype plaquettaire semble in affecté par cette déficience et le rôle de ce récepteur dans les plaquettes demeure controversé. Le collagène, la thrombospondine, certains pathogènes et les LDL oxydés sont connus pour lier ce récepteur et induire une activation plaquettaire.(58, 59)

3. Intégrines

3.1 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$:

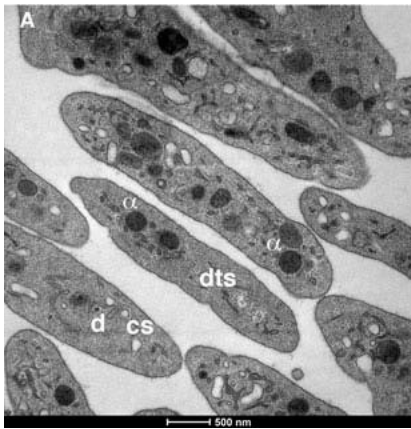
L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est la seule intégrine unique aux plaquettes. Comme toutes les intégrines, c'est une molécule d'adhésion et dans le cas des plaquettes, elle est responsable des interactions plaquettaires en hémostase. Sa structure est similaire à celles des autres intégrines connues puisqu'elle est formée de deux unités : αIIb et β3 . (60) Cette intégrine peut lier plusieurs ligands tels que le fibrinogène, la thrombospondine-1 et vWF. (61) Au site de lésion, la matrice des cellules endothéliales, contenant le collagène et le facteur de von Willebrand, est exposée. (20) Le collagène active le récepteur GPVI induisant la phosphorylation de PLC et l'augmentation du calcium intracellulaire. Cette signalisation conduit à l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et la relâche d'autres médiateurs de l'agrégation tels que le TxA_2 et l'ADP. (43) En parallèle, le vWF et le fibrinogène activent aussi l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ permettant l'interaction avec d'autres plaquettes en circulation et ainsi l'agrégation plaquettaire. (62)

3.2 $\alpha\text{2}\beta\text{1}$:

L'intégrine $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ est une autre intégrine exprimée dans les plaquettes, mais aussi d'autres types cellulaires. Contrairement à l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, le complexe $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ lie principalement le collagène exposé au site d'une lésion vasculaire. (63) Cette intégrine est le premier récepteur du collagène à être identifié dans les plaquettes. (64) GPVI est arrivé plus tard et a eu plus d'attention dans l'activation plaquettaire que l'intégrine $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ puisque une déficience de cette dernière ne semblait pas abolir la réponse plaquettaire au collagène. (65) Son rôle dans l'agrégation plaquettaire induite par le collagène a été longuement débattue et c'est Jung et al. qui ont démontré que son rôle varie selon le type de collagène impliqué dans l'activation. (66) Comme pour le GPVI, l'intégrine $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ stimule la phosphorylation de plusieurs protéines propres comme les Src, Syk et éventuellement PLC γ2 . Cette activation va induire le changement de forme des plaquettes et la stabilité du thrombus. (67)

Sécrétion plaquettaire

La sécrétion plaquettaire est une fonction plaquettaire importante. En effet, après leur activation, les plaquettes relâchent toute sorte d'ions, nucléotides, facteurs de coagulations, différentes protéines, enzymes et cytokines qui jouent un rôle primordial dans l'hémostase, mais aussi dans l'inflammation, la thrombose, l'angiogenèse et d'autres fonctions biologiques de



base. Cette relâche se fait via différentes organelles : α -granules, granules denses et lysosomes (figure 5). Ces organelles ont été découvertes dans les années 1950 grâce au développement de la microscopie électronique. (68, 69) Cette section couvre les différents mécanismes de sécrétion plaquettaire ainsi que le contenu sécrété.

Figure 5. Image de microscopie électronique de plaquettes humaines fixées. Les α -granules sont indiquées par un α et les granules denses par un d. Échelle de 500nm.

1. α -granules

Les α -granules ont été rapportées pour la première fois en 1950, découverte coïncidant avec le développement de la microscopie électronique. Ce sont les granules les plus abondantes dans les plaquettes. On retrouve environ 50 à 80 α -granules par plaquette avec une taille variant entre 200 et 500nm. Structurellement, les α -granules possèdent une membrane, un centre composé de cytokines et de protéoglycanes ainsi qu'une zone riche en facteur de von Willebrand. (15, 70) Similaire à une cellule, les α -granules possèdent une pompe ATPase qui leur permet de maintenir un gradient électrochimique adéquat. (71) Similairement aux granules denses, les α -granules contiennent aussi un réservoir important de cations de calcium et de magnésium. (72) Cependant et contrairement aux granules denses, les α -granules sont connues pour leur contenu riche en protéines. En effet, jusqu'à 300 protéines ont été rapportées dans les α -granules plaquettaire (tableau 1). (73) Ces protéines sont impliquées dans un large spectre de fonctions biologiques dont l'inflammation, l'angiogenèse, la coagulation et l'hémostase. (74-76) Plusieurs de ces protéines sont primordiales à la fonction plaquettaire comme la p-sélectine et l'intégrine α IIb β 3 ou encore, le récepteur du collagène GPVI qui sont toutes des protéines

membranaires nécessaires à l'activation plaquettaire.(20) Les protéines d'adhésion comme le fibrinogène ou la thrombospondine sont un autre exemple important. Dans le cargo des protéines à fonction angiogénique par exemple, on peut retrouver des facteurs proangiogéniques comme le VEGF et le PDGF tout comme des facteurs antiangiogéniques dont le *platelet factor 4* (PF4) et l'endostatine.(77) Au niveau des protéines de coagulation, on peut retrouver le facteur V et le fibrinogène qui sont procoagulants et la protéine S et l'antithrombine qui sont anticoagulantes. Il va de même pour l'inflammation et la réponse immunitaire.(76) Cette variabilité et opposition au niveau du contenu des α -granules soulève une question, dont la réponse est encore débattue aujourd'hui; est-ce que ces protéines sont emmagasinées dans les mêmes α -granules? Et existe-t-il un mécanisme de relâche différentielle? Plusieurs ont tenté de répondre à cette question. Un groupe de recherche rapporte que les protéines sont empaquetées par fonction dans les mêmes α -granules et relâchées par des mécanismes différents.(78) Cependant, la majorité des hypothèses convergent vers la même idée; les différents sous-groupes protéiques sont emmagasinés dans des α -granules différentes et qui sont sécrétées différemment selon le stimulus et la voie d'activation plaquettaire.(38)

Type	Exemples
Protéines d'adhésion	Fibrinogène, von Willebrand, thrombospondine
Cytokines	CXCL1 (GRO- α), CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (PBP, β -TG, CTAP-III, NAP-2), CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-1 α), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α) et CCL5 (RANTES)
Agents coagulants, anticoagulants et protéines fibrinolytiques	Facteur V, facteur IX, facteur XIII, antithrombine, protéine S, inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, plasminogène, activateur inhibiteur 1 du plasminogène et α_2 -macroglobuline
Facteurs de croissance	Vascular endothelium growth factor, platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor, transforming growth factor β , brain-derived neutrophilic factor
Médiateurs de la réponse immunitaire	Complement C3 precursor, complement C4 precursor, β 1H Globulin, factor D, factor H, C1 inhibitor, IgG
Protéines membranaires	α Ib β 3, GPIb α -IX-V, GPVI, TLT-1, P-selectin
Protéines antimicrobiales	thymosin- β 4, thrombocidins 1 et 2

Tableau I. Tableau résumé du contenu des α -granules. Repris, adapté et traduit avec permission de (13), tableau I. Publié Par Platelets et sous licence de Taylor & Francis.

2. Granules denses

Les granules denses sont le deuxième moyen de sécrétion plaquettaire. Elles ont été rapportées pour la première fois en 1968 dans les plaquettes de lapins et d'humains.(79, 80) À cette époque, la microscopie électronique était la nouvelle technologie faisant fureur et vu leur nature particulière, ces granules étaient rapportés comme des corps denses et sombres puisqu'elles apparaissaient noires sur les images. (79, 80) Ces granules sont moins nombreuses que les α -granules avec une moyenne de 3 à 8 granules denses par plaquette. Elles sont aussi plus petites avec un diamètre d'environ 150nm.(13, 15) La nature de leur contenu est très différente des α -granules (anions, cations et nucléotides). En effet, les granules denses sont extrêmement riches en cations de calcium, de magnésium et de potassium.(81) Elles possèdent des pompes à protons qui permettent de maintenir un gradient électrochimiques.(82) Les granules denses plaquettaires contiennent aussi un des médiateurs les plus importants de l'agrégation, soit l'ADP. En dehors de l'ADP, ces granules emmagasinent aussi plusieurs anions et nucléotides comme l'ATP. Il est aussi important de souligner que les plaquettes sont un grand réservoir de sérotonine et d'histamine qui sont souvent internalisées de la circulation et emmagasinés dans les granules denses(83, 84). D'autres molécules membranaires ont été rapportées dans les granules denses plaquettaires dont la p-sélectine et CD63.(85)

3. Lysosomes

Les lysosomes sont le dernier moyen de sécrétion plaquettaire. On peut retrouver jusqu'à 3 lysosomes par plaquettes et ils ont une taille d'environ 250nm. Ce sont les organelles plaquettaires les moins étudiés. Comme leur noms l'indique, ces structures enferment différentes enzymes responsables de la dégradation des protéines et des lipides. Leur rôle est encore mal compris. (86)

4. Mécanismes de sécrétion granulaires :

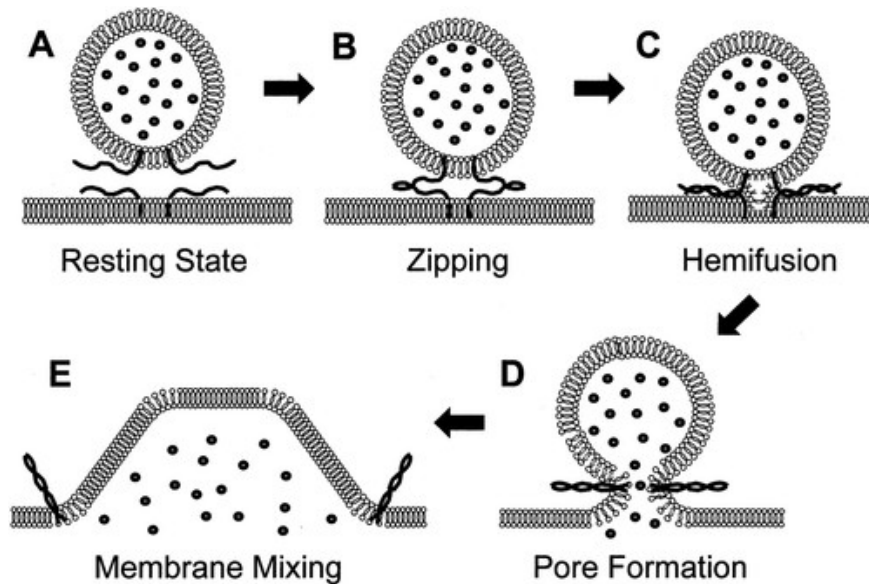


Figure 6. Schéma illustrant les étapes de sécrétion granulaire. Repris avec permission de (87), figure 1. Publié par le journal *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* et sous licence de Wolters Kluwer Health, Inc.

La sécrétion granulaire se fait via la fusion de la membrane des granules et la membrane plaquettaire. Une fusion de deux membranes est souvent un processus complexe qui nécessite énormément d'énergie afin de surmonter la tension membranaire causée par le rapprochement de deux surfaces lipidiques et la répulsion hydrique, d'où la nécessité de plusieurs protéines pour faciliter la fusion.(88) Les premières protéines nécessaires sont les *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptors* (SNAREs), des protéines retrouvées sur les membranes des granules et des cellules. Leur structure est assez particulière puisqu'elles sont composées d'un motif unique facilitant l'interaction avec d'autres SNAREs et la formation d'un complexe qui permet le rapprochement des membranes granulaires et cellulaires avec moins de tension et de répulsion hydrique (figure 6).(87)

Dans les plaquettes, les SNAREs les plus abondants sont les *Vesicular Associated Membrane Proteins* (VAMPs) sur la membrane des granules et les syntaxines et les *Soluble NSF Attachment Protein* (SNAPs) sur les membranes plaquettaires.(89)

Les SNAREs plaquettaires nécessitent à leur tour des protéines pour réguler leur fonction. Par exemple, les syntaxines sont régulées par les *syntaxin binding proteins* (STXBPs) et les SNAPs sont régulées par une *N-ethylmaleimide sensitive fusion protein* (NSF) qui est une

pompe ATPase de magnésium.(90, 91) Parmi les protéines régulatrices des SNAREs, on retrouve aussi un membre de la famille des GTPase Ras, soit la protéine Rab. D'ailleurs, chez les souris avec une mutation de la protéine Rab, la synthèse et la sécrétion des α -granules et des granules denses est altérée. (92)

Finalement, le cytosquelette plaquettaire est un autre acteur important dans la fusion et la relâche granulaire. En effet, une inhibition du réarrangement des fibrines d'actine du cytosquelette inhibe la relâche des α -granules et des granules denses. Plusieurs groupes ont confirmé l'interaction des SNAREs avec le cytosquelette d'actine et que le réseau d'actine des plaquettes activées facilite la relâche granulaire.(93, 94)

5. Sécrotome inflammatoire et angiogénique plaquettaire

Comme mentionné plus-haut, les plaquettes agrègent très rapidement après une activation par différents agents et procèdent à relâcher le contenu granulaire. Elles sont donc bien placées pour intervenir dans une réponse inflammatoire et angiogénique.

Pour l'aspect inflammatoire, dans les α -granules, les plaquettes emmagasinent le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I qui est responsable de la reconnaissance de l'antigène, des chimiokines comme PF4 et Interleukine-8 (IL-8) et des cytokines comme Interleukine-1 β (IL-1 β) (tableau 1). (95) Ces médiateurs de l'inflammation sont relâchés et peuvent aller agir au site d'inflammation, recruter des neutrophiles et les activer grâce au PF4.(96) Les chimiokines *Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted* (RANTES) et *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) sont aussi des agents inflammatoires retrouvés dans les plaquettes (tableau.1). Ces derniers agissent de façon autocrine et paracrine en activant les plaquettes et d'autres cellules inflammatoires dont les neutrophiles et monocytes.(97-99) Semple et al. ont publié une revue extensive sur les plaquettes et leur rôle dans l'immunité.(100)

Le rôle que les plaquettes jouent dans l'angiogenèse est bien étudié. Avec leur contenu riche en VEGF, PDGF, *Fibroblast growth factor* (FGF), *Epidermal growth factor* (EGF), angiopoïétine et d'autres facteurs, les plaquettes participent activement à la migration et la prolifération des cellules endothéliales.(75) En plus de leur rôle proangiogénique, les plaquettes relâchent aussi l'endostatine, le PF4 et l'angiostatine qui sont des inhibiteurs connus de l'angiogenèse.(101)

Il est donc de plus en plus reconnu que les plaquettes ont une importance significative qui va bien au-delà de la thrombose et l'hémostase et que leur implication dans l'inflammation et l'angiogenèse est de plus en plus étudiée.

Cibles antiplaquettaires

1. Aspirine

L'action de l'aspirine sur les plaquettes n'a été comprise qu'à la suite de la découverte du thromboxane et ses voies de synthèse. Grâce à la COX-1 (aussi appelé PGH-synthase), la prostaglandine H₂ (PGH₂) est convertie en plusieurs dérivés dont la thromboxane A₂ qui induit l'agrégation plaquettaire. L'aspirine agit en se liant au site catalytique de la COX-1 et inhibe la synthèse de la TXA₂.(102, 103) L'aspirine agit aussi sur la synthèse de la PGI₂ par les cellules endothéliales, mais les doses thérapeutiques utilisées en cardiologie moderne ne sont pas suffisantes pour affecter significativement cette dernière.(104)

Administrée oralement, l'aspirine atteint des concentrations maximales plasmatiques au bout de 30 minutes et l'inhibition plaquettaire est maximale après 1h. Le temps de demi-vie de cette dernière est d'environ 20 minutes. (105, 106)

2. Inhibiteurs de la voie de l'ADP

Comme mentionné précédemment, l'ADP joue un rôle primordial dans la fonction plaquettaire et la formation d'un thrombus. Étant donné que le récepteur P2Y₁₂ est le récepteur primaire de l'ADP, il constitue une cible thérapeutique intéressante. En effet, les traitements inhibiteurs de la voie de l'ADP sont tous des inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂. La première famille de molécules développées sont les thiénoxydines. Le premier traitement inhibiteur du récepteur P2Y₁₂, Ticlopidine a été commercialisé en 1978 suivi par le clopidogrel 20 ans plus tard. Les deux molécules sont des prodrogues inactives qui subissent un métabolisme par plusieurs cytochromes (principalement CYP2C19) pour devenir actives.(107-109) Le prasugrel, une thiénoxydine de troisième génération, arrive en 2009 avec un métabolisme plus rapide et ainsi, un effet maximal atteint plus rapidement.(108, 110, 111) Ces molécules sont sélectives au récepteur P2Y₁₂ et inhibent de façon irréversible la réponse plaquettaire à l'ADP. Étant une inhibition irréversible, l'effet du traitement peut durer jusqu'à 10 jours, ce qui correspond à la durée de vie des plaquettes. L'irréversibilité et la grande variabilité de cette inhibition

plaquettaire (due à la variance génétique du métabolisme) rendent l'utilisation des thiényopyridines délicate.(112-114) En effet, un métabolisme réduit et un temps de début d'action lent augmentent le risque de thrombose chez les patients traités, tandis qu'à l'opposé leur action permanente sur la plaquette augmente le risque de saignement, particulièrement chez les sujets devant subir une chirurgie. Pour répondre à ce besoin, la famille des cyclopentyl-triazolo-pyrimidines a vu le jour et en 2009, ticagrelor a été approuvé comme inhibiteur direct et réversible du récepteur P2Y₁₂.(115) N'ayant pas besoin d'être métabolisé au préalable, la biodisponibilité du médicament est fortement augmentée, son temps de début d'action est très rapide et les variabilités génétiques du métabolisme hépatique n'affectent pas la réponse. De plus, le ticagrelor lie le récepteur P2Y₁₂ de façon réversible. Cependant, son temps de clairance du plasma est assez long et est similaire aux thiényopyridines augmentant ainsi le risque d'hémorragie chez les patients traités qui subissent une chirurgie. Pour contrecarrer ce dernier effet, le cangrelor a été développé. Celui-ci ne nécessite aucun métabolisme et a un temps de demi-vie de 3-6 minutes. Malheureusement, ce dernier est seulement administré par injection intraveineuse et n'est pas disponible au Canada.(112)

En résumé, les traitements ciblant le récepteur P2Y₁₂ sont tous assez efficaces, mais possèdent quelques inconvénients dont l'augmentation du risque d'hémorragie chez les patients, surtout ceux subissant une chirurgie.

3. Inhibiteur de la voie de la thrombine

Comme mentionné plus-haut, la thrombine agit sur deux récepteurs : PAR₁ et PAR₄. Cependant, l'affinité de la thrombine au récepteur PAR₁ est beaucoup plus grande faisant de ce dernier une cible idéale pour un traitement antiplaquettaire. Le plus commun est le vorapaxar qui est un antagoniste compétitif du récepteur PAR₁ et qui n'a pas démontré une efficacité supérieure aux traitements actuels, mais qui peut être utilisé en deuxième ligne de traitements antithrombotiques.(116, 117) Malgré son bénéfice clinique apparent, le vorapaxar augmente le risque de saignement chez les patients et étant donné qu'il est souvent utilisé en ajout de traitement avec l'aspirine et/ou un inhibiteur de P2Y₁₂, le risque de saignement est dangereusement augmenté.(118) Du coup, l'inhibition de la voie de la thrombine ne semble pas être une cible populaire dans les traitements antiplaquettaires.

4. Inhibiteur de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

En 1994, le premier inhibiteur de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ a été approuvé. Il s'agit de l'abciximab, un anticorps monoclonal, qui se lie irréversiblement à sa cible empêchant ainsi l'interaction entre les plaquettes et par conséquent l'agrégation plaquettaire.(119) Il possède une demi-vie biologique pouvant aller jusqu'à 48h et sa clairance se fait via le système réticulo-endothélial, un avantage pour les patients avec insuffisance rénale.(120) Étant donné sa liaison irréversible, le risque de saignement est assez marqué, toutefois, il n'existe pas d'antidote pour l'abciximab.(121) Comme pour la majorité des traitements biologiques et biosimilaires, le risque de développer une hypersensibilité et même une anaphylaxie n'est pas moindre. Pour combler ce besoin, l'eptifibatide a été approuvé en 1998. Il s'agit d'une petite molécule qui se lie de façon compétitive et réversible à l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Le risque de saignement est toujours présent, néanmoins il demeure moindre que celui de l'abciximab. Contrairement à ce dernier, l'utilisation de l'eptifibatide est déconseillée chez les patients atteints d'insuffisance rénale étant donné que sa clairance se fait par voie rénale. (122)

Les traitements antiplaquettaires inhibant l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sont tous administrés par injection intraveineuse ce qui augmente considérablement le risque de saignement. Bien que le développement de traitements oraux ait été tenté, ces molécules ont échoué en phases cliniques de développement. L'utilisation d'inhibiteurs de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est par conséquent limitée aux situations intra-hospitalières d'urgence péri-syndrome coronarien aigu. (120)

5. Inhibiteur du GPVI

Pour l'instant, il n'existe pas de traitements approuvés inhibant le récepteur GPVI étant donné son implication, non seulement, dans l'agrégation plaquettaire mais aussi dans l'inflammation et la réponse immunitaires aux infections qui est encore mal comprise. Actuellement, il existe un traitement en phase II de développement inhibant l'agrégation plaquettaire par GPVI. Il s'agit d'une protéine de fusion GPVI-Fc, Revacept. Cette molécule possède deux domaines extracellulaires GPVI qui vont aller bloquer les sites de liaison GPVI disponibles.(123) ACT017 est un autre antagoniste du récepteur GPVI qui vient de passer la phase clinique I avec succès. (124) Il s'agit d'un fragment fab humanisé qui s'est avéré efficace

dans l'inhibition de l'agrégation induite par le collagène.(125) De plus, il ne semble pas augmenter le saignement. (124)

6. Inhibiteurs de tyrosine kinases

Souvent utilisés pour les thérapies anticancer, les inhibiteurs de tyrosine kinases (TKIs) bloquent le site de liaison avec l'ATP. Naturellement, plusieurs inhibiteurs de kinases ont été testés pour leur effet antiplaquettaire puisque l'activité plaquettaire dépend grandement des tyrosine kinases. Une des molécules testée pour son effet antiplaquettaire est le Dasatanib.(126) Quand même qu'elle soit efficace, cette dernière cause une thrombocytopenie, une inhibition de la sécrétion granulaire et de l'agrégation et une augmentation du risque de saignement.(127) Si on prend en compte le fait que les antiplaquettaires sont souvent prescrits en bithérapie, le risque d'hémorragie serait considérablement augmentée et difficilement gérable.

Ainsi, la majorité des TKIs ne sont pas des cibles attrayantes puisque leurs effets *off target* sont inévitables. (127)

En résumé, les plaquettes sont des cellules anucléées dérivées des mégacaryocytes. Elles sont dynamiques et riches en protéines et facteurs de croissance. Leur rôle majeur est la régulation de l'hémostase et la thrombose. Au site de lésion, elles adhèrent à l'endothélium exposé et déclenchent une cascade d'évènements permettant la réparation de la lésion. De plus, elles sont impliquées dans plusieurs processus biologiques majeurs, notamment l'inflammation et l'angiogenèse. Étant donné leurs différentes voies d'activation et leur large spectre de fonctions, elles sont la cible de nombreux médicaments.

Chapitre 2: Brain-Derived Neurotrophic Factor

Synthèse du BDNF

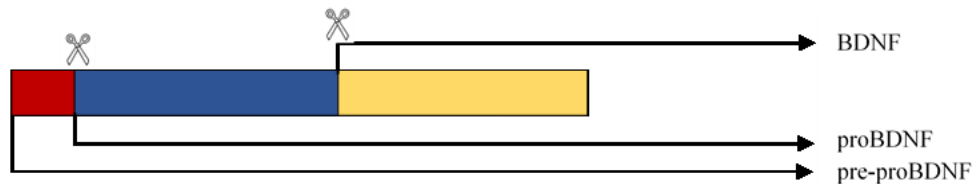
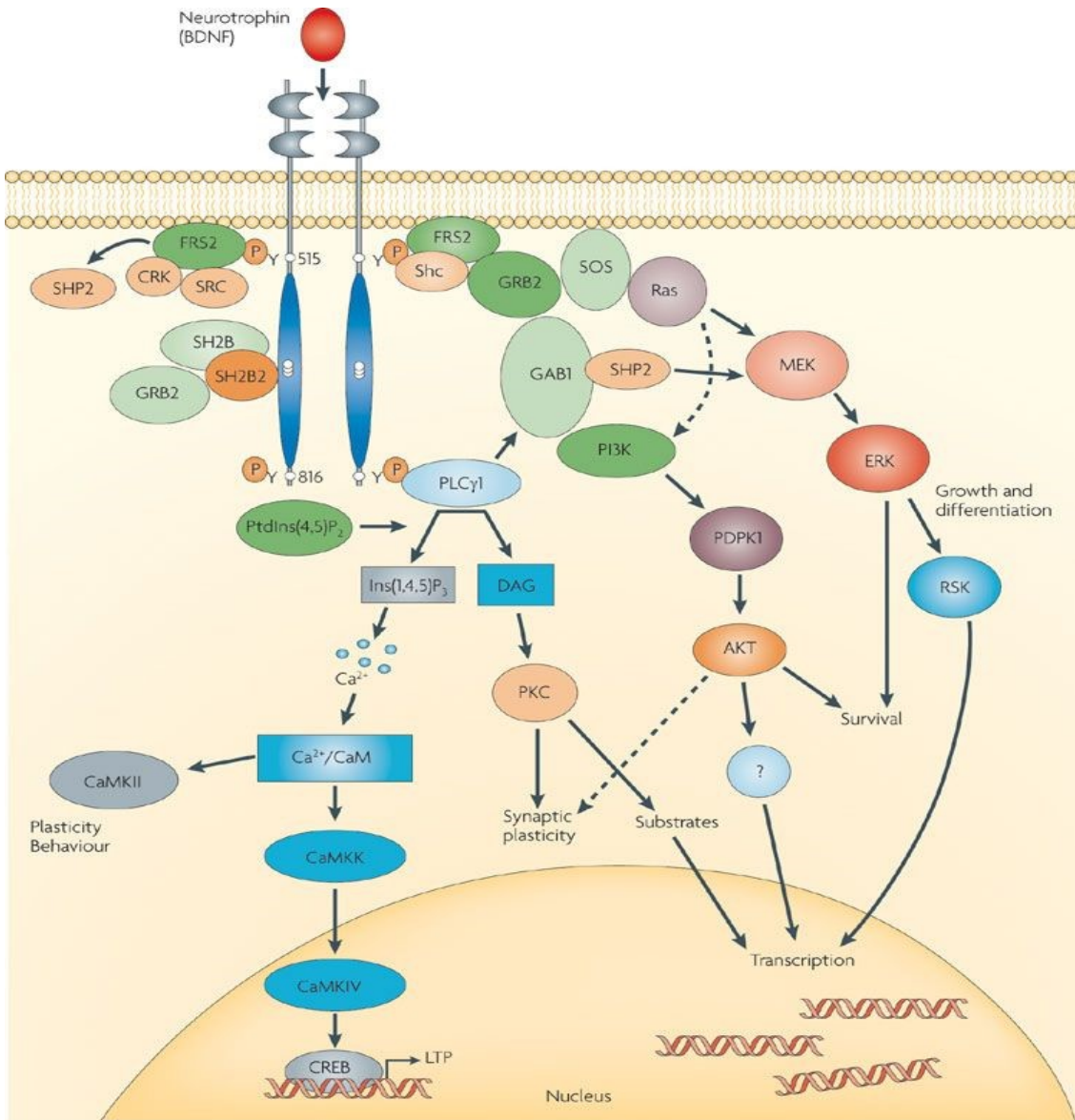


Figure 7. Schéma du clivage des protéines précurseurs du BDNF.

Le *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) est un facteur de croissance faisant partie de la famille des neurotrophines et qui a été purifié en 1982 par Yves Alain Barde.(128) Structuellement, le BDNF possède 50% d'homologie avec les autres neurotrophines existantes (NGF, NT-3 et NT-4/5).(129) Le gène du BDNF est retrouvé sur le chromosome 11 et contient 4 exons 5'UTR ainsi qu'un exon 3'UTR.(130) Le BDNF est d'abord traduit sous forme de pré-proBDNF. Il s'agit d'une protéine précurseur dont la préséquence est clivée dans le réticulum endoplasmique pour donner du proBDNF (27kDa-37kDa). Dans le réseau transgolgien, le proBDNF subit un clivage à son site N-terminal par la furine et les PC1/7. Il en résulte la protéine mature du BDNF avec un poids moléculaire de 14kDa, souvent sous forme de dimère (27kDa). Dans les neurones, le BDNF et le proBDNF sont emmagasinés dans les vésicules à noyau dense et sont relâchés via les compartiments dendritiques et axonaux. (131) Dans le système nerveux central, BDNF est exprimé dans différents neurones, les astrocytes, différentes cellules gliales et les cellules endothéliales vasculaires. Les niveaux de BDNF les plus élevés sont retrouvés au niveau du cortex cérébral et l'hippocampe. Le BDNF exerce un effet autocrine/paracrine via son récepteur spécifique le *Tropomyosin-related kinase B* (TrkB) ainsi que le récepteur de la famille des récepteurs *Tumor Necrosis Factor* (TNF), p75^{NTR}. De façon générale, BDNF joue un rôle dans la survie neuronale, la plasticité synaptique et la mémoire. (132)

Rôle et récepteurs du BDNF dans le système nerveux central

1. TrkB dans le système nerveux central



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 8. Signalisation du récepteur TrkB dans les neurones. BDNF active plusieurs voies de signalisation qui mènent à la promotion de la survie cellulaire et la plasticité synaptique. Repris avec permission de (133), figure 1. Publié par Nature Reviews Neuroscience et sous licence de Springer Nature.

Le récepteur TrkB fait partie de la famille des récepteurs Trk. Structuellement, les récepteurs Trk possèdent la même organisation de leurs domaines. En effet, la partie

extracellulaire des récepteurs Trk possède 5 régions : 1 domaine riche en leucines, deux domaines riches en cystéines et deux domaines *immunoglobulin-like C2* (Ig-like C2). Généralement le dernier domaine Ig-like C2 est le domaine de liaison d'agonistes. Les récepteurs Trk possèdent une région transmembranaire similaire et partagent une grande homologie au niveau de leur domaine kinase intracellulaire. (134) Pour le TrkB, il existe plusieurs isoformes : TrkB.F1, forme complète du récepteur, et TrkB.T1 et TrkB.Shc qui sont des formes tronquées dépourvues du domaine tyrosine kinase signalétique.(135)

Le récepteur TrkB a une grande affinité pour le BDNF et une faible affinité pour la neurotrophine NT-4/5. Comme mentionné précédemment, BDNF est présent sous forme de dimère dans le système nerveux central. En liant la forme complète du récepteur (TrkB.F1), BDNF induit la dimérisation de ce dernier. Les récepteurs dimérisés s'autophosphorylent via leurs domaines kinases permettant le recrutement et la phosphorylation des protéines Shc et PLC γ .(136, 137) Une des voies de signalisation activées par Shc est la voie PI3K/Akt qui mène à l'activation de plusieurs facteurs de transcription. Toujours via Shc, la voie MAPK est activée aussi.(138, 139) En effet, l'activation de rhoGTPase Ras permet la phosphorylation de la kinase MEK qui phosphoryle à son tour Erk induisant ainsi la survie, la croissance et la différenciation neuronale.(133, 140) Via PLC γ , il y a génération d'Ins(1,4,5)P et de DAG. D'un côté, Ins(1,4,5)P promeut la génération de calcium et l'activation de la voie de la calmoduline qui régule la plasticité synaptique.(133, 140, 141) D'un autre, DAG phosphoryle les PKC qui régulent aussi la plasticité synaptique.(142) Pour la forme tronquée trk.T1, les voies de signalisation activées ne sont pas claires. Dans les astrocytes, trkB.T1 active la rhoGTPase RhoA et induit la génération de calcium intracellulaire responsable du réarrangement du cytosquelette cellulaire.(143) Même si la signalisation des récepteurs tronqués est mal étudiée, leurs rôles le sont moins. En fait, ces récepteurs sont souvent considérés comme des récepteurs dominants négatifs qui peuvent soit séquestrer le BDNF ou réguler la liaison BDNF/TrkB.F1 en dimérisant avec le TrkB.F1 pour induire son internalisation.(144, 145)

Le rôle du complexe BDNF/TrkB a été étudié extensivement et dans plusieurs types cellulaires.(145) Dans le réseau neuronal, BDNF peut réguler autant le signal présynaptique que postsynaptique dépendamment de la localisation du récepteur TrkB (sur les terminaisons axonales ou dendritiques).(146) Il joue aussi un rôle dans la transmission synaptique via les

récepteurs ionotropiques du glutamate, d'où son rôle dans la plasticité synaptique.(147) D'ailleurs, durant une ischémie, BDNF protège les neurones de la cytotoxicité glutamique en activant les cellules gliales.(147, 148) Ce complexe peut aussi affecter la mémoire et l'apprentissage en régulant les processus de base.(148-150) Ce n'est donc pas une coïncidence que les niveaux de BDNF sont plus élevés dans l'hippocampe puisque c'est le centre de la mémoire et l'apprentissage.(151) Dans la même optique, les gens affectés avec le polymorphisme du Val66Met du BDNF (polymorphisme d'un seul nucléotide) ont une mémoire à court-terme altérée.(152, 153) Pour les patients atteints d'Alzheimer ayant ce polymorphisme, la vitesse de perte de mémoire et l'accumulation de la protéine tau sont augmentés ce qui laisse penser que BDNF joue un rôle protecteur dans l'Alzheimer.(154) Toujours au niveau cérébral, le polymorphisme Val66Met augmente le risque des troubles psychologiques et des modèles animaux ont démontré que les traitements antidépresseurs augmentent les taux de BDNF et de son récepteur le TrkB dans l'hippocampe.(155, 156) En cohérence avec ces faits, des niveaux réduits de BDNF et de TrkB ont été retrouvés dans les cerveaux post mortem de victimes de suicide.(157, 158) Ces études consolident l'idée que BDNF et son récepteur sont impliqués dans le développement de la dépression et les effets des antidépresseurs.(159)

Au niveau vasculaire et via sa voie PI3K/Akt, BDNF/TrkB protège contre les dommages ischémiques en activant la voie de survie cellulaire. Dans le cas d'un stress oxydatif, les cellules endothéliales de la microvasculature augmentent la sécrétion du BDNF, fait supporté par des modèles animaux suggérant que BDNF protège contre l'hypoxie au niveau du système nerveux central.(160, 161) Toujours dans les cellules endothéliales de la microvasculature, BDNF protège contre l'apoptose cellulaire induite par les cytokines inflammatoires comme le TNF- α et pourrait même protéger contre l'inflammation en augmentant la relâche d'agents antiinflammatoires comme l'interleukine-10.(162, 163) Quand bien même son rôle neuroprotecteur, le BDNF est aussi impliqué dans l'épilepsie puisqu'il a un effet excitateur sur les neurones. En effet, chez les humains et dans des modèles animaux, des niveaux élevés du BDNF et son récepteur sont retrouvés au niveau du lobe temporal et l'inhibition de ses voies de signalisation réduit la survenue des épilepsies.(164, 165)

2. p75^{NTR} dans le système nerveux central

Faisant partie de la famille des *Tumor Necrosis Factor Receptors*, le p75^{NTR} est le premier récepteur à neurotrophines découvert.(166) Structurellement, il possède une forte homologie avec les récepteurs de la même famille en ayant une organisation de motifs similaires. Il possède 4 motifs riches en cystéines, un domaine transmembranaire et domaine cytoplasmique contenant un domaine de mort.(167, 168) Contrairement au TrkB, p75^{NTR} n'est pas spécifique à une neurotrophine en particulier puisqu'il lie toutes les neurotrophines.(169) Dans le cas du BDNF, p75^{NTR} peut mener à la survie cellulaire. En formant un hétérodimère avec le TrkB, p75^{NTR} induit l'activation de TRAF6 qui permet l'activation de la voie IKK- β et NF- κ B et éventuellement, la survie cellulaire. En formant un complexe avec la sortiline pour lier le proBDNF, p75^{NTR} recrute encore une fois TRAF6 qui active la rhoGTPase Cdc42, la voie JNK/c-jun et p53 pour induire l'apoptose cellulaire.(170, 171) Le rôle du complexe BDNF/p75^{NTR} est peu étudié puisque ce n'est pas une voie primaire dans la signalisation du BDNF ni celle du p75^{NTR}.

3. Récepteurs du BDNF et son rôle dans le système cardiovasculaire

En dehors de son rôle dans le système nerveux central, BDNF joue un rôle dans le système cardiovasculaire en développement, mais aussi le système cardiovasculaire adulte et pathologique. Dans l'infarctus du myocarde, les niveaux d'expression de BDNF et de TrkB post-infarctus sont augmentés et un traitement de BDNF réduit significativement la taille de la région atteinte et améliore la fonction cardiaque chez les souris. De plus, BDNF inhibe l'apoptose des cardiomyocytes en réduisant l'activité des caspases (Cas3) et similairement au cerveau, BDNF augmente considérablement la survie des myocytes en cas d'hypoxie.(172) D'ailleurs, les niveaux de BDNF et de TrkB sont corrélés avec l'augmentation du stress oxydatif vasculaire chez des rats hypertendus suggérant le rôle du BDNF dans la protection contre le stress oxydatif et la survie cellulaire.(173)

Chez des souris déficientes en TrkB ou en BDNF, la morphologie des cellules endothéliales vasculaires est altérée, la perméabilité vasculaire est significativement augmentée et la survie des cellules endothéliales des artères et des capillaires du myocarde est réduite

causant une hémorragie intraventriculaire et une mort précoce.(174, 175) Chez les mêmes souris déficientes en TrkB, le cycle contractilité/relaxation du myocarde est affectée puisque dans sa signalisation, le BDNF augmente le calcium intracellulaire dans les cardiomyocytes induisant une contractilité et active la voie de la calmoduline permettant une relaxation normale. Chez ces knockout, l'absence du TrkB complet cause une activation chronique de la voie de la calmoduline. L'absence du TrkB.T1, forme tronquée du récepteur TrkB, affecte tout autant la contractilité cardiaque.(176, 177)

Toujours au niveau vasculaire, BDNF est connu pour son rôle angiogénique au stade embryonnaire. À l'âge adulte, BDNF promeut le recrutement de cellules endothéliales TrkB+ et des cellules hématopoïétiques proangiogéniques afin d'induire une revascularisation chez les souris adultes.(178)

Dans l'athérosclérose, le BDNF protège contre le développement des lésions athérosclérotiques en augmentant l'expression et en réduisant le clivage de la VE-cadhérine chez des souris ApoE-/-.(179, 180)

Concernant p75^{NTR}, plusieurs groupes ont investigué son importance au niveau cardiaque et son rôle dans la survenue de l'ischémie et des lésions vasculaires. Avec souris déficientes en p75^{NTR}, les résultats suggèrent que ce récepteur est souvent responsable de l'apoptose des cellules musculaires lisses et de la survenue d'infarctus chez les souris. Il peut aussi réguler certaines arythmies cardiaques. Néanmoins, aucune de ces observations ne peut être attribuable spécifiquement au BDNF étant donné que le p75^{NTR} lie toutes les neurotrophines et que la littérature ne discrimine pas l'effet de chacune.(181-185)

Pour agir sur le système cardiovasculaire, BDNF doit se retrouver dans la circulation. En effet, ses niveaux plasmatiques sont de l'ordre du picogramme par ml, mais ses concentrations sériques peuvent atteindre jusqu'à 1000 fois les concentrations plasmatiques. Chez des patients atteints de maladies coronariennes, les niveaux plasmatiques de BDNF sont inversement corrélés aux niveaux du facteur de von Willebrand.(186) Étant donné le lien entre le facteur de von Willebrand et la dysfonction endothéliales, .(187) il est raisonnable de croire que BDNF peut être considéré comme un biomarqueur pronostique négatif des maladies coronariennes

En résumé, BDNF est une neurotrophine liant le récepteur TrkB principalement. Par les voies de signalisation activées, elle promeut la survie cellulaire et l'angiogenèse, protège contre l'hypoxie et le stress oxydatif que ça soit au niveau du système nerveux central ou au dans le système cardiovasculaire.

Chapitre 3: BDNF dans les plaquettes

Présence de BDNF dans les plaquettes

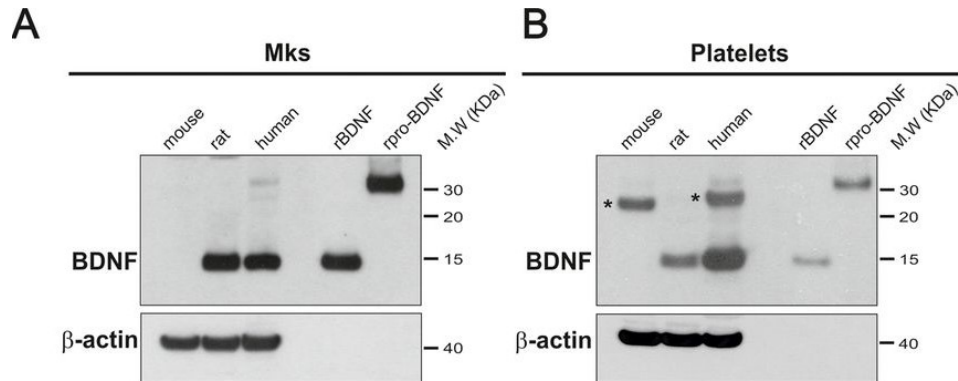


Figure 9. Immunobuvardage montrant la présence du BDNF dans les plaquettes de volontaires sains humains, de rats, mais pas de souris. Le BDNF et le proBDNF recombinants étaient utilisés comme contrôles positifs. Repris avec permission de (14), figure 1. Publié par Journal of Biological Chemistry et sous licence de CC-BY.

En 1990, Hirotaka Yamamoto a rapporté la présence de BDNF dans les plaquettes humaines et a démontré qu'il possède les mêmes propriétés biologiques et chimiques que le BDNF retrouvé dans le cerveau.(188) Partant du fait que les concentrations sériques du BDNF sont jusqu'à 1000 fois plus élevées que les concentrations plasmatiques, l'hypothèse que ce BDNF peut être relâché a été investiguée.(189, 190) En effet, BDNF est relâché à la suite de l'activation des voies plaquettaires comme la voie de l'APD et du collagène. (191) Avec des concentrations pouvant atteindre jusqu'à 1000 fois les concentrations neuronales, la question sur l'origine du BDNF plaquettaire se pose puisque ces dernières sont anucléées et ne peuvent donc pas le produire. La première hypothèse concernant l'origine de cette neurotrophine est qu'il provient des mégacaryocytes, cellules précurseurs des plaquettes. Cette hypothèse a été vérifiée par l'équipe d'Yves Alain Barde, le premier à avoir découvert le BDNF en 1982. Leurs travaux rapportent la présence du BDNF dans les plaquettes et mégacaryocytes humains ainsi que celle du rat, mais pas chez la souris.(14) Même si la méthodologie employée ne permet pas de conclure définitivement que le BDNF plaquettaire provient des mégacaryocytes, elle permet néanmoins de donner une piste solide sur cette hypothèse. Une autre hypothèse sur l'origine du BDNF a été suggérée par Fujimura et al. En effet, il suggère que le BDNF peut être internalisé

par les plaquettes, probablement via un transporteur plaquettaire qui demeure non-identifié à ce jour. (191) Malheureusement, cette hypothèse n'a jamais été vérifiée.

En dehors de l'origine de tels niveaux plaquettaires de BDNF, la question sur son rôle physiologique dans les plaquettes mérite d'être posée aussi. Puisqu'il est relâché après une activation plaquettaire, une étude a montré son effet antithrombotique dans la formation du thrombus. En effet, l'étude démontre une réduction de la densité du réseau de fibrine du thrombus et une résolution plus rapide de ce dernier. Comme discuté à la fin du chapitre 2, cette étude démontre aussi une corrélation inverse entre les niveaux de BDNF et la formation de thrombus où des faibles niveaux de BDNF mènent à la formation d'un plus grand thrombus *in vitro*. (192) Hormis plusieurs corrélations des niveaux plasmatiques de BDNF aux maladies mentales et déficits cognitifs,(193) le rôle physiologique de tels niveaux dans les plaquette n'a pas été élucidé.

TrkB et p75^{NTR} dans les plaquettes

En 2002, Fujimura et al. ont démontré la relâche du BDNF à la suite d'une activation plaquettaire et que BDNF se lie à deux récepteurs plaquettaires avec une grande affinité, mais ils ont été incapables de les identifier.(191) La présence du récepteur p75^{NTR} n'a jamais été investiguée dans les plaquettes. Par contre, la présence du TrkB a été investiguée dans les plaquettes et les mégacaryocytes. Certains groupes n'ont pas réussi à démontrer la présence du récepteur TrkB à la surface des plaquettes humaines.(191, 194) Or, ces publications n'ont pas précisé la méthode utilisée et n'ont pas montré de résultats à cet effet (résultats absents). Dans les plaquettes de rat sain, le TrkB n'était pas détecté, mais son expression a augmenté suite au développement d'une tumeur.(195) Dans les mégacaryocytes, la présence du TrkB est aussi controversée puisque Labouyrie et al. ont rapporté la présence du TrkB dans des mégacaryocytes humains primaires, mais Tamura et al. ont rapporté l'inverse dans des lignées mégacaryocytaires humaines (résultats absents encore une fois).(196, 197) Cette incertitude quant à la présence du récepteur TrkB nécessite une investigation approfondie.

Hypothèse et objectifs

Puisque le BDNF semble avoir un rôle important dans le système cardiovasculaire et qu'il est présent en grande quantité dans les plaquettes humaines. Il est important de comprendre son rôle dans la fonction plaquettaire afin d'explorer les cellules cibles de ce dernier dans le système vasculaire et sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique pour réguler la santé cognitive.

Hypothèse

Tout comme dans le système nerveux central, BDNF a un rôle autocrine/paracrine dans les plaquettes.

Objectifs

1. Investiguer la réponse plaquettaire au BDNF
2. Vérifier la présence du récepteur TrkB dans les plaquettes
3. Investiguer son implication dans l'agrégation plaquettaire induite par le BDNF
4. Décortiquer les voies de signalisation activées par le BDNF dans les plaquettes
5. Comprendre la fonction plaquettaire du BDNF

Chapitre 4: *Platelets express a truncated form of the TrkB receptor involved in Brain-Derived Neurotrophic Factor signaling*

Contribution de l'étudiant

Dans le cadre de mes travaux de maîtrise, j'ai effectué la majorité des expériences présentées dans ce mémoire. J'ai réalisé les tests plaquettaires fonctionnels par agrégométrie, ainsi que les expériences de signalisation par inhibition pharmacologique et par immunobuvardage. J'ai extrait et collecté les données, et procédé à leur analyse. En dernier lieu, j'ai majoritairement contribué à l'écriture de l'article présenté ci-après.

Platelets express a truncated form of the TrkB receptor involved in Brain-Derived Neurotrophic Factor signaling

Short title: BDNF-TrkB signaling in platelets

Imane Boukhatem^{1,2}, Samuel Fleury^{1,2}, Melanie Welman², Jessica Le Blanc^{1,2}, Bruce G. Allen^{2,3},
Marie Lordkipanidzé^{1,2}

¹ Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

² Research Center, Montreal Heart Institute, Montréal, Québec, Canada;

³ Departments of Biochemistry and Molecular Medicine, Pharmacology and Physiology, and Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Correspondence to: Marie Lordkipanidzé, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 rue Bélanger, Montréal, Québec, Canada H1T 1C8

Tel.: +1 514 376 3330 Ext 2694; Fax: +1 514 376 0173

e-mail: marie.lordkipanidze@umontreal.ca

Word counts:

Text word count: 3787

Abstract word count: 237

Number of figures and tables: 7 figures

Number of references: 60

Key points

- Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) induces aggregation of washed human platelets through a truncated form of the TrkB receptor.
- Platelets exposed to BDNF secrete angiogenic and inflammatory cytokines, which may play a role in maintaining vascular homeostasis.

Abstract

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a growth factor that was initially discovered in the brain. BDNF has both autocrine and paracrine roles in neurons and its release and signaling mechanisms have been extensively studied in the central nervous system. Surprisingly, large quantities of BDNF have been reported in circulation, where it is essentially stored in platelets with concentrations reaching 100-1000-fold those of neurons. Despite this abundance, the function of BDNF in platelet biology has not been explored. We have therefore sought to investigate the effect of BDNF on platelet function and the mechanisms underlying platelet responses to BDNF. In washed platelets, BDNF induced complete biphasic platelet aggregation that in part relied on amplification from secondary mediators. The low-affinity agonist neurotrophin-4 and an activating antibody raised against the canonical BDNF receptor TrkB induced similar platelet responses, implicating TrkB. Platelets express, both at their surface and in their intracellular compartment, a truncated form of TrkB lacking a tyrosine kinase domain. BDNF-induced platelet aggregation was prevented by inhibitors of Rac1, PKC, and PI3K. Platelets exposed to BDNF secreted a panel of angiogenic and inflammatory cytokines, which may play a role in maintaining vascular homeostasis. In platelet-rich plasma, exogenous BDNF was found to bind α 2-macroglobulin and failed to induce platelet aggregation. In summary, BDNF induces platelet aggregation and secretion via TrkB activation. Plasma protein binding may serve to compartmentalize bioavailable BDNF, thus restricting BDNF-mediated platelet activation to sites of vascular injury.

Keywords: Brain-Derived Neurotrophic Factor; TrkB receptor; platelets; cellular signaling; α 2-macroglobulin.

Introduction

Initially discovered in the brain, the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a growth factor and a member of the neurotrophin family.¹ BDNF has been extensively studied in the central nervous system and has a well-established role in synaptic plasticity and neuron development by promoting cell survival and neurite outgrowth.²⁻⁵ To exert its action, BDNF binds to the tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptor, inducing receptor homodimerization and autophosphorylation within its endogenous kinase domain.⁶ Three TrkB isoforms have been reported, namely the full length receptor and two truncated receptors (TrkB.T1 and TrkB.Shc in humans), that share the same extracellular domain but differ in their intracellular domains.⁷⁻⁹ The intracellular domains of TrkB.T1 and TrkB.Shc consist of a short cytoplasmic tail of 23 and 83 amino acids, respectively. TrkB.T1 and TrkB.Shc lack the intracellular tyrosine kinase domain of the full-length receptor.¹⁰ Notwithstanding, it has been shown that truncated TrkB receptors can signal through adaptor proteins or act as a dominant-negative receptor to inhibit BDNF signaling through the full-length TrkB receptor.^{11,12}

TrkB receptors are found in many tissues outside of the central nervous system, including in the lungs, heart and the vascular endothelium.¹³⁻¹⁶ Increasingly, BDNF is shown to play an important role in the cardiovascular system.^{16,17} In the circulation, BDNF is stored primarily in platelets, where its concentrations can be 100 to 1000 times that of the central nervous system.^{16,18,19} Interestingly, platelets have been shown to release BDNF upon activation, but the role of BDNF in platelets remains unknown.²⁰ Since BDNF plays an autocrine-paracrine role in the brain, we hypothesized that BDNF has a similar autocrine-paracrine role in platelets.^{21,22} We therefore sought to investigate the effect of BDNF on platelet function and the intracellular signaling underlying platelet responses to BDNF. Here we show that BDNF induces platelet aggregation by binding to a truncated TrkB receptor and activates a signaling pathway involving the Rho GTPase Rac1, PKC, and PI3K. We also demonstrate that upon activation with BDNF, platelets release angiogenic and inflammatory cytokines, suggesting that BDNF may indeed play an autocrine-paracrine role in platelet function and vascular physiology.

Materials and methods

Materials

Anticoagulant Citrate Dextrose Solution Formula A (DIN:00788139) and Eptifibatide (integrilin, DIN: 02240351) were purchased at the Montreal Heart Institute Pharmacy. Adult human brain cerebral cortex whole tissue lysate (catalog no. NB820-59182) was from Novus Biologicals. Prostaglandin E1 (catalog no. 1620), wortmannin (catalog no. 1232), Y-27632 dihydrochloride (catalog no. 1254), AR-C 66096 tetrasodium salt (catalog no. 3321), cyclotraxin B (catalog no. 5062), and GNF5837 (catalog no. 4559) were from Tocris Bioscience. PP2 (catalog no. Ak-60369), PRT318 (catalog no. Ak-198900), and NSC23766 (catalog no. CD0192) were from Cederlane Labs. K252a (catalog no. K-2151) and Dasatinib (catalog no. D-3307) were from LC Laboratories. Sodium arachidonate (catalog no. 10006607) and bisindolylmaleimide I (catalog no. 13298-10) were from Cayman Chemical Co. Aspirin (catalog no. A-6810) was from Sigma Aldrich and zoledronic acid (catalog no. 6111-10) was from R&D Systems. TRAP-6 amide (catalog no. H-2936.0025BA) was from VWR and collagen type 1 fibrils (catalog no. 385) were purchased from Chrono-Log Corporation. Protease and phosphatase inhibitor mini-tablets (catalog no. A32959) and protein G agarose (catalog no. 16-266) were from Fisher Scientific. Recombinant human neurotrophin-4 (NT-4) protein (catalog no. N-270) and human TrkB-Fc Chimera (catalog no. RPC-001) were from Alomone Labs. Recombinant human BDNF (catalog no. 450-02-500) and anti-BDNF antibodies (catalog no. 500-P84) were from Peprotech. Anti-BDNF hybridoma (mab#9) was from the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa. Human TrkB antibodies (catalog no. mab397 and catalog no. 10047-MM-12) were from R&D Systems and Sino Biological, respectively. Beta-actin antibody (catalog no. 937215) was from R&D Systems. Alpha-2-Macroglobulin (α 2M) antibody (catalog no. abx132389) was from Abnova Ltd. AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) (catalog no. 115-005-003) and AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) (catalog no. 111-005-003) were from Jackson ImmunoResearch Laboratories. Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse IgG (H+L) (catalog no. A-21202) was from ThermoFisher Scientific. Anti-Akt antibody (catalog no. 9272S), anti-phospho-Akt (Ser-473) (catalog no. 4060S), anti-PLC γ 2 (catalog no. 3872T) and anti-phospho-PLC γ 2 (Thr-1217) (catalog

no. 3871T) were from Cell Signaling Technology. Customized multiplex cytokine detection kits were from AimPlex Bioscience.

Participant selection

This study was approved by the Montreal Heart Institute Scientific and Research Ethics Committee (REC reference: #2018-2368) and all participants gave written informed consent. Participants were considered healthy if they were aged 18 years or older, did not require long-term medical therapy, had refrained from drugs known to influence platelet function in the previous 2 weeks, had not undergone major surgery in the previous 6 months, did not have a history of bleeding symptoms, and had platelet counts and hemoglobin levels within the normal reference range.

Blood collection and platelet isolation

Blood was drawn by venipuncture into syringes containing either acid citrate dextrose (ACD-A) in a 1:5 volume ratio (ACD/blood) for experiments carried out in washed platelets, or sodium citrate 3.2% in 1:9 volume ratio (citrate/blood) for experiments in platelet-rich plasma (PRP). Blood was centrifuged at 200 g for 15 min without a brake to prepare PRP and at 1000 g for 10 min to prepare platelet-poor plasma (PPP).

Native citrated PRP was used without adjustment of platelet count for platelet aggregation experiments, with autologous PPP used to set baselines.

To obtain washed platelets, prostaglandin E1 (1 μ M) was added to ACD-anticoagulated PRP prior to centrifugation at 1000 g for 10 min. Platelets were resuspended in Tyrode's buffer (137 mM NaCl, 11.9 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 5.6 mM glucose, pH 7.4). Platelet counts were determined using a Beckman Coulter hematology analyzer (Ac-T 5diff AL) and adjusted to a final concentration of 2.5×10^8 /mL for platelet aggregation assays or 5×10^8 /mL for protein phosphorylation assays. Platelets were allowed to rest at room temperature for 60 min prior to functional experiments.

Light transmission aggregometry

Platelet aggregation was measured using a Chronolog aggregometer (Model 700, Havertown, PA, USA) at 37 °C with continuous stirring at 1200 rpm. When specified, washed platelets were pre-incubated with inhibitors or vehicle for 15 min at room temperature. Following 2 min of incubation at 37 °C and 1 min of stabilization with stirring, agonists were added to platelet suspensions and aggregation traces were recorded using the AGGRO/LINK[®]8 Software package.

Protein phosphorylation

To block the positive feedback from amplification pathways, washed platelets were pre-incubated with eptifibatid (9 μM), aspirin (30 μM), and AR-C66096 (1 μM). When specified, washed platelets were incubated with the indicated inhibitors for 15 min prior to stimulation with agonists for 1 min at 37 °C under continuous stirring at 1200 rpm (ChronoLog model 700 aggregometer). Reactions were stopped with ice-cold RIPA buffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease and phosphatase inhibitors. Laemmli loading buffer (4X: 250 mM Tris pH 6.8, 8% SDS, 40% glycerol, 20% β-mercaptoethanol, and 0.02% bromophenol blue) was added to platelet lysates and samples were heated at 95 °C for 90 s. Proteins were resolved by SDS-PAGE on 8% acrylamide gels and transferred onto PVDF membranes for immunoblotting.

Flow cytometry

Washed platelets were fixed with 1% PFA for 20 min at room temperature. Platelets were then incubated at room temperature with anti-TrkB primary antibody (R&D Mab397, diluted 1:25) or isotype control (mouse anti-human IgG₁) for 30 min, followed by an Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody (Invitrogen, diluted 1:200) for 30 min, and analyzed using the MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Germany). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were used as a positive control.

Confocal microscopy

Glass coverslips were pre-coated with 0.1% poly-L-lysine for 15 min. Platelets fixed with 1% PFA for 20 min at room temperature were transferred onto pre-coated coverslips and allowed to adhere overnight at 4 °C. TrkB labelling was performed using an anti-TrkB primary antibody (5 µg) for 90 min at room temperature followed by incubation with an Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody (1:200) for 1 h. Fluorescence was visualized using a Zeiss LSM510 confocal microscope. PBMCs were used as a positive control.

Immunoprecipitation

BDNF (750 nM) or vehicle were added to PRP at 37 °C under continuous stirring for 30 min. Platelets were pelleted by centrifugation (1000 g for 3 min) and the supernatant (i.e. plasma) was retained. Plasma proteins were incubated under constant rotation overnight at 4 °C with antibodies against either BDNF or α 2M. Protein G-conjugated agarose beads were added to the samples followed by incubation for 4 h at 4 °C with constant mixing. Beads were washed 3 times in PBS and proteins were eluted by adding Laemmli buffer and heating at 95 °C for 5 min. Immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes for immunoblotting.

Analysis of the platelet secretome

Washed platelets were activated with either collagen-related peptide (CRP; 1 µg/mL), TRAP (3 µM), PAR-4 amide (100 µM), BDNF (750 nM), or vehicle at 37 °C under continuous stirring at 1200 rpm (ChronoLog model 700 aggregometer). Once aggregation was completed, reactions were stopped with EDTA (4 mM), platelets were pelleted by centrifugation at 1000 g for 10 min at room temperature. Supernatants were collected and stored at -80 °C prior to analysis.

Inflammatory and angiogenic profiles were assessed by multiplex bead kits (AimPlex Bioscience, CA, USA) and analyzed by flow cytometry (MACSQuant Analyzer 10, Miltenyi Biotec, Germany). Standard curves were generated and employed to convert the mean fluorescent intensity (MFIs) of each sample (run in duplicate) into concentration.

Statistical analyses

All data sets passed the Shapiro-Wilk test for normality. Repeated-measures analysis of variance (ANOVA) with Geisser-Greenhouse correction for sphericity and Dunnett's correction for multiple comparisons was performed using GraphPad Prism Software version 8 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A multiplicity-adjusted p value < 0.05 was considered significant. Continuous variables are presented as median \pm interquartile range (IQR). N refers to the number of independent experiments with each experiment representing a different biological sample.

Results

BDNF induces platelet aggregation

Addition of BDNF (75 nM, 200 nM, 750 nM) induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner (**Figure 1A,B**). In the presence of a neutralizing antibody against BDNF (mab #9), platelet aggregation in response to BDNF was prevented (**Figure 1C**). This inhibition was specific to BDNF, as platelet responses to collagen, TRAP, and arachidonic acid were not modified by incubation with mab#9 (**Figure 1D**). To further confirm that BDNF induced platelet aggregation and not agglutination, we investigated the contribution of amplification pathways to BDNF-induced platelet aggregation. Aspirin (COX-1 inhibition), AR-C66096 (ADP-P2Y₁₂ receptor inhibition), and eptifibatide (integrin $\alpha_2\beta_3$ inhibition) significantly impaired the ability of BDNF to induce platelet aggregation (**Figure 1E,F**). Taken together, these findings suggest that BDNF induces platelet aggregation through an active mechanism that, in part, relies on amplification from secondary mediators.

Platelets express a truncated form of the TrkB receptor

We investigated the presence of the canonical BDNF receptor, TrkB, on washed platelets. Whereas both the full-length receptor (145-kDa) and the truncated receptor (95-kDa) were present in the adult human brain cerebral cortex whole tissue lysate (used as a positive control), only the truncated receptor was detected in platelet lysates (**Figure 2A**). To determine the

expression pattern of the receptor, surface staining and intracellular staining for TrkB was assessed by flow cytometry (**Figure 2B**) and confocal microscopy (**Figure 2C**) in fixed and permeabilized platelets. Up to 50% of platelets were TrkB⁺ by flow cytometry and TrkB immunoreactivity was observed at the plasma membrane as well as distributed in a punctuate manner in the cytoplasm, suggesting a granular compartmentalization.

Other ligands of TrkB also induce platelet aggregation

We assessed whether other known ligands of the TrkB receptor induced platelet aggregation similarly to BDNF. Both neurotrophin-4 (NT-4, 750 nM), a low affinity agonist of TrkB, and a TrkB-activating antibody (MM12, 10 µg/mL) induced complete, biphasic platelet aggregation (**Figure 3A,B**), further suggesting TrkB is the target receptor in platelets.

BDNF induces platelet aggregation through a kinase-dependent mechanism

To determine whether BDNF activated a protein tyrosine kinase-dependent mechanism in platelets similar to what has been observed in neurons, we first conducted a time-series analysis using the phosphotyrosine-specific antibody 4G10[®]. As shown in **Figure 4A**, an increase in phospho-tyrosine immunoreactivity was observed within 45 s of adding BDNF, which reached a plateau by 60 s and decreased gradually until 360 s. Based upon these results, an incubation time of 60 s was employed for subsequent studies of the effects of specific inhibitors on BDNF signaling in platelets.

We next sought to determine whether BDNF-induced platelet aggregation required the intrinsic TrkB tyrosine kinase signaling domain. Cyclotraxin B is an allosteric modulator of the TrkB receptor that induces a conformational change preventing autophosphorylation of the TrkB kinase domain.²³ Cyclotraxin B (up to 50 µM) failed to inhibit BDNF-induced platelet aggregation (**Figure 4B**). GNF5837 is a TrkB kinase domain inhibitor that is specific to TrkB in the nM range

but loses specificity above 1 μM .²⁴ Incubation of platelets with GNF5837 (1 μM) did not impair platelet aggregation in response to BDNF (**Figure 4B**). At 30 μM , GNF5837 significantly decreased BDNF-induced platelet aggregation, as well as that of the collagen used as control (**Figure 4B,C**). Finally, K252a (10 μM), an inhibitor of protein serine/threonine and protein tyrosine kinases, blocked BDNF- and collagen-induced platelet aggregation (**Figure 4B,C**), as did PP2 (10 μM), a non-selective inhibitor of the Src family of protein tyrosine kinases (SFKs) **Figure 4B,C**). Taken together, these findings suggest that BDNF signals through a truncated form of the TrkB receptor that is devoid of its tyrosine kinase domain but may engage adaptor proteins to signal through one or more non-receptor protein kinase dependent pathways.

BDNF-induced platelet responses do not require activation of non-receptor protein tyrosine kinases Src and Syk

Given the similarity with collagen-induced platelet aggregation, we first investigated whether protein tyrosine kinases Src and Syk were involved in BDNF-induced platelet aggregation similar to the collagen-induced activation of GPVI.^{25,26} In contrast to collagen, Src-specific inhibitor dasatinib (10 μM) and Syk-specific inhibitor PRT318 (10 μM) failed to inhibit BDNF-induced platelet aggregation (**Figure 4D,E**), suggesting that different protein tyrosine kinases are involved in platelet responses to BDNF.

Rho GTPase Rac-1 is involved in BDNF-induced platelet aggregation

As rho GTPases have been shown to mediate truncated TrkB signaling in astrocytes, glioma and glial cells,²⁷⁻²⁹ we investigated their possible role in BDNF-induced platelet aggregation. Zoledronic acid (50 μM), a non-specific Rho inhibitor, significantly inhibited BDNF-induced platelet aggregation (**Figure 5A**). We next examined the effects of targeted inhibition of

Rho family members Rac-1 and ROCK, a major downstream effector of rhoA. The Rac-1 inhibitor NSC23766 (10 μ M) decreased platelet aggregation in response to BDNF, whereas the ROCK inhibitor Y27632 (10 μ M) had no effect (**Figure 5A**).^{30,31} Collagen-induced aggregation was variably affected by inhibition of Rho GTPases (**Figure 5B**), as previously described.³²

We then investigated the involvement of PKC and the PI3K/Akt pathway, which are major signaling pathways in platelets and neurons and have been reported to be activated downstream of TrkB in the central nervous system. Inhibition of either PKC (BIM-1, 10 μ M) or PI3K (wortmannin, 100 nM) significantly attenuated both BDNF-induced (**Figure 5C**) and collagen-induced (**Figure 5D**) platelet aggregation. However, it should be noted that at the concentration used in the present study, BIM-1 would also inhibit GSK3 activity.

We further confirmed the aggregation results by immunoblotting for the phosphorylated form of relevant proteins. As shown in **Figure 5E**, Rho inhibition reduced BDNF-induced Akt phosphorylation, as did the PI3K inhibitor wortmannin (**Figure 5F**). Inhibition of Rac1 or ROCK reduced BDNF-induced STAT3 phosphorylation, whereas the non-selective Rho inhibitor zoledronic acid increased STAT3 phosphorylation. PLC γ ₂ phosphorylation was not increased by BDNF, confirming the truncated form of TrkB is not capable of activating PLC γ ₂. Taken together, these results suggest BDNF induces aggregation through recruitment of Rac1 as an adaptor protein which induces the activation of the PI3K-Akt pathway and phosphorylation of STAT3. While PLC γ ₂ is not involved in BDNF signaling, PKC and PI3K appear to act through pathways independent of STAT3.

BDNF is sequestered in plasma by α ₂-macroglobulin

Neurotrophins have been previously shown to form a complex with α ₂-macroglobulin (α ₂M), a large plasma protein, which serves to prevent circulating neurotrophins from binding to

their Trk receptors.^{33,34} Thus, we investigated whether platelet responses to BDNF were maintained in the presence of plasma proteins. In PRP, platelets lost their ability to aggregate in response to BDNF (**Figure 6A-B**). We then tested whether exogenous BDNF added to PRP forms a complex with α_2 M, as has been shown for other neurotrophins.^{33,34} To do so, we incubated PRP with exogenous BDNF (750 nM) at 37 °C while maintaining constant stirring. No platelet aggregation was observed. We then pelleted platelets by centrifugation and immunoprecipitated either BDNF or α_2 M from the supernatant. As shown in **Figure 6C**, α_2 M immunoprecipitates contained BDNF immunoreactivity, with little left in the supernatant. Similarly, BDNF immunoprecipitates contained α_2 M immunoreactivity (**Figure 6C**). Taken together, these findings indicate that BDNF released into circulation is sequestered by α_2 M, limiting its bioavailability to interact with circulating platelets and suggest that an endocrine role for BDNF in the circulatory system is unlikely.

BDNF induces platelet secretion

In the absence of an endocrine role for BDNF in the circulation, we next investigated the possibility that BDNF plays an autocrine/paracrine role in a growing thrombus by inducing platelet secretion. As shown in **Figure 7**, BDNF (750 nM) induced the release of several inflammatory and angiogenic factors such as IL-8, ENA-78, TARC and VEGF-A. The release reaction was similar to that induced by collagen-related peptide (CRP), TRAP and PAR-4 amide.

Discussion

In the present study, we have shown: (1) BDNF induces complete, biphasic and irreversible platelet aggregation in washed human platelets through a truncated form of the TrkB receptor; (2) BDNF-induced platelet aggregation engages the Rho GTPase Rac-1 and downstream signaling through PKC and the PI3K/Akt pathway; (3) in response to BDNF, platelets release a broad spectrum of inflammatory and angiogenic cytokines; and (4) in plasma, BDNF binds to α_2 M, thus limiting its bioavailability and prothrombotic effects. Taken together, these findings suggest a paracrine/autocrine role of BDNF on platelet function, and possibly other cell types, at or near a vascular lesion.

TrkB expression in platelets

Our finding that inhibition of secondary mediators of platelet aggregation with aspirin and an ADP-P2Y₁₂ receptor antagonist prevented the secondary phase of platelet aggregation but maintained the primary phase evoked by BDNF suggested the presence of a specific receptor. We are not the first to investigate the presence of TrkB on platelets and platelet precursors, megakaryocytes. Two previous publications failed to detect the presence of TrkB on human platelets; however, data was not shown to support their findings.^{20,35} In animal studies, TrkB was absent from healthy rat platelets but was expressed on platelets from tumor-bearing rats.³⁶ The presence of TrkB on megakaryocytes is also controversial. Labouyrie *et al.* reported high levels of expression of the truncated TrkB receptor in human megakaryocytes whereas Tamura *et al.* failed to detect the TrkB receptor in a megakaryocytic cell line (data however was not shown).^{37,38} Our results in human platelets from healthy volunteers show a truncated form of TrkB to be present, both at the surface and in the intracellular compartment. This led us to hypothesize that TrkB was involved in platelet responses to BDNF.

Similarly to the signaling cascade activated by BDNF in glial cells, we have found Rac1 to be important in platelets.^{6,39} The activation of the PKC and PI3K/Akt pathways, which triggers STAT3 activation, is an important pathway in the central nervous system promoting dendritic arborization in neurons, astrocyte survival and glial cell differentiation.⁴⁰⁻⁴³ As a transcription factor, STAT3 activation by neurotrophins is often correlated with neuron survival and transcription of neuroprotective genes.⁴⁴ In megakaryocytes, STAT3 has been shown to play an important role in megakaryocyte maturation and differentiation, as well as in platelet production.⁴⁵ Furthermore, non-genomic roles of STAT3 have emerged in recent years, suggesting a crosstalk between STAT3 and proinflammatory cytokines in platelet signaling.⁴⁶ Our finding that BDNF induces secretion of angiogenic and inflammatory cytokines in platelets warrants more detailed investigation. A limitation to this section of the study would be the use of the PKC inhibitor, BIM-1, which is known to inhibit GSK3 at a nanomolar range.^{47,48} Indeed, BDNF has been shown to affect GSK3 β in the nervous system via the PI3K/Akt pathway.⁴⁹ Further studies should be undertaken to delineate the possible roles of the PKC family and GSK3 β in the ability of the truncated TrkB receptor to induce platelet activation in response to BDNF binding.

Platelet-secreted BDNF as a paracrine regulator in the cardiovascular system

TrkB expression is not confined to the central nervous system, as the receptor has been found in many tissues such as the lungs, the heart, and vascular endothelium.¹³⁻¹⁶ Increasingly, BDNF is seen as an important player in the cardiovascular system. Through activation of the truncated TrkB receptor, BDNF regulates heart contraction and long-term homeostasis in cardiomyocytes.^{50,51} BDNF also promotes angiogenesis by recruitment of endothelial cells and mobilization of hematopoietic progenitors.^{52,53} BDNF may protect against cardiac dysfunction and promote cell regeneration during ischemic injuries and myocardial infarction.^{17,54-57} As the largest peripheral reservoir of BDNF, platelets appear to be crucial vectors of BDNF in the cardiovascular system and active regulators of its bioavailability. Given the large quantities of BDNF stored in platelets and released upon platelet activation,²⁰ which can in turn activate platelets to aggregate and secrete their granular cargoes, it appears essential that a thrombo-protective mechanism be in place to limit platelet aggregation to vascular lesions. Our finding that BDNF fails to induce platelet aggregation in plasma, in contrast to washed platelets, suggests a role for one or more plasma proteins in reducing the bioavailability of circulating BDNF. Other neurotrophins, most notably the nerve growth factor (NGF), have been shown to bind to $\alpha 2M$: sequestration of NGF by $\alpha 2M$ impairs its ability to act on its Trk receptor.^{33,34} Plasma $\alpha 2M$ also sequesters thrombin, limiting its enzymatic activity and thereby contributing to the attenuation of the coagulation response.⁵⁸⁻⁶⁰ It is interesting that $\alpha 2M$ appears to also regulate the bioavailability of BDNF to interact with platelets, thus ensuring a thrombo-protective mechanism in case of inappropriate platelet activation. The factors contributing to the balance of free versus bound BDNF in plasma thus require further investigation.

In conclusion, we have found that platelets respond to BDNF in an autocrine-paracrine manner, via activation of a truncated form of the TrkB receptor, engaging the Rho GTPase Rac1, signaling through the PKC and PI3K/Akt pathways, and promoting secretion of angiogenic and inflammatory cytokines. Bioavailability of BDNF is controlled by binding to plasmatic $\alpha 2M$, limiting its effect on platelets in circulation. The importance of platelet-borne BDNF and its interactions with other TrkB⁺ cells in the vasculature, both in healthy vessels and in ischemic lesions, opens up new avenues of research into platelets as dynamic vectors of neurotrophic factors.

Acknowledgements

We thank Dr. Uri H. Saragovi, Dr. Gaetan Mayer, Dr. Eric Thorin, Dr Jean-François Tanguay, Dr Yahye Merhi and Ms. Rahma Boulahya for their insight and suggestions; Louis Villeneuve for the microscopy images; and Dr. Guylaine Ferland's lab for providing us with antibodies and technical support. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (PJT-159569), the Canada Foundation for Innovation Leaders Opportunity Fund (32797) and the Montreal Heart Institute Foundation. IB was supported by scholarships from the Faculté de pharmacie and by the Faculté des études supérieures et postdoctorales of the Université de Montréal. SF was supported by scholarships from the Faculté de pharmacie of the Université de Montréal and from the Montreal Heart Institute Foundation. JLB was supported by summer internships from the Faculté de pharmacie of the Université de Montréal. ML is a Fonds de recherche du Québec en Santé (FRQS) Junior 1 Research Scholar (33048).

Authorship Contributions

IB has designed the research, performed assays and collected data, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. SF, MW and JLB have performed assays and collected data, analyzed and interpreted data, and critically revised the manuscript. BGA analyzed and interpreted data and critically revised the manuscript. ML has overseen the research group, designed the research, analyzed and interpreted data, and critically revised the manuscript.

Disclosure of Conflicts of Interest

ML has received speaker fees from Bayer; in-kind and financial support for investigator-initiated grants from Roche Diagnostics, AggreDyne, LeoPharma; and participated in industry-sponsored research from Idorsia. There are no other conflicts of interest to disclose.

References

1. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982;1(5):549-553.
2. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors.* 2004;22(3):123-131.
3. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(8):603-614.
4. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
5. Fryer RH, Kaplan DR, Kromer LF. Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol.* 1997;148(2):616-627.
6. Kowianski P, Lietzau G, Czuba E, Waskow M, Steliga A, Morys J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol.* 2018;38(3):579-593.
7. Klein R, Conway D, Parada LF, Barbacid M. The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell.* 1990;61(4):647-656.
8. Klein R, Nanduri V, Jing SA, et al. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell.* 1991;66(2):395-403.
9. Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T. trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol.* 1991;11(1):143-153.
10. Stoilov P, Castren E, Stamm S. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(3):1054-1065.
11. Baxter GT, Radeke MJ, Kuo RC, et al. Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2. *J Neurosci.* 1997;17(8):2683-2690.
12. Fenner BM. Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012;23(1-2):15-24.
13. Odate S, Nakamura K, Onishi H, et al. TrkB/BDNF signaling pathway is a potential therapeutic target for pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. *Lung Cancer.* 2013;79(3):205-214.

14. Fulgenzi G, Tomassoni-Ardori F, Babini L, et al. BDNF modulates heart contraction force and long-term homeostasis through truncated TrkB.T1 receptor activation. *J Cell Biol.* 2015;210(6):1003-1012.
15. Kermani P, Rafii D, Jin DK, et al. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB⁺ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest.* 2005;115(3):653-663.
16. Caporali A, Emanuelli C. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiol Rev.* 2009;89(1):279-308.
17. Pius-Sadowska E, Machalinski B. BDNF - A key player in cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;110:54-60.
18. Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, et al. Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. *Protein Expr Purif.* 1995;6(4):465-471.
19. Yamamoto H, Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 1990;10(11):3469-3478.
20. Fujimura H, Altar CA, Chen R, et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost.* 2002;87(4):728-734.
21. Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA. Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004;279(32):33538-33546.
22. Lindholm D, Carroll P, Tzimagiorgis G, Thoenen H. Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-1 and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4. *Eur J Neurosci.* 1996;8(7):1452-1460.
23. Cazorla M, Jouvenceau A, Rose C, et al. Cyclotraxin-B, the first highly potent and selective TrkB inhibitor, has anxiolytic properties in mice. *PLoS One.* 2010;5(3):e9777.
24. Albaugh P, Fan Y, Mi Y, et al. Discovery of GNF-5837, a Selective TRK Inhibitor with Efficacy in Rodent Cancer Tumor Models. *ACS Med Chem Lett.* 2012;3(2):140-145.
25. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1752-1762.
26. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2341-2349.
27. Ohira K, Kumanogoh H, Sahara Y, et al. A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci.* 2005;25(6):1343-1353.

28. Ohira K, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M. TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342(3):867-874.
29. Ohira K, Funatsu N, Homma KJ, et al. Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. *Eur J Neurosci.* 2007;25(2):406-416.
30. Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(20):7618-7623.
31. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol.* 2000;57(5):976-983.
32. Pleines I, Elvers M, Strehl A, et al. Rac1 is essential for phospholipase C-gamma2 activation in platelets. *Pflugers Arch.* 2009;457(5):1173-1185.
33. Barcelona PF, Saragovi HU. A Pro-Nerve Growth Factor (proNGF) and NGF Binding Protein, alpha2-Macroglobulin, Differentially Regulates p75 and TrkA Receptors and Is Relevant to Neurodegeneration Ex Vivo and In Vivo. *Mol Cell Biol.* 2015;35(19):3396-3408.
34. Liebl DJ, Koo PH. Comparative binding of neurotrophins (NT-3, CNTF and NGF) and various cytokines to alpha 2-macroglobulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;193(3):1255-1261.
35. Burnouf T, Kuo YP, Blum D, Burnouf S, Su CY. Human platelet concentrates: a source of solvent/detergent-treated highly enriched brain-derived neurotrophic factor. *Transfusion.* 2012;52(8):1721-1728.
36. Yang ZF, Ho DW, Lau CK, et al. Platelet activation during tumor development, the potential role of BDNF-TrkB autocrine loop. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346(3):981-985.
37. Tamura S, Nagasawa A, Masuda Y, et al. BDNF, produced by a TPO-stimulated megakaryocytic cell line, regulates autocrine proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427(3):542-546.
38. Labouyrie E, Dubus P, Groppi A, et al. Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol.* 1999;154(2):405-415.
39. Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11(3):272-280.
40. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci.* 2005;25(49):11300-11312.

41. Saba J, Turati J, Ramirez D, et al. Astrocyte truncated tropomyosin receptor kinase B mediates brain-derived neurotrophic factor anti-apoptotic effect leading to neuroprotection. *J Neurochem*. 2018;146(6):686-702.
42. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361(1473):1545-1564.
43. Cheng A, Coksaygan T, Tang H, et al. Truncated tyrosine kinase B brain-derived neurotrophic factor receptor directs cortical neural stem cells to a glial cell fate by a novel signaling mechanism. *J Neurochem*. 2007;100(6):1515-1530.
44. Dziennis S, Alkayed NJ. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. *Rev Neurosci*. 2008;19(4-5):341-361.
45. Drachman JG, Sabath DF, Fox NE, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood*. 1997;89(2):483-492.
46. Zhou Z, Gushiken FC, Bolgiano D, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates collagen-induced platelet aggregation independently of its transcription factor activity. *Circulation*. 2013;127(4):476-485.
47. Hers I, Tavaire JM, Denton RM. The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31-8220) are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity. *FEBS Lett*. 1999;460(3):433-436.
48. Zhang H-C, White KB, Ye H, et al. Macrocyclic bisindolylmaleimides as inhibitors of protein kinase C and glycogen synthase kinase-3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2003;13(18):3049-3053.
49. Li Z, Tan F, Thiele CJ. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β contributes to brain-derived neurotrophic factor/TrkB-induced resistance to chemotherapy in neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(12 Pt 1):3113-3121.
50. Fulgenzi G, Tomassoni-Ardori F, Babini L, et al. BDNF modulates heart contraction force and long-term homeostasis through truncated TrkB.T1 receptor activation. *J Cell Biol*. 2015;210(6):1003-1012.
51. Feng N, Huke S, Zhu G, et al. Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(6):1880-1885.
52. Kermani P, Rafii D, Jin DK, et al. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB⁺ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest*. 2005;115(3):653-663.
53. Kermani P, Hempstead B. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2007;17(4):140-143.

54. Okada S, Yokoyama M, Toko H, et al. Brain-derived neurotrophic factor protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction via a central nervous system-mediated pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1902-1909.
55. Anastasia A, Deinhardt K, Wang S, et al. Trkb signaling in pericytes is required for cardiac microvessel stabilization. *PLoS One.* 2014;9(1):e87406.
56. Hang P, Sun C, Guo J, Zhao J, Du Z. BDNF-mediates Down-regulation of MicroRNA-195 Inhibits Ischemic Cardiac Apoptosis in Rats. *Int J Biol Sci.* 2016;12(8):979-989.
57. Hang P, Zhao J, Cai B, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates TRPC3/6 channels and protects against myocardial infarction in rodents. *Int J Biol Sci.* 2015;11(5):536-545.
58. Skornicka EL, Shi X, Koo PH. Comparative binding of biotinylated neurotrophins to alpha(2)-macroglobulin family of proteins: relationship between cytokine-binding and neuro-modulatory activities of the macroglobulins. *J Neurosci Res.* 2002;67(3):346-353.
59. Kessels H, Willems G, Hemker HC. Analysis of thrombin generation in plasma. *Comput Biol Med.* 1994;24(4):277-288.
60. Cvirn G, Gallistl S, Koestenberger M, Kutschera J, Leschnik B, Muntean W. Alpha 2-macroglobulin enhances prothrombin activation and thrombin potential by inhibiting the anticoagulant protein C/protein S system in cord and adult plasma. *Thromb Res.* 2002;105(5):433-439.

Figure legends

Figure 1: BDNF induces complete, biphasic platelet aggregation in washed platelets

Representative trace (A) and quantification (B) of platelet aggregation in response to 75 nM, 200 nM and 750 nM BDNF. Repeated-measures ANOVA test, $p=0.0004$; vehicle vs. 200 nM BDNF; $p=0.01$ and vs. BDNF 750 nM $p<0.0001$. Example trace (C) and quantification (D) of neutralization of BDNF-induced aggregation by the mab#9 antibody (2.5 $\mu\text{g/mL}$). IgG_{2B} was used as an isotype control (2.5 $\mu\text{g/mL}$). Specificity of mab#9 was confirmed by absence of effect on platelet responses to collagen 1 $\mu\text{g/mL}$, TRAP 3 μM and arachidonic acid 10 μM ; results are representative of 5 independent experiments. Repeated-measures ANOVA test, $p<0.0001$; BDNF 750 nM vs BDNF 750 nM in presence of mab#9, $p<0.0001$. Example trace (E) and quantification (F) of BDNF-induced platelet aggregation in the presence of inhibitors of secondary mediators (30 μM aspirin, 1 μM AR-C66096 and 9 μM eptifibatide); results are representative of 5 independent experiments. Repeated-measures ANOVA, $p<0.0001$; compared to BDNF 750 nM: inhibition with aspirin $p=0.001$, inhibition with AR-C66096, $p=0.0002$ and inhibition with eptifibatide, $p<0.0001$. Arrowheads indicate the time point at which the agonist was added. Data are presented as median \pm IQR.

Figure 2: Platelets express truncated TrkB receptors

(A) Immunoblotting of TrkB from human platelet lysates (30 μg) obtained from 4 different healthy volunteers. TrkB-Fc fusion protein (3 ng, expected molecular weight 120 kDa) and human cortex whole cell lysate (3 μg , expected molecular weight at 95 kDa for truncated TrkB and at 140 kDa for full-length TrkB receptor) were used as positive controls. β -actin was used as a loading control.

(B) Flow cytometry of surface and intracellular TrkB on washed human platelets; platelets

expressed TrkB both on their surface (TrkB+: 27% ± 11%, n=8) and their intracellular compartment (TrkB+: 82% ± 9%, n=6). PBMCs were used as positive controls for TrkB labeling both on the surface (TrkB+: 45% ± 15%, n=4) and the intracellular compartment (TrkB+: 88% ± 6%, n=4). IgG₁ was used as isotype control.

(C) Confocal microscopy of platelets expressing TrkB. Washed platelets and PBMCs were labeled with anti-TrkB antibody and Alexa Fluor488. Nuclei of PBMCs were stained with DAPI and IgG_{2B} was used as an isotype control. Images were visualized at RT with Zeiss LSM510 with 100x objective lense and 3x magnification. Scale bar: 5µm. Images are representative of 3 independent experiments.

Figure 3: Known ligands of TrkB induce platelet aggregation

Example trace **(A)** and quantification **(B)** of platelet aggregation in response to 750 nM BDNF, 750 nM NT4 and 10 µg/mL TrkB-activating antibody (n=5). IgG₁ was used as an isotype control (10 µg/mL). Repeated-measures ANOVA, p=0.005; compared to vehicle: BDNF 750 nM p<0.0001, NT4 750 nM p<0.0001 and TrkB-activating antibody p=0.059. Arrowheads indicate the time point at which the agonist was added. Data are presented as median ± IQR.

Figure 4: BDNF-induced aggregation activates a kinase-dependent pathway

(A) Time series of tyrosine phosphorylation in washed platelets stimulated with BDNF (750 nM). **(B)** BDNF-induced platelet aggregation in the presence of TrkB kinase domain inhibitors (Cyclotraxin B 50 µM; GNF5837 1 µM and 30 µM) as well as broad spectrum kinase inhibitors (K252a 10 µM and PP2 10 µM). **(C)** Collagen at 1 µg/ml was used as control (n=5). Repeated-measures ANOVA, p<0.0001; compared to BDNF: no inhibition observed with cyclotraxin B 50

μM and GN5837 1 μM ($p>0.05$); inhibition of BDNF with GNF5837 30 μM $p=0.0025$, inhibition with K252a 10 μM $p=0.004$ and inhibition with PP2 10 μM $p=0.001$.

(D) BDNF-induced aggregation in the presence of SFK inhibitors (PRT318 10 μM and Dasatinib 10 μM ; $n=5$). **(E)** Collagen at 1 $\mu\text{g/ml}$ was used as control ($n=5$). Repeated-measures ANOVA, $p=0.23$; inhibition of BDNF with Dasatinib 10 μM $p=0.34$, inhibition with PRT318 10 μM $p=0.20$. Data are presented as median \pm IQR.

Figure 5: BDNF-induced aggregation recruits Rho GTPase Rac1 and activates PKC and PI3K/Akt pathway

(A) BDNF-induced aggregation in the presence of rho GTPase inhibitors (zoledronic acid 50 μM , NSC23766 10 μM and Y27632 10 μM ; $n=5$). Repeated-measures ANOVA, $p<0.0001$; inhibition of BDNF with zoledronic acid $p=0.0002$, inhibition with NSC23766 $p=0.005$ and inhibition with Y27632 $p=0.53$. **(B)** Collagen 1 $\mu\text{g/mL}$ was used as a control. Data are presented as median \pm IQR.

(C) BDNF-induced aggregation in the presence of PI3K/Akt and PKC inhibitors (wortmannin 100 nM and BIM-1 10 μM ; $n=5$). Repeated-measures ANOVA, $p<0.0001$; inhibition of BDNF with wortmannin $p<0.0001$, inhibition with BIM-1 $p<0.0001$. **(D)** Collagen 1 $\mu\text{g/mL}$ was used as control ($n=5$). Data are presented as median \pm IQR.

(E) Phosphorylation of Akt, STAT3 and PLC- γ_2 in the presence of rho GTPase inhibitors (zoledronic acid 50 μM , NSC23766 10 μM and Y27632 10 μM) and PI3K and PKC inhibitors (wortmannin 100 nM and BIM-1 10 μM). All phosphoblots are representative of 3 independent experiments.

Figure 6: $\alpha 2$ -macroglobulin binds to BDNF preventing BDNF-induced aggregation in platelet-rich plasma. Representative trace **(A)** and quantification **(B)** of platelet aggregation in response to 750 nM of BDNF in platelet-rich plasma (0%-100% plasma concentration, as

indicated) (n=3). Repeated-measures ANOVA, p=0.0003; compared to 0% of plasma: 25% plasma p=0.001, 50% plasma p=0.002, 75% plasma p=0.001 and 100% plasma p=0.005. Arrowheads indicate the time point at which the agonist was added. Data are presented as median \pm IQR.

(C) Immunoprecipitation of PRP supernatant pre-incubated with 750 nM of BDNF (IP: anti- α 2-macroglobulin and anti-BDNF, WB anti- α 2-macroglobulin and anti-BDNF). BDNF-containing plasma was used as a control. Blots are representative of 3 independent experiments.

Figure 7: Platelets release inflammatory and angiogenic cytokines in response to BDNF.

Profiles of cytokine release by platelets activated with CRP (1 μ g/mL), PAR-4 amide (100 μ M), TRAP (3 μ M), or BDNF (750 nM). Vehicle was used as a shear stress control. IL-8, interleukin 8; ENA-78, epithelial neutrophil-activating protein 78; PF4, platelet factor 4; TARC, thymus-and activation-regulation chemokine; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; VEGF-C, vascular endothelial growth factor C; RANTES, regulated on activation, normal T cells expressed and secreted; PDGF, platelet-derived growth factor; SDF-1, stromal cell-derived factor 1; ANGPT-1, angiopoietin 1. Shown are mean \pm SE of data from platelets isolated from 4 healthy volunteers.

Figures :

Figure 1

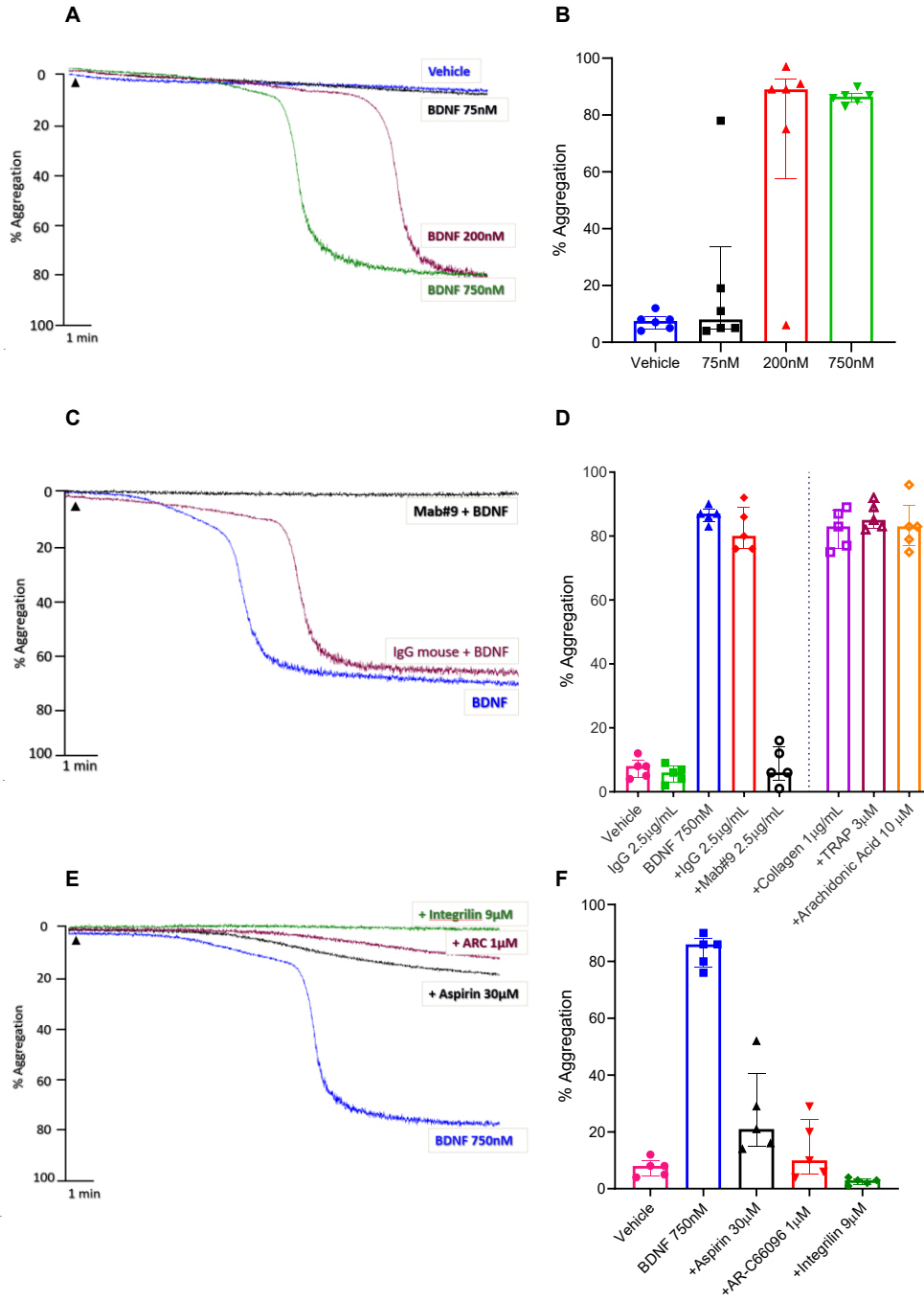
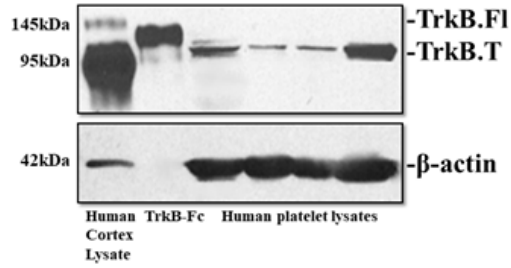
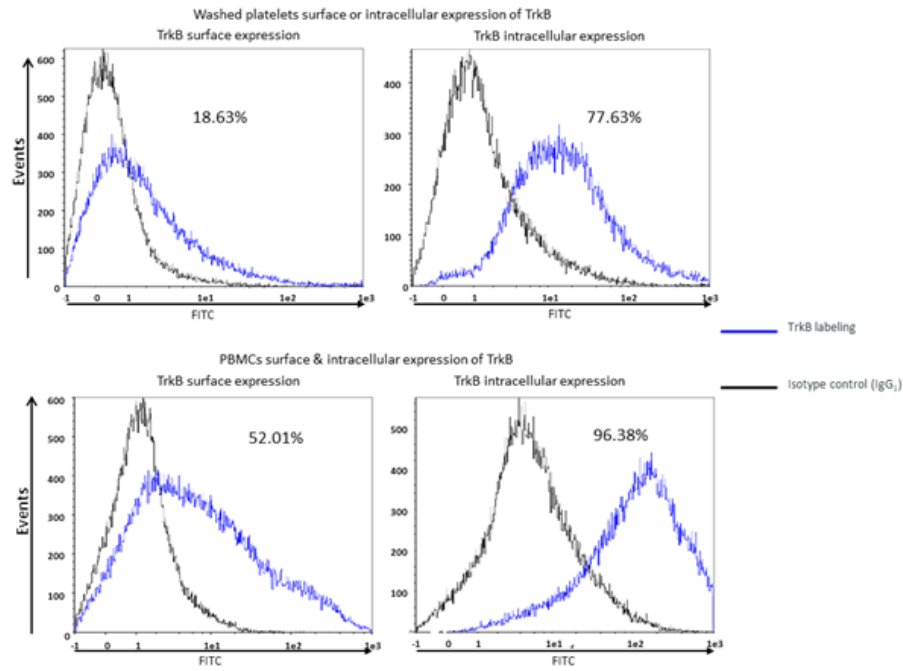


Figure 2

A



B



C

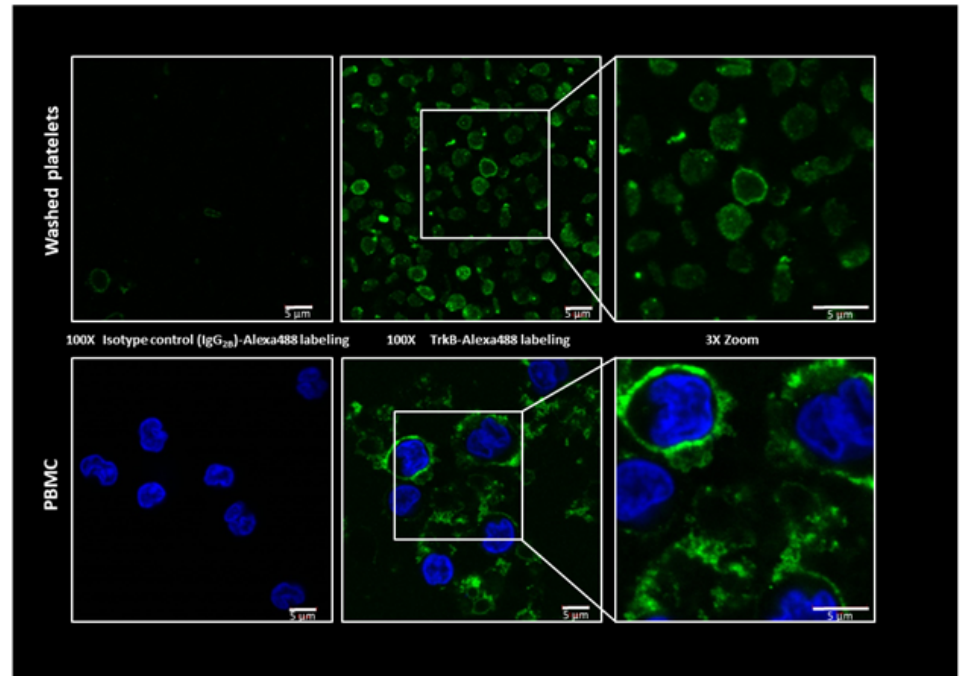


Figure 3

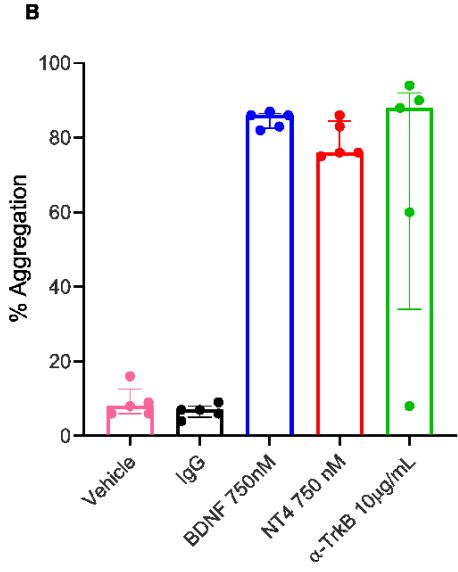
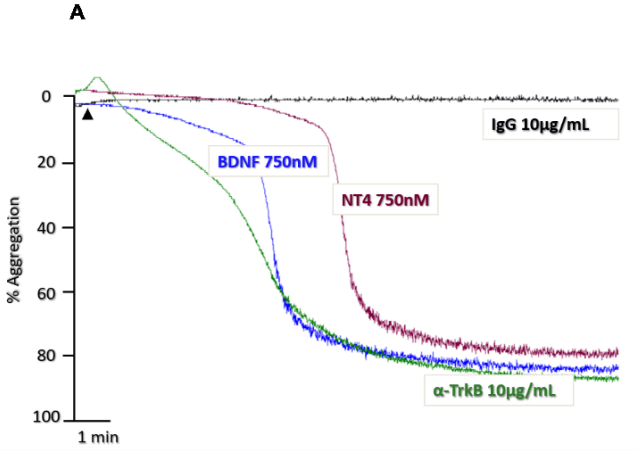


Figure 4

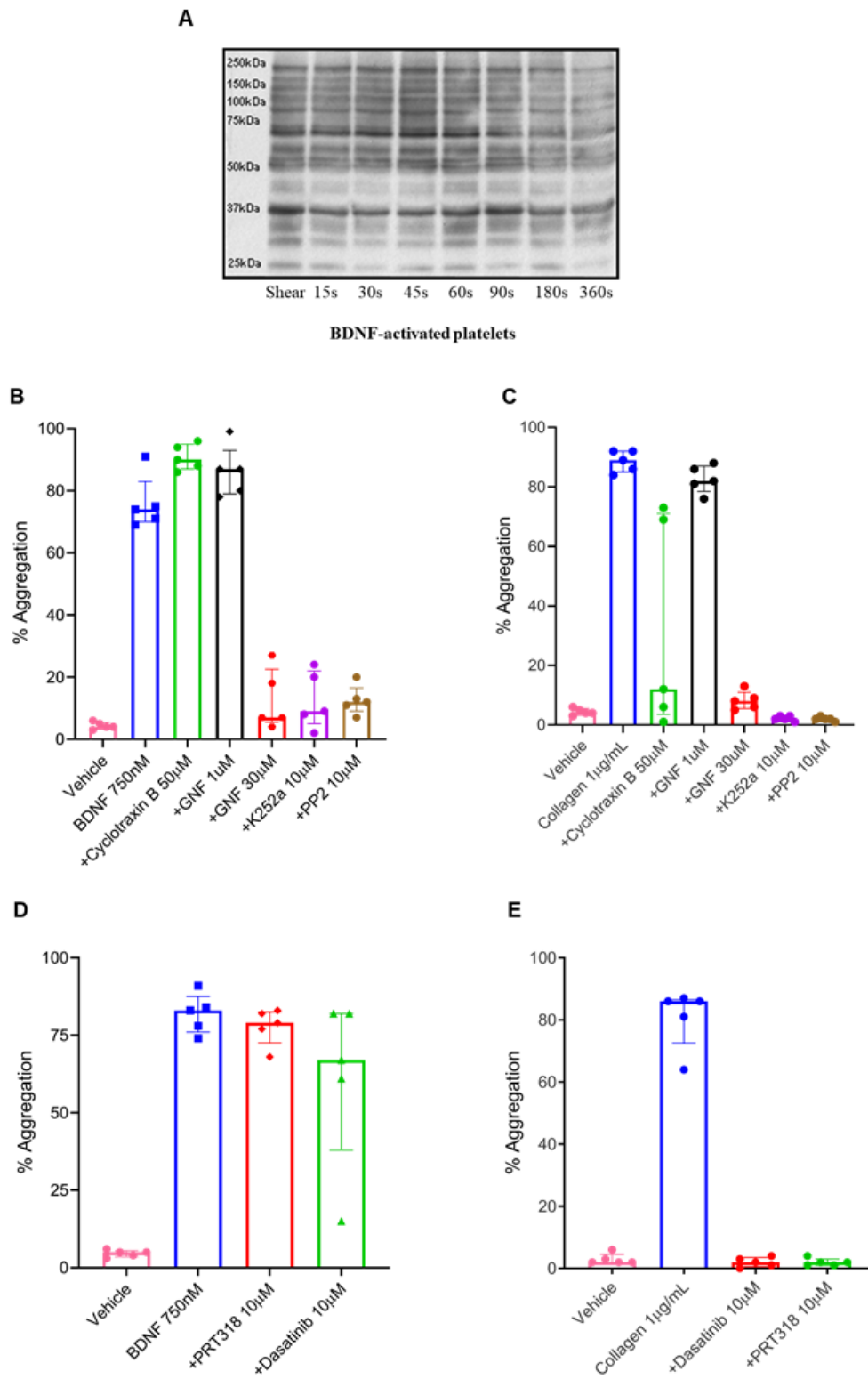


Figure 5

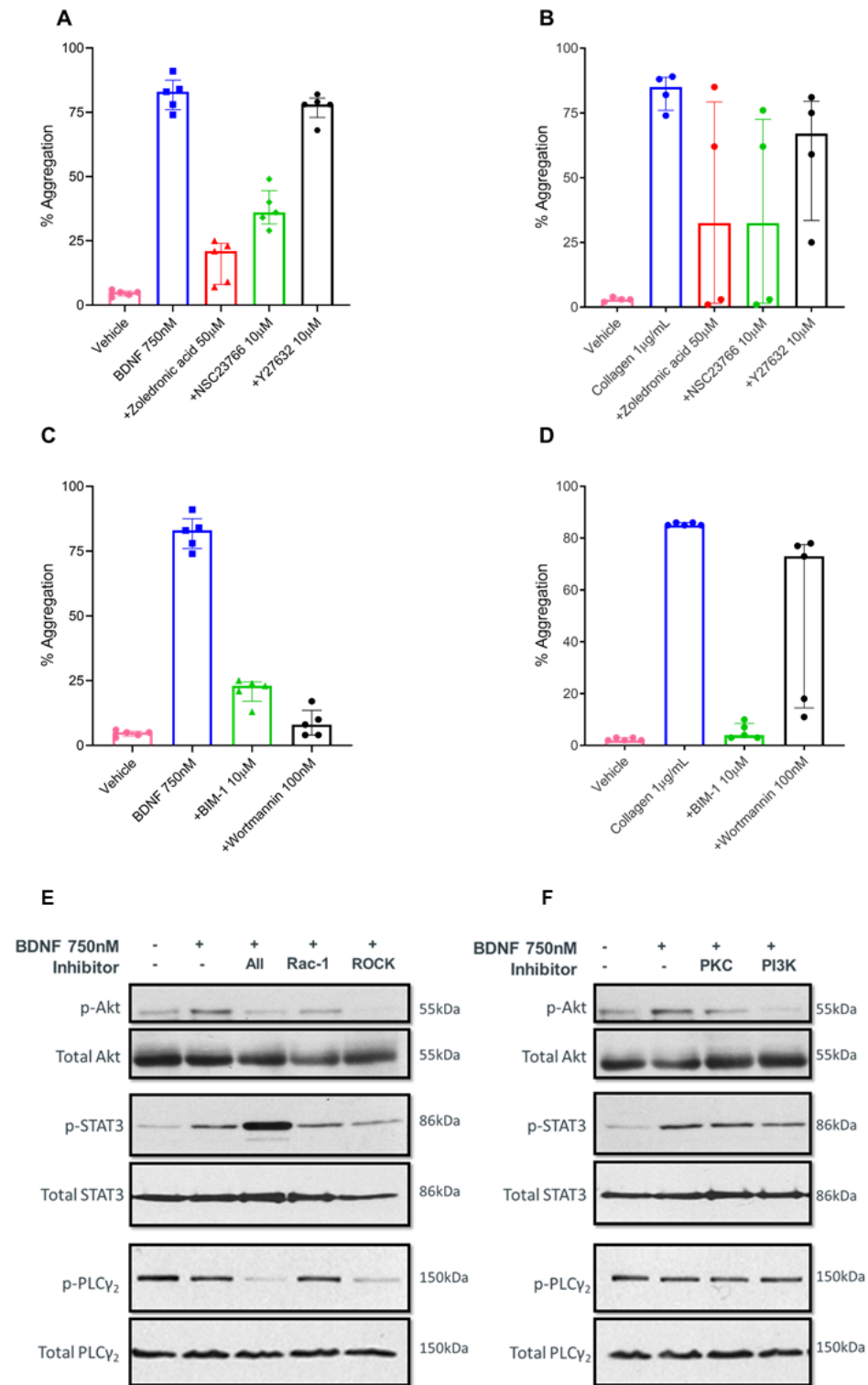
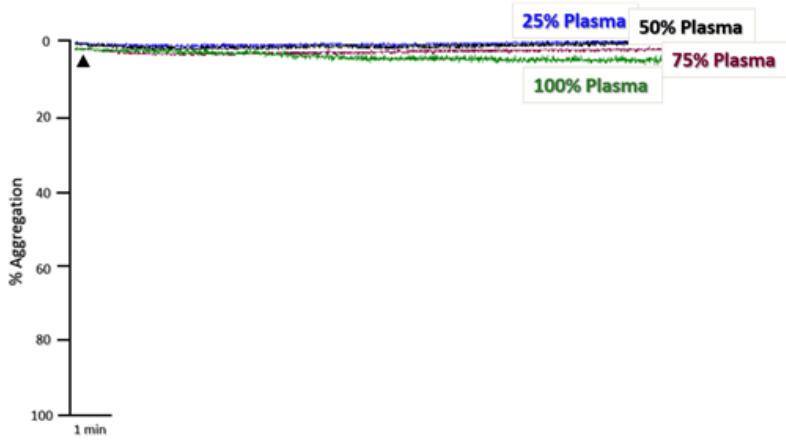
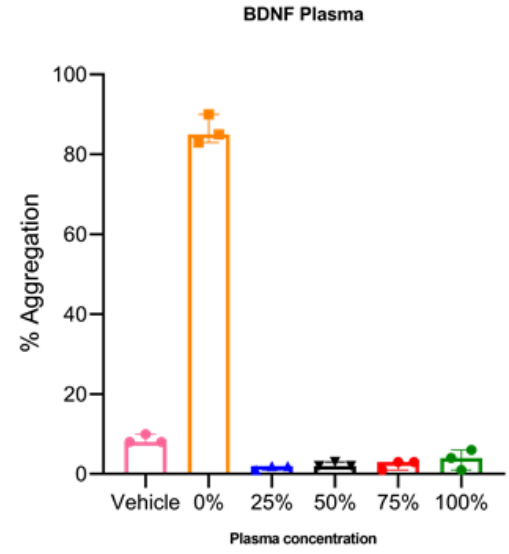


Figure 6

A



B



C

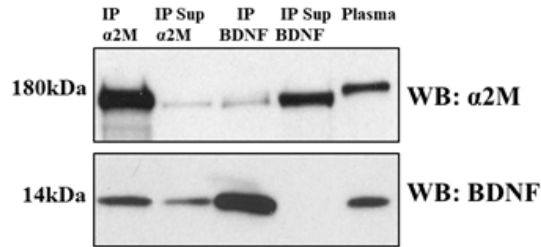
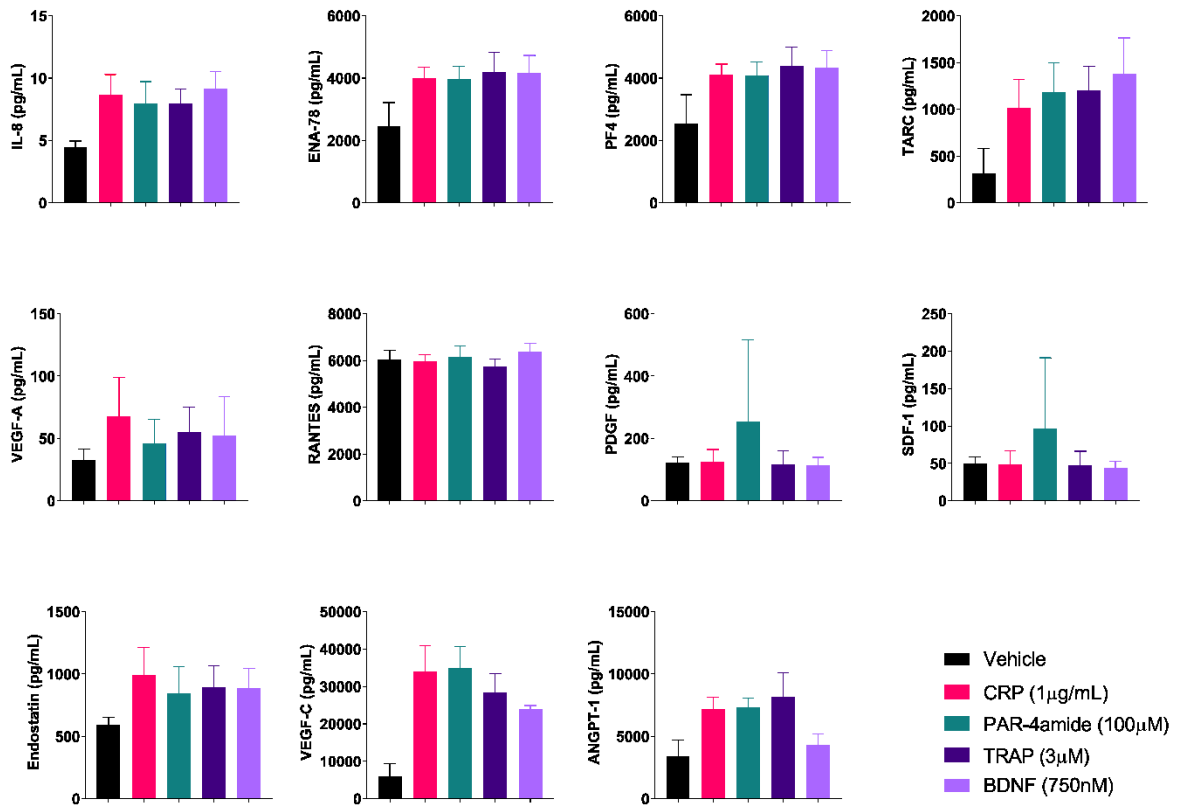


Figure 7



Discussion

Résumé des résultats majeurs

Notre hypothèse de recherche énonçait que, tout comme dans le cerveau, le BDNF joue un rôle autocrine et paracrine dans les plaquettes humaines. Ce projet de recherche a réussi à démontrer que BDNF induit une agrégation plaquettaire complète, biphasique et irréversible dans les plaquettes lavées de volontaires sains via la forme tronqué du récepteur TrkB. Cette agrégation active la RhoGTPase Rac1 qui agit comme protéines adaptatrice pour le récepteur tronqué. En aval, Rac1 active la phosphorylation de la protéine kinase C ainsi que la voie signalétique PI3K/Akt. Cette réponse au BDNF induit la relâche de plusieurs cytokines et protéines tant proinflammatoires que proangiogéniques. Cette relâche laisse penser que, similairement au cerveau, le BDNF a une double fonction autocrine/paracrine dans la fonction plaquettaire. Ce projet a aussi démontré que BDNF n'induit pas d'agrégation plaquettaire en plasma riche en plaquettes suggérant la présence d'une protéine plasmatique inhibitrice. Cette inhibition d'agrégation semble être menée par l' α 2-macroglobuline.

BDNF comme activateur plaquettaire via TrkB

La découverte que le BDNF induit une agrégation plaquettaire active, et non une agglutination passive, partiellement dépendante des médiateurs secondaires (ADP et TXA₂) nous a menés à penser qu'un récepteur spécifique de BDNF était présent sur les plaquettes. Cette hypothèse a été renforcée par la réponse plaquettaire à la neurotrophine NT4 et à l'anticorps activateur du TrkB, suggérant que les plaquettes pourraient exprimer le récepteur canonique de BDNF, soit le TrkB. La présence de ce récepteur a été confirmée par immunobuvardage, microscopie confocale et cytométrie de flux. Ces résultats nous permettent donc de rapporter, pour la première fois, la présence du TrkB dans les plaquettes de volontaires sains. Cependant, ce n'est pas la première fois que la présence de ce récepteur a été étudiée dans les plaquettes ou leurs précurseurs. Deux publications qui ont rapporté l'absence du TrkB n'avait montré aucun résultat pour appuyer leur conclusion. (194, 198) En revanche, Yang et al ont suggéré l'implication du circuit BDNF/TrkB dans l'activation plaquettaire chez des rats atteints de tumeur hépatique.(195) De plus, les mégacaryocytes humains étaient positifs pour le TrkB

tronqué rendant la présence de ce dernier très plausible sur les plaquettes et corroborant nos résultats. (197)

Signalisation neuronale vs plaquettaire induite par le BDNF

Pour la signalisation du BDNF, les voies activées au niveau plaquettaire sont très similaires aux voies activées dans les neurones et les cellules gliales exprimant la forme tronquée de TrkB. Dans le cerveau, BDNF active la voie des rho GTPases via Rac1, une voie responsable du réarrangement du cytosquelette d'actine.(199) Il va aussi activer la voie PI3k/Akt et la voie PKC qui sont toutes les deux responsables de la plasticité synaptique et la survie cellulaire en activant la transcription des gènes neuroprotecteurs via la phosphorylation de STAT3.(200) Dans les plaquettes, la voie PI3K/Akt est responsable de la sécrétion granulaire et l'activation de l'intégrine α IIb β 3, les rhoGTPases sont aussi responsable de la sécrétion des granules et la voie de la PKC induit un réarrangement du cytosquelette d'actine, la synthèse de la TXA₂ et l'étalement des plaquettes.(201-203) BDNF active aussi la phosphorylation de STAT3. Pendant longtemps, le rôle non-génomique de STAT3 et plusieurs facteurs de transcription dans les plaquettes était mal compris vu leur nature anucléée. Ces dernières années, le rôle de la STAT3 commence à émerger dans la biologie plaquettaire. En effet, elle semble être responsable de l'activation de la p-sélectine et l'agrégation plaquettaire.(202) De plus, elle semble être impliquée dans un *crosstalk* entre les cytokines pro-inflammatoire et l'activation plaquettaire. En effet, Zhou et al ont démontré que l'activation plaquettaire induite par IL-6 active STAT3 et potentialise l'activation plaquettaire induite par le collagène. En d'autres termes, l'inflammation augmente l'hyperactivité plaquettaire via l'activation de STAT3.(51) Étant donné que BDNF active aussi STAT3, son rôle dans l'inflammation ne semble pas anodin puisqu'il a déjà été investigué dans le cerveau.(204) Cela et notre hypothèse sur le rôle paracrine du BDNF dans les plaquettes nous a poussé à investiguer le profil sécrétoire du BDNF.

Sécrétion plaquettaire induite par le BDNF

Le profil de sécrétion plaquettaire induit par le BDNF semble avoir une tendance pro-inflammatoire et proangiogénique. Le rôle pro-inflammatoire du BDNF dans le système cardiovasculaire a déjà été rapporté auparavant et le rôle des plaquettes dans l'inflammation est bien reconnu.(205) Le fait que BDNF soit présent en très grande concentration dans les

plaquettes, qu'il soit relâché lors de l'activation plaquettaire et qu'il induit la relâche de facteurs proangiogéniques semble créer un environnement idéal pour l'angiogenèse. Dans un contexte physiologique, le rôle proangiogénique du BDNF dans le cerveau semble être bénéfique pour la réparation des vaisseaux et l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. À l'inverse, dans un contexte pathologique le circuit BDNF/TrkB promeut la progression de différentes tumeurs ainsi que leur propagation satellitaire par métastases.(206-208) La relâche de BDNF dans la circulation par les plaquettes pourrait donc tant amener des bénéfices, notamment dans la guérison des lésions vasculaires et nerveuses, la protection contre les dommages liés à l'ischémie et l'hypoxie, et la promotion de la survie des cellules endothéliales vasculaires, que des effets nuisibles, notamment dans l'angiogenèse tumorale et la progression de cancer.

Mécanismes de régulation de BDNF en circulation

Dans le cœur, les plaquettes peuvent être un vecteur thérapeutique précieux pour la relâche du BDNF au site d'infarctus et la revascularisation du site atteint. Cependant, dans une tumeur, l'action tant autocrine que paracrine du BDNF n'est pas nécessairement désirée. Vu la complexité du corps humain, il semblait évident qu'un mécanisme de protection était mis en place. En effet, la réponse au BDNF est complètement inexistante en plasma riche en plaquettes ce qui suggère la présence d'une ou de plusieurs protéines plasmatiques qui pourraient lier le BDNF et réduire sa biodisponibilité. Nos résultats nous ont permis de démontrer que le BDNF est séquestrée par l' α 2-macroglobuline (α 2M). Cette découverte n'est pas surprenante puisque cette protéine plasmatique est connue pour son rôle inhibiteur. Dans le cerveau, elle lie irréversiblement plusieurs neurotrophines dont le NGF et l'empêche de se lier à son récepteur TrkA.(209, 210) En circulation, l' α 2M est un inhibiteur de protéinases puisqu'il inhibe le clivage de la prothrombine en thrombine et ainsi affecte la coagulation.(209-212) Pour consolider le tout, l' α 2M semble avoir un effet antitumoral et une réduction des niveaux de l' α 2M est corrélée à un risque élevé de développer une tumeur ou un cancer.(213-215) Ceci est cohérent avec les effets pro-tumoraux du circuit BDNF/TrkB puisque la réduction de la biodisponibilité du BDNF par l' α 2M bloque l'activation de ce circuit et aurait un effet inhibiteur sur la survenue de tumeurs. Dans une perspective thrombotique, le fait que l' α 2M régule la biodisponibilité du BDNF assure une protection thrombotique et limite son action sur les plaquettes immobilisées au site de lésion vasculaire. Le tout renforce le besoin d'investigations

plus poussées dans la biodisponibilité de BDNF en circulation, les cinétiques d'association et de dissociation avec l' α 2M et/ou d'autres protéines plasmatiques, et l'interaction entre l'activation plaquettaire, la relâche de BDNF et sa capacité à lier ces cellules cibles.

Les plaquettes comme vecteurs de molécules neuroactives

Finalement, ce projet de recherche n'est pas le premier à investiguer l'effet de molécules neuronales dans les plaquettes. Jones et al. ont étudié l'effet des tachykinines, des neurotransmetteurs classiques, sur la fonction plaquettaire.(216) Ces molécules ont des rôles similaires au BDNF, car elles sont impliqués dans l'inflammation, la contraction cardiaque et médient leur action d'une façon autocrine/paracrine.(217) Leurs recherches permettent de démontrer que les plaquettes emmagasinent des tachykinines et que ces dernières sont relâchées après une activation plaquettaire tout comme le BDNF. (216) Non seulement ces tachykinines sont relâchées, mais elles lient leurs récepteurs à la surface plaquettaire et induire une agrégation dépendante des médiateurs secondaires et inhibable par les thérapies antiplaquettaires actuelles (aspirine et clopidogrel). Leurs résultats leur permettent de dire que l'agrégation induite par les tachykinines est d'une importance significative puisqu'une fois les tachykinines inhibées, la formation et la taille du thrombus étaient réduites *in vitro*. *In vivo*, les tachykinines jouent un rôle dans l'hémostase en réduisant la formation de thrombi dans des modèles murins de thrombose.(216) Cette similitude frappante avec nos conclusions sur le BDNF et l'agrégation induite par NT4 laisseraient croire qu'il existe un lien fondamental entre les plaquettes et la santé cognitive. D'ailleurs plusieurs groupes ont corrélé l'activation plaquettaire avec le déclin cognitif, mais aucun n'a étudié les mécanismes sous-jacents à cette corrélation.(218-220)

La sérotonine est un autre exemple qui consolide l'hypothèse du lien fondamental entre les plaquettes et la santé cognitive. En 1954, on découvrit que les plaquettes étaient un réservoir important de sérotonine.(221) Depuis, les différents mécanismes d'emmagasinement et de relâche de cette dernière ont été étudiés extensivement. En effet, les plaquettes peuvent être activées par la sérotonine puisqu'elles possèdent les récepteurs de cette dernière à leur surfaces.(222) De plus, elles expriment le transporteur de la sérotonine (SERT) permettant son emmagasinement dans les granules denses plaquettaires.(83) Similaire à nos résultats sur le BDNF, la sérotonine a un effet procoagulant puisqu'elle peut activer les plaquettes, mais aussi potentialiser l'activation induite par des agonistes classiques comme l'ADP et l'épinéphrine.(223, 224)

À l'inverse, des molécules actives spécifiquement sur les plaquettes et les mégacaryocytes, telle la TPO, ont également des effets neuronaux. D'un côté, la TPO réduit les dommages d'ischémie cérébrale et améliore la fonction cérébrale post-ischémie en inhibant la métalloprotéinase MMP-9 et en protégeant la barrière hémato-encéphalique chez l'animal.(225) D'un autre, elle a un effet proapoptique sur les nouveaux neurones via la rhoGTPase Ras et elle est inhibée par la présence de neurotrophines. Ces résultats suggèrent que la TPO aide à la sélection des neurones en développement. (226)

Ces liens étroits entre la physiologie neuronale et plaquettaire laissent entrevoir des possibilités d'utiliser les plaquettes, facilement disponibles en circulation, comme biomarqueurs de la santé cognitive, voire même de moduler l'activité des plaquettes pour les utiliser comme vecteur biologique de facteurs neuroactifs. La recherche sur l'interface neuro-vasculaire devra dans le futur tenir compte de la contribution plaquettaire à l'homéostasie de ce biosystème complexe.

Conclusion

En conclusion, ce projet de recherche a permis de démontrer l'effet autocrine/paracrine du BDNF sur les plaquettes via la forme tronquée du récepteur TrkB. Par sa fonction paracrine, BDNF permet la relâche de plusieurs facteurs inflammatoires et angiogéniques. Biologiquement, la pertinence du BDNF plaquettaire reste à élucider. Une investigation sur la pertinence de l'agrégation plaquettaire induite par le BDNF serait des plus intéressantes afin de comprendre quel rôle ce dernier joue dans la thrombose. Il serait aussi pertinent d'évaluer l'implication de l' α 2M dans la régulation de l'activité plaquettaire en réponse au BDNF et les conséquences physiologiques d'une telle régulation. De plus, décortiquer la nature de la sécrétion granulaire induite par le BDNF et comprendre les mécanismes la régulant serait d'une pertinence clinique considérable dans un futur où les plaquettes pourraient être utilisées comme un vecteur thérapeutique. En effet, en comprenant la pertinence biologique du BDNF dans les plaquettes et sur les différents systèmes, il serait possible d'utiliser les plaquettes comme un vecteur de transport biologique de BDNF et d'autres substances neuroactives, notamment dans la prévention et le traitement de maladies neurodégénératives d'origine vasculaire.

Références

1. Kaushansky K. Thrombopoietin. *The New England journal of medicine*. 1998;339(11):746-54. Epub 1998/09/10.
2. Guo T, Wang X, Qu Y, Yin Y, Jing T, Zhang Q. Megakaryopoiesis and platelet production: insight into hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Stem cell investigation*. 2015;2:3. Epub 2015/01/01.
3. Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3(8):1717-24. Epub 2005/08/17.
4. Geddis AE. Megakaryopoiesis. *Seminars in hematology*. 2010;47(3):212-9. Epub 2010/07/14.
5. Li W, Morrone K, Kambhampati S, Will B, Steidl U, Verma A. Thrombocytopenia in MDS: epidemiology, mechanisms, clinical consequences and novel therapeutic strategies. *Leukemia*. 2016;30(3):536-44. Epub 2015/10/27.
6. Fielder P, Gurney A, Stefanich E, Marian M, Moore M, Carver-Moore K, et al. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood*. 1996;87(6):2154-61.
7. Glynn LE. Living Blood Cells and their Ultra Structure. *Immunology*. 1974;27(4):745.
8. Falet H. Anatomy of the Platelet Cytoskeleton. Dans: Gresele P, Kleiman NS, Lopez JA, Page CP, rédacteurs. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 139-56.
9. Cerecedo D. Platelet cytoskeleton and its hemostatic role. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2013;24(8):798-808. Epub 2013/09/14.
10. Behnke O. Coated pits and vesicles transfer plasma components to platelet granules. *Thrombosis and haemostasis*. 1989;62(2):718-22. Epub 1989/09/29.
11. Hanby HA, Bao J, Noh JY, Jarocha D, Poncz M, Weiss MJ, et al. Platelet dense granules begin to selectively accumulate mepacrine during proplatelet formation. *Blood advances*. 2017;1(19):1478-90. Epub 2017/09/25.
12. Italiano JE, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes. *The Journal of Cell Biology*. 1999;147(6):1299-312.
13. Yadav S, Storrie B. The cellular basis of platelet secretion: Emerging structure/function relationships. *Platelets*. 2017;28(2):108-18. Epub 2016/12/25.
14. Chacon-Fernandez P, Sauberli K, Colzani M, Moreau T, Ghevaert C, Barde YA. Brain-derived Neurotrophic Factor in Megakaryocytes. *J Biol Chem*. 2016;291(19):9872-81. Epub 2016/03/24.

15. Sharda A, Flaumenhaft R. The life cycle of platelet granules. *F1000Research*. 2018;7:236. Epub 2018/03/22.
16. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thrombosis research*. 1999;95(1):1-18. Epub 1999/07/14.
17. Rumbaut RE, Thiagarajan P. *Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences

Copyright (c) 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences.; 2010.

18. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;102(2):248-57. Epub 2009/08/05.
19. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thrombosis research*. 2012;129(3):220-4. Epub 2011/12/20.
20. Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2011;89(2):109-21. Epub 2010/11/09.
21. Berndt MC, Metharom P, Andrews RK. Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia*. 2014;20 Suppl 4:15-22. Epub 2014/04/26.
22. Soh UJ, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors. *British journal of pharmacology*. 2010;160(2):191-203. Epub 2010/04/29.
23. Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest*. 2003;124(3 Suppl):18S-25S. Epub 2003/09/13.
24. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thrombosis research*. 2012;129(3):250-6. Epub 2011/12/06.
25. Esmon CT, Owen WG, Jackson CM. The conversion of prothrombin to thrombin. V. The activation of prothrombin by factor Xa in the presence of phospholipid. *J Biol Chem*. 1974;249(24):7798-807. Epub 1974/12/25.
26. Nieman MT. Protease-activated receptors in hemostasis. *Blood*. 2016;128(2):169-77. Epub 2016/04/30.
27. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*. 2001;413(6851):74-8. Epub 2001/09/07.
28. Stalker TJ, Newman DK, Ma P, Wannemacher KM, Brass LF. Platelet signaling. *Handbook of experimental pharmacology*. 2012(210):59-85. Epub 2012/08/25.
29. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(12):2341-9. Epub 2010/11/13.
30. Puri RN, Colman RW. ADP-induced platelet activation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 1997;32(6):437-502. Epub 1997/01/01.

31. Gurbel PA, Kuliopulos A, Tantry US. G-protein-coupled receptors signaling pathways in new antiplatelet drug development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35(3):500-12. Epub 2015/01/31.
32. Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(3):340-5. Epub 2004/02/03.
33. Smyth EM. Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clinical lipidology*. 2010;5(2):209-19. Epub 2010/06/15.
34. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation research*. 2006;99(12):1293-304. Epub 2006/12/13.
35. Vinge E. Arachidonic acid-induced platelet aggregation and prostanoid formation in whole blood in relation to plasma concentration of indomethacin. *European journal of clinical pharmacology*. 1985;28(2):163-9. Epub 1985/01/01.
36. Sangkuhl K, Shuldiner AR, Klein TE, Altman RB. Platelet aggregation pathway. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011;21(8):516-21. Epub 2010/10/13.
37. Friedman EA, Ogletree ML, Haddad EV, Boutaud O. Understanding the role of prostaglandin E2 in regulating human platelet activity in health and disease. *Thrombosis research*. 2015;136(3):493-503. Epub 2015/06/17.
38. Italiano JE, Jr., Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 2008;111(3):1227-33. Epub 2007/10/27.
39. Dutting S, Bender M, Nieswandt B. Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! *Trends in pharmacological sciences*. 2012;33(11):583-90. Epub 2012/08/21.
40. Rabie T, Varga-Szabo D, Bender M, Pozgaj R, Lanza F, Saito T, et al. Diverging signaling events control the pathway of GPVI down-regulation in vivo. *Blood*. 2007;110(2):529-35. Epub 2007/03/22.
41. Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, et al. The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *The EMBO journal*. 1997;16(9):2333-41. Epub 1997/05/01.
42. Kim S, Mangin P, Dangelmaier C, Lillian R, Jackson SP, Daniel JL, et al. Role of phosphoinositide 3-kinase beta in glycoprotein VI-mediated Akt activation in platelets. *J Biol Chem*. 2009;284(49):33763-72. Epub 2009/08/25.
43. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3(8):1752-62. Epub 2005/08/17.
44. Fu J, Xia L. CLEC-2 and podoplanin, partners again. *Blood*. 2016;127(13):1629-30. Epub 2016/04/02.
45. May F, Hagedorn I, Pleines I, Bender M, Vogtle T, Eble J, et al. CLEC-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. *Blood*. 2009;114(16):3464-72. Epub 2009/07/31.

46. Bergmeier W, Stefanini L. Platelet ITAM signaling. *Current opinion in hematology*. 2013;20(5):445-50. Epub 2013/08/08.
47. Newman DK. CLEC-2: the inside story. *Blood*. 2015;125(26):3972-4. Epub 2015/06/27.
48. Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends in molecular medicine*. 2004;10(4):171-8. Epub 2004/04/03.
49. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*. 2000;102(16):1931-6. Epub 2000/10/18.
50. Chen J, Herceg-Harjacek L, Groopman JE, Grabarek J. Regulation of platelet activation in vitro by the c-Mpl ligand, thrombopoietin. *Blood*. 1995;86(11):4054-62. Epub 1995/12/01.
51. Zhou Z, Gushiken FC, Bolgiano D, Salsbery BJ, Aghakasiri N, Jing N, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates collagen-induced platelet aggregation independently of its transcription factor activity. *Circulation*. 2013;127(4):476-85. Epub 2012/12/26.
52. van der Meer JH, van der Poll T, van 't Veer C. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood*. 2014;123(16):2460-9. Epub 2014/03/07.
53. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nature medicine*. 2001;7(2):215-21. Epub 2001/02/15.
54. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(2):237-46. Epub 2005/01/15.
55. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Science signaling*. 2009;2(72):re3. Epub 2009/05/28.
56. Yamamoto N, Ikeda H, Tandon NN, Herman J, Tomiyama Y, Mitani T, et al. A platelet membrane glycoprotein (GP) deficiency in healthy blood donors: Naka- platelets lack detectable GPIV (CD36). *Blood*. 1990;76(9):1698-703. Epub 1990/11/01.
57. Lee K, Godeau B, Fromont P, Plonquet A, Debili N, Bachir D, et al. CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans. *Transfusion*. 1999;39(8):873-9. Epub 1999/09/30.
58. Nergiz-Unal R, Lamers MM, Van Kruchten R, Luiken JJ, Cosemans JM, Glatz JF, et al. Signaling role of CD36 in platelet activation and thrombus formation on immobilized thrombospondin or oxidized low-density lipoprotein. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9(9):1835-46. Epub 2011/06/24.
59. Kuijpers MJ, de Witt S, Nergiz-Unal R, van Kruchten R, Korporaal SJ, Verhamme P, et al. Supporting roles of platelet thrombospondin-1 and CD36 in thrombus formation on collagen. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(6):1187-92. Epub 2014/03/29.
60. Bennett JS, Berger BW, Billings PC. The structure and function of platelet integrins. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7 Suppl 1:200-5. Epub 2009/07/28.

61. Payrastre B, Missy K, Trumel C, Bodin S, Plantavid M, Chap H. The integrin alpha IIb/beta 3 in human platelet signal transduction. *Biochemical pharmacology*. 2000;60(8):1069-74. Epub 2000/09/29.
62. Joo SJ. Mechanisms of Platelet Activation and Integrin α II β 3. *Korean circulation journal*. 2012;42(5):295-301. Epub 2012/06/16.
63. Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell*. 2000;101(1):47-56. Epub 2000/04/25.
64. Santoro SA. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell*. 1986;46(6):913-20. Epub 1986/09/12.
65. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, et al. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO journal*. 2001;20(9):2120-30. Epub 2001/05/02.
66. Jung SM, Moroi M. Platelets interact with soluble and insoluble collagens through characteristically different reactions. *J Biol Chem*. 1998;273(24):14827-37. Epub 1998/06/17.
67. Jung SM, Moroi M. Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1). *J Biol Chem*. 2000;275(11):8016-26. Epub 2000/03/14.
68. Maupin B. [Findings on platelet granules; precipitable fraction of a platelet lysate]. *Le Sang*. 1959;30(2):114-43. Epub 1959/01/01. *Recherches sur les granules plaquettaire; fraction sedimentable d'un lysat plaquettaire*.
69. Rinehart JF. Electron microscopic studies of sectioned white blood cells and platelets; with observations on the derivation of specific granules from mitochondria. *American journal of clinical pathology*. 1955;25(6):605-19. Epub 1955/06/01.
70. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews*. 2009;23(4):177-89. Epub 2009/05/20.
71. Grinstein S, Furuya W. The electrochemical H⁺ gradient of platelet secretory alpha-granules. Contribution of a H⁺ pump and a Donnan potential. *J Biol Chem*. 1983;258(12):7876-82. Epub 1983/06/25.
72. Grinstein S, Furuya W, Vander Meulen J, Hancock RG. The total and free concentrations of Ca²⁺ and Mg²⁺ inside platelet secretory granules. Measurements employing a novel double null point technique. *J Biol Chem*. 1983;258(24):14774-7. Epub 1983/12/25.
73. Maynard DM, Heijnen HF, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5(9):1945-55. Epub 2007/08/29.
74. Tariket S, Guerrero JA, Garraud O, Ghevaert C, Cognasse F. Platelet alpha-granules modulate the inflammatory response under systemic lipopolysaccharide injection in mice. *Transfusion*. 2019;59(1):32-8. Epub 2018/11/06.
75. Patzelt J, Langer HF. Platelets in angiogenesis. *Current vascular pharmacology*. 2012;10(5):570-7. Epub 2012/02/18.

76. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014;123(18):2759-67. Epub 2014/03/04.
77. Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang L, Hultenby K, Zhu L, et al. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood*. 2011;117(14):3907-11. Epub 2011/02/19.
78. Jonnalagadda D, Izu LT, Whiteheart SW. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood*. 2012;120(26):5209-16. Epub 2012/10/23.
79. Silver MD, Gardner HA. The very dense granule in rabbit platelets. *Journal of ultrastructure research*. 1968;23(5):366-77. Epub 1968/06/01.
80. White JG. Tubular elements in platelet granules. *Blood*. 1968;32(1):148-56. Epub 1968/07/01.
81. Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, Docampo R. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem*. 2004;279(43):44250-7. Epub 2004/08/17.
82. Fitch-Tewfik JL, Flaumenhaft R. Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4:77. Epub 2013/06/28.
83. Omenn GS, Smith LT. A common uptake system for serotonin and dopamine in human platelets. *The Journal of clinical investigation*. 1978;62(2):235-40. Epub 1978/08/01.
84. Fukami MH, Holmsen H, Ugurbil K. Histamine uptake in pig platelets and isolated dense granules. *Biochemical pharmacology*. 1984;33(23):3869-74. Epub 1984/12/01.
85. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood*. 1992;80(1):143-52. Epub 1992/07/01.
86. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2015;13(12):2141-51. Epub 2015/09/24.
87. Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(7):1152-60. Epub 2003/05/10.
88. Curran MJ, Cohen FS, Chandler DE, Munson PJ, Zimmerberg J. Exocytotic fusion pores exhibit semi-stable states. *The Journal of membrane biology*. 1993;133(1):61-75. Epub 1993/04/01.
89. Marks MS. SNARing platelet granule secretion. *Blood*. 2012;120(12):2355-7.
90. Al Hawas R, Ren Q, Ye S, Karim ZA, Filipovich AH, Whiteheart SW. Munc18b/STXBP2 is required for platelet secretion. *Blood*. 2012;120(12):2493-500. Epub 2012/07/14.
91. Schraw TD, Lemons PP, Dean WL, Whiteheart SW. A role for Sec1/Munc18 proteins in platelet exocytosis. *The Biochemical journal*. 2003;374(Pt 1):207-17. Epub 2003/05/30.
92. Shirakawa R, Yoshioka A, Horiuchi H, Nishioka H, Tabuchi A, Kita T. Small GTPase Rab4 regulates Ca²⁺-induced alpha-granule secretion in platelets. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33844-9. Epub 2000/08/12.

93. Flaumenhaft R, Dilks JR, Rozenvayn N, Monahan-Earley RA, Feng D, Dvorak AM. The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood*. 2005;105(10):3879-87. Epub 2005/01/27.
94. Woronowicz K, Dilks JR, Rozenvayn N, Dowal L, Blair PS, Peters CG, et al. The platelet actin cytoskeleton associates with SNAREs and participates in alpha-granule secretion. *Biochemistry*. 2010;49(21):4533-42. Epub 2010/05/01.
95. Zufferey A, Schwartz D, Nolli S, Reny JL, Sanchez JC, Fontana P. Characterization of the platelet granule proteome: evidence of the presence of MHC1 in alpha-granules. *Journal of proteomics*. 2014;101:130-40. Epub 2014/02/20.
96. Bebawy ST, Gorka J, Hyers TM, Webster RO. In vitro effects of platelet factor 4 on normal human neutrophil functions. *Journal of leukocyte biology*. 1986;39(4):423-34. Epub 1986/04/01.
97. Shenkman B, Brill A, Brill G, Lider O, Savion N, Varon D. Differential response of platelets to chemokines: RANTES non-competitively inhibits stimulatory effect of SDF-1 α . *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004;2(1):154-60.
98. Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, Rucinski D, Viksman MY, Kaplan AP. RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1992;149(2):636-42. Epub 1992/07/15.
99. Suratt BT, Petty JM, Young SK, Malcolm KC, Lieber JG, Nick JA, et al. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood*. 2004;104(2):565-71. Epub 2004/04/01.
100. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(4):264-74. Epub 2011/03/26.
101. Shao XJ, Xie FM. Influence of angiogenesis inhibitors, endostatin and PF-4, on lymphangiogenesis. *Lymphology*. 2005;38(1):1-8. Epub 2005/04/29.
102. Schror K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1997;23(4):349-56. Epub 1997/01/01.
103. Warner TD, Nylander S, Whatling C. Anti-platelet therapy: cyclo-oxygenase inhibition and the use of aspirin with particular regard to dual anti-platelet therapy. *British journal of clinical pharmacology*. 2011;72(4):619-33. Epub 2011/02/16.
104. Dzeshka MS, Shantsila A, Lip GY. Effects of Aspirin on Endothelial Function and Hypertension. *Current hypertension reports*. 2016;18(11):83. Epub 2016/10/28.
105. Nagelschmitz J, Blunck M, Kraetzschmar J, Ludwig M, Wensing G, Hohlfeld T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetylsalicylic acid after intravenous and oral administration to healthy volunteers. *Clinical pharmacology : advances and applications*. 2014;6:51-9. Epub 2014/03/29.
106. Bochner F, Williams DB, Morris PM, Siebert DM, Lloyd JV. Pharmacokinetics of low-dose oral modified release, soluble and intravenous aspirin in man, and effects on platelet function. *European journal of clinical pharmacology*. 1988;35(3):287-94. Epub 1988/01/01.

107. Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation*. 1999;100(15):1667-72. Epub 1999/10/12.
108. Farid NA, Kurihara A, Wrighton SA. Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans. *Journal of clinical pharmacology*. 2010;50(2):126-42. Epub 2009/12/02.
109. Talakad JC, Shah MB, Walker GS, Xiang C, Halpert JR, Dalvie D. Comparison of in vitro metabolism of ticlopidine by human cytochrome P450 2B6 and rabbit cytochrome P450 2B4. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2011;39(3):539-50. Epub 2010/12/16.
110. Testa L, Bhindi R, Van Gaal WJ, Latini RA, Pizzocri S, Lanotte S, et al. What is the risk of intensifying platelet inhibition beyond clopidogrel? A systematic review and a critical appraisal of the role of prasugrel. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2010;103(6):367-77. Epub 2010/03/10.
111. Niitsu Y, Jakubowski JA, Sugidachi A, Asai F. Pharmacology of CS-747 (prasugrel, LY640315), a Novel, Potent Antiplatelet Agent with in Vivo P2Y₁₂ Receptor Antagonist Activity. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2005;31(02):184-94.
112. Testa L, Biondi Zoccai GG, Valgimigli M, Latini RA, Pizzocri S, Lanotte S, et al. Current concepts on antiplatelet therapy: focus on the novel thienopyridine and non-thienopyridine agents. *Advances in hematology*. 2010;2010:595934. Epub 2010/12/15.
113. Cattaneo M. New P2Y₁₂ Inhibitors. *Circulation*. 2010;121(1):171-9.
114. BRANDT JT, CLOSE SL, ITURRIA SJ, PAYNE CD, FARID NA, ERNEST II CS, et al. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5(12):2429-36.
115. Wijeyeratne YD, Joshi R, Heptinstall S. Ticagrelor: a P2Y₁₂ antagonist for use in acute coronary syndromes. *Expert review of clinical pharmacology*. 2012;5(3):257-69. Epub 2012/06/16.
116. Chackalamannil S, Xia Y, Greenlee WJ, Clasby M, Doller D, Tsai H, et al. Discovery of Potent Orally Active Thrombin Receptor (Protease Activated Receptor 1) Antagonists as Novel Antithrombotic Agents. *J Med Chem*. 2005;48(19):5884-7.
117. Judge HM, Jennings LK, Moliterno DJ, Hord E, Ecob R, Tricoci P, et al. PAR1 antagonists inhibit thrombin-induced platelet activation whilst leaving the PAR4-mediated response intact. *Platelets*. 2015;26(3):236-42.
118. Becker RC, Moliterno DJ, Jennings LK, Pieper KS, Pei J, Niederman A, et al. Safety and tolerability of SCH 530348 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II study. *The Lancet*. 2009;373(9667):919-28.
119. Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in

normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *The Journal of clinical investigation*. 1983;72(1):325-38. Epub 1983/07/01.

120. Schrör K, Weber A-A. Comparative Pharmacology of GP IIb/IIIa Antagonists. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2003;15(2):71-80.

121. Jong P, Cohen EA, Batchelor W, Lazzam C, Kreatsoulas C, Natarajan MK, et al. Bleeding risks with abciximab after full-dose thrombolysis in rescue or urgent angioplasty for acute myocardial infarction. *American heart journal*. 2001;141(2):218-25. Epub 2001/02/15.

122. Randomised placebo-controlled trial of effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II. Integrilin to Minimise Platelet Aggregation and Coronary Thrombosis-II. *Lancet (London, England)*. 1997;349(9063):1422-8. Epub 1997/05/17.

123. Ungerer M, Rosport K, Bültmann A, Piechatzek R, Uhland K, Schlieper P, et al. Novel Antiplatelet Drug Revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) Specifically and Efficiently Inhibited Collagen-Induced Platelet Aggregation Without Affecting General Hemostasis in Humans. *Circulation*. 2011;123(17):1891-9.

124. Voors-Pette C, Lebozec K, Dogterom P, Jullien L, Billiald P, Ferlan P, et al. Safety and Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ACT017, an Antiplatelet GPVI (Glycoprotein VI) Fab. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2019;39(5):956-64.

125. Lebozec K, Jandrot-Perrus M, Avenard G, Favre-Bulle O, Billiald P. Design, development and characterization of ACT017, a humanized Fab that blocks platelet's glycoprotein VI function without causing bleeding risks. *mAbs*. 2017;9(6):945-58.

126. Gratacap MP, Martin V, Valera MC, Allart S, Garcia C, Sie P, et al. The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo. *Blood*. 2009;114(9):1884-92. Epub 2009/06/06.

127. Tullemans BME, Heemskerk JWM, Kuijpers MJE. Acquired platelet antagonism: off-target antiplatelet effects of malignancy treatment with tyrosine kinase inhibitors. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2018;16(9):1686-99. Epub 2018/07/06.

128. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal*. 1982;1(5):549-53. Epub 1982/01/01.

129. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 2001;276(16):12660-6. Epub 2001/01/22.

130. Ibanez CF. Neurotrophic factors: from structure-function studies to designing effective therapeutics. *Trends in biotechnology*. 1995;13(6):217-27. Epub 1995/06/01.

131. Foltran RB, Diaz SL. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *Journal of Neurochemistry*. 2016;138(2):204-21.

132. Kowianski P, Lietzau G, Czuba E, Waskow M, Steliga A, Morys J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and molecular neurobiology*. 2018;38(3):579-93. Epub 2017/06/18.

133. Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(12):850-60. Epub 2009/11/21.
134. Huang EJ, Reichardt LF. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*. 2003;72(1):609-42.
135. Stoilov P, Castren E, Stamm S. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;290(3):1054-65. Epub 2002/01/19.
136. Gupta VK, You Y, Gupta VB, Klistorner A, Graham SL. TrkB receptor signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(5):10122-42. Epub 2013/05/15.
137. Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR. The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron*. 2000;27(2):265-77. Epub 2000/09/14.
138. Hua Z, Gu X, Dong Y, Tan F, Liu Z, Thiele CJ, et al. PI3K and MAPK pathways mediate the BDNF/TrkB-increased metastasis in neuroblastoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(12):16227-36. Epub 2016/10/19.
139. Gonzalez A, Moya-Alvarado G, Gonzalez-Billaut C, Bronfman FC. Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)*. 2016;73(10):612-28. Epub 2016/10/19.
140. Hedrick NG, Harward SC, Hall CE, Murakoshi H, McNamara JO, Yasuda R. Rho GTPase complementation underlies BDNF-dependent homo- and heterosynaptic plasticity. *Nature*. 2016;538(7623):104-8. Epub 2016/09/30.
141. Alcantara S, Frisen J, del Rio JA, Soriano E, Barbacid M, Silos-Santiago I. TrkB signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(10):3623-33. Epub 1997/05/15.
142. Simó A, Just-Borràs L, Cilleros-Mañé V, Hurtado E, Nadal L, Tomàs M, et al. BDNF-TrkB Signaling Coupled to nPKC ϵ and cPKC β I Modulate the Phosphorylation of the Exocytotic Protein Munc18-1 During Synaptic Activity at the Neuromuscular Junction. *Front Mol Neurosci*. 2018;11(207).
143. Ohira K, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M. TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;342(3):867-74. Epub 2006/02/28.
144. Fenner BM. Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine & growth factor reviews*. 2012;23(1-2):15-24. Epub 2012/02/22.
145. Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(10):3123-9. Epub 1996/05/15.

146. Swanwick CC, Harrison MB, Kapur J. Synaptic and extrasynaptic localization of brain-derived neurotrophic factor and the tyrosine kinase B receptor in cultured hippocampal neurons. *The Journal of comparative neurology*. 2004;478(4):405-17. Epub 2004/09/24.
147. Martin JL, Finsterwald C. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. *Communicative & integrative biology*. 2011;4(1):14-6. Epub 2011/04/22.
148. Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Graos MM, et al. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell death and differentiation*. 2005;12(10):1329-43. Epub 2005/05/21.
149. Alonso M, Vianna MR, Depino AM, Mello e Souza T, Pereira P, Szapiro G, et al. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*. 2002;12(4):551-60. Epub 2002/08/31.
150. Alonso M, Bekinschtein P, Cammarota M, Vianna MR, Izquierdo I, Medina JH. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)*. 2005;12(5):504-10. Epub 2005/10/06.
151. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*. 2010;3:1. Epub 2010/02/18.
152. McHughen SA, Rodriguez PF, Kleim JA, Kleim ED, Marchal Crespo L, Procaccio V, et al. BDNF val66met polymorphism influences motor system function in the human brain. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)*. 2010;20(5):1254-62. Epub 2009/09/12.
153. Morin-Moncet O, Latulipe-Loiselle A, Therrien-Blanchet JM, Theoret H. BDNF Val66Met polymorphism is associated with altered activity-dependent modulation of short-interval intracortical inhibition in bilateral M1. *PloS one*. 2018;13(6):e0197505. Epub 2018/06/02.
154. Lim YY, Rainey-Smith S, Lim Y, Laws SM, Gupta V, Porter T, et al. BDNF Val66Met in preclinical Alzheimer's disease is associated with short-term changes in episodic memory and hippocampal volume but not serum mBDNF. *International psychogeriatrics*. 2017;29(11):1825-34. Epub 2017/07/20.
155. Tsai SJ. Critical Issues in BDNF Val66Met Genetic Studies of Neuropsychiatric Disorders. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:156. Epub 2018/06/06.
156. Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological psychiatry*. 2001;50(4):260-5. Epub 2001/08/28.
157. Youssef MM, Bakalian MJ, Simpson NR, Hsiung S-c, Liu Y, Huang Y-Y, et al. Association of BDNF Val66Met Polymorphism and Brain BDNF Levels with Major Depression and Suicide. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2018;21(6):528-38.
158. Sheldrick A, Camara S, Ilieva M, Riederer P, Michel TM. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT3) levels in post-mortem brain tissue from patients with

depression compared to healthy individuals - a proof of concept study. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists*. 2017;46:65-71. Epub 2017/11/06.

159. Bjorkholm C, Monteggia LM. BDNF - a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology*. 2016;102:72-9. Epub 2015/11/01.

160. Wang H, Ward N, Boswell M, Katz DM. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells. *The European journal of neuroscience*. 2006;23(6):1665-70. Epub 2006/03/24.

161. Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomedical reports*. 2013;1(2):167-76. Epub 2014/03/22.

162. Takeda K, Kermani P, Anastasia A, Obinata Y, Hempstead BL, Kurihara H. BDNF protects human vascular endothelial cells from TNF α -induced apoptosis. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2013;91(5):341-9. Epub 2013/09/17.

163. Xu D, Lian D, Wu J, Liu Y, Zhu M, Sun J, et al. Brain-derived neurotrophic factor reduces inflammation and hippocampal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Journal of neuroinflammation*. 2017;14(1):156. Epub 2017/08/06.

164. Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends in neurosciences*. 2001;24(1):47-53. Epub 2001/02/13.

165. Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy--a missing link? *Epilepsy currents*. 2005;5(3):83-8. Epub 2005/09/08.

166. Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, Koprowski H, Lanahan AA, Buck CR, et al. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science (New York, NY)*. 1986;232(4749):518-21. Epub 1986/04/25.

167. Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, et al. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell*. 1986;47(4):545-54. Epub 1986/11/21.

168. Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *The EMBO journal*. 1997;16(16):4999-5005. Epub 1997/08/15.

169. Shamovsky IL, Ross GM, Riopelle RJ, Weaver DF. The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1999;8(11):2223-33. Epub 1999/12/14.

170. Sandhya VK, Raju R, Verma R, Advani J, Sharma R, Radhakrishnan A, et al. A network map of BDNF/TRKB and BDNF/p75NTR signaling system. *Journal of cell communication and signaling*. 2013;7(4):301-7. Epub 2013/04/23.

171. Nykjaer A, Willnow TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in neurosciences*. 2012;35(4):261-70. Epub 2012/02/22.

172. Hang P, Zhao J, Cai B, Tian S, Huang W, Guo J, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates TRPC3/6 channels and protects against myocardial infarction in rodents. *International journal of biological sciences*. 2015;11(5):536-45. Epub 2015/04/22.

173. Amoureux S, Lorgis L, Sicard P, Girard C, Rochette L, Vergely C. Vascular BDNF expression and oxidative stress during aging and the development of chronic hypertension. *Fundam Clin Pharmacol*. 2012;26(2):227-34. Epub 2011/01/08.
174. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*. 2000;127(21):4531-40. Epub 2000/10/12.
175. Anastasia A, Deinhardt K, Wang S, Martin L, Nichol D, Irmady K, et al. Trkb signaling in pericytes is required for cardiac microvessel stabilization. *PLoS ONE [Electronic Resource]*. 2014;9(1):e87406.
176. Fulgenzi G, Tomassoni-Ardori F, Babini L, Becker J, Barrick C, Puvarel S, et al. BDNF modulates heart contraction force and long-term homeostasis through truncated TrkB.T1 receptor activation. *Journal of Cell Biology*. 2015;210(6):1003-12.
177. Feng N, Huke S, Zhu G, Tocchetti CG, Shi S, Aiba T, et al. Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation.[Erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 31;112(13):E1691; PMID: 25762068]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(6):1880-5.
178. Kermani P, Rafii D, Jin DK, Whitlock P, Schaffer W, Chiang A, et al. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(3):653-63.
179. Jiang H, Huang S, Li X, Li X, Zhang Y, Chen ZY. Tyrosine kinase receptor B protects against coronary artery disease and promotes adult vasculature integrity by regulating Ets1-mediated VE-cadherin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(3):580-8.
180. Jiang H, Huang S, Li X, Li X, Huang S, Zhang Y, et al. Endothelial tyrosine kinase receptor B prevents VE-cadherin cleavage and protects against atherosclerotic lesion development in ApoE^{-/-} mice. *Oncotarget*. 2015;6(31):30640-9. Epub 2015/10/03.
181. Zhang JC, Chen MY, Li Y, Fu YC, Gao JL. [Effect of neurotrophin p75 receptor activation on transmural dispersion repolarization in rabbits with myocardial infarction]. *Chung Kuo Ying Yung Sheng Li Hsueh Tsa Chih*. 2013;29(3):255-60.
182. Yuan MJ, Huang H, Huang CX. P75 neurotrophin receptor is a regulatory factor in sudden cardiac death with myocardial infarction. *Med Hypotheses*. 2012;79(3):361-2.
183. Wang S, Bray P, McCaffrey T, March K, Hempstead BL, Kraemer R. p75(NTR) mediates neurotrophin-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol*. 2000;157(4):1247-58. Epub 2000/10/06.
184. Kraemer R. Reduced apoptosis and increased lesion development in the flow-restricted carotid artery of p75(NTR)-null mutant mice. *Circulation Research*. 2002;91(6):494-500.
185. Caporali A, Meloni M, Nailor A, Mitic T, Shantikumar S, Riu F, et al. p75(NTR)-dependent activation of NF-kappaB regulates microRNA-503 transcription and pericyte-endothelial crosstalk in diabetes after limb ischaemia. *Nat Commun*. 2015;6:8024. Epub 2015/08/14.

186. Jin H, Chen Y, Wang B, Zhu Y, Chen L, Han X, et al. Association between brain-derived neurotrophic factor and von Willebrand factor levels in patients with stable coronary artery disease. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2018;18(1):23.
187. Horvath B, Hegedus D, Szapary L, Marton Z, Alexy T, Koltai K, et al. Measurement of von Willebrand factor as the marker of endothelial dysfunction in vascular diseases. *Experimental and clinical cardiology*. 2004;9(1):31-4. Epub 2004/04/01.
188. Yamamoto H, Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1990;10(11):3469-78. Epub 1990/11/01.
189. Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, Talvenheimo J, Radka SF, Bennett L, et al. Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. *Protein Expr Purif*. 1995;6(4):465-71. Epub 1995/08/01.
190. Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain research*. 1996;709(1):122-301. Epub 1996/02/12.
191. Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thrombosis & Haemostasis*. 2002;87(4):728-34.
192. Amadio P, Porro B, Sandrini L, Fiorelli S, Bonomi A, Cavalca V, et al. Pathophysiological role of BDNF in fibrin clotting. *Scientific reports*. 2019;9(1):389. Epub 2019/01/25.
193. Heitz U, Pappmeyer M, Studerus E, Egloff L, Ittig S, Andreou C, et al. Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and their association with neurocognition in at-risk mental state, first episode psychosis and chronic schizophrenia patients. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*. 2018:1-10. Epub 2018/06/26.
194. Burnouf T, Kuo YP, Blum D, Burnouf S, Su CY. Human platelet concentrates: a source of solvent/detergent-treated highly enriched brain-derived neurotrophic factor. *Transfusion*. 2012;52(8):1721-8. Epub 2012/01/04.
195. Yang ZF, Ho DW, Lau CK, Tam KH, Lam CT, Poon RT, et al. Platelet activation during tumor development, the potential role of BDNF-TrkB autocrine loop. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;346(3):981-5. Epub 2006/06/20.
196. Tamura S, Nagasawa A, Masuda Y, Tsunematsu T, Hayasaka K, Matsuno K, et al. BDNF, produced by a TPO-stimulated megakaryocytic cell line, regulates autocrine proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;427(3):542-6. Epub 2012/10/02.
197. Labouyrie E, Dubus P, Groppi A, Mahon FX, Ferrer J, Parrens M, et al. Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol*. 1999;154(2):405-15. Epub 1999/02/23.

198. Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thrombosis and haemostasis*. 2002;87(4):728-34. Epub 2002/05/15.
199. Tep C, Kim ML, Opincariu LI, Limpert AS, Chan JR, Appel B, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces polarized signaling of small GTPase (Rac1) protein at the onset of Schwann cell myelination through partitioning-defective 3 (Par3) protein. *J Biol Chem*. 2012;287(2):1600-8. Epub 2011/12/01.
200. Ng YP, Cheung ZH, Ip NY. STAT3 as a downstream mediator of Trk signaling and functions. *J Biol Chem*. 2006;281(23):15636-44. Epub 2006/04/14.
201. Woulfe DS. Akt signaling in platelets and thrombosis. *Expert review of hematology*. 2010;3(1):81-91. Epub 2010/03/31.
202. Lannan KL, Sahler J, Kim N, Spinelli SL, Maggirwar SB, Garraud O, et al. Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles. *Frontiers in immunology*. 2015;6:48. Epub 2015/03/13.
203. Cohen S, Braiman A, Shubinsky G, Isakov N. Protein kinase C-theta in platelet activation. *FEBS letters*. 2011;585(20):3208-15. Epub 2011/09/29.
204. Calabrese F, Rossetti AC, Racagni G, Gass P, Riva MA, Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:430. Epub 2015/01/08.
205. Cai D, Holm JM, Duignan IJ, Zheng J, Xaymardan M, Chin A, et al. BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart. *Physiol Genomics*. 2006;24(3):191-7.
206. Tsai YF, Tseng LM, Hsu CY, Yang MH, Chiu JH, Shyr YM. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) -TrKB signaling modulates cancer-endothelial cells interaction and affects the outcomes of triple negative breast cancer. *PloS one*. 2017;12(6):e0178173. Epub 2017/06/13.
207. Radin DP, Patel P. BDNF: An Oncogene or Tumor Suppressor? *Anticancer research*. 2017;37(8):3983-90. Epub 2017/07/26.
208. Meng L, Liu B, Ji R, Jiang X, Yan X, Xin Y. Targeting the BDNF/TrkB pathway for the treatment of tumors. *Oncology letters*. 2019;17(2):2031-9. Epub 2019/01/25.
209. Liebl DJ, Koo PH. Comparative binding of neurotrophins (NT-3, CNTF and NGF) and various cytokines to alpha 2-macroglobulin. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;193(3):1255-61. Epub 1993/06/30.
210. Barcelona PF, Sitaras N, Galan A, Esquiva G, Jmaeff S, Jian Y, et al. p75NTR and Its Ligand ProNGF Activate Paracrine Mechanisms Etiological to the Vascular, Inflammatory, and Neurodegenerative Pathologies of Diabetic Retinopathy. *Journal of Neuroscience*. 2016;36(34):8826-41.
211. Skornicka EL, Shi X, Koo PH. Comparative binding of biotinylated neurotrophins to alpha(2)-macroglobulin family of proteins: relationship between cytokine-binding and neuro-modulatory activities of the macroglobulins. *Journal of neuroscience research*. 2002;67(3):346-53. Epub 2002/01/29.

212. Cvirn G, Gallistl S, Koestenberger M, Kutschera J, Leschnik B, Muntean W. Alpha 2-macroglobulin enhances prothrombin activation and thrombin potential by inhibiting the anticoagulant protein C/protein S system in cord and adult plasma. *Thrombosis research*. 2002;105(5):433-9. Epub 2002/06/14.
213. Ohtani H, Saito M, Koshihara K. Alpha-2-macroglobulin deficiency in patients with advanced prostate cancer. *Oncology*. 1985;42(6):341-4. Epub 1985/01/01.
214. Kurz S, Thieme R, Amberg R, Groth M, Jahnke HG, Pieroh P, et al. The anti-tumorigenic activity of A2M-A lesson from the naked mole-rat. *PloS one*. 2017;12(12):e0189514. Epub 2017/12/28.
215. Lindner I, Hemdan NY, Buchold M, Huse K, Bigl M, Oerlecke I, et al. Alpha2-macroglobulin inhibits the malignant properties of astrocytoma cells by impeding beta-catenin signaling. *Cancer research*. 2010;70(1):277-87. Epub 2010/01/06.
216. Jones S, Tucker KL, Sage T, Kaiser WJ, Barrett NE, Lowry PJ, et al. Peripheral tachykinins and the neurokinin receptor NK1 are required for platelet thrombus formation. *Blood*. 2008;111(2):605-12. Epub 2007/09/27.
217. Severini C, Improta G, Falconieri-Ersparmer G, Salvadori S, Ersparmer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacological reviews*. 2002;54(2):285-322. Epub 2002/05/31.
218. Stellos K, Panagiota V, Kogel A, Leyhe T, Gawaz M, Laske C. Predictive value of platelet activation for the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease patients. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30(11):1817-20. Epub 2010/08/19.
219. Stellos K, Katsiki N, Tatsidou P, Bigalke B, Laske C. Association of platelet activation with vascular cognitive impairment: implications in dementia development? *Current vascular pharmacology*. 2014;12(1):152-4. Epub 2012/01/26.
220. Sevush S, Jy W, Horstman LL, Mao WW, Kolodny L, Ahn YS. Platelet activation in Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 1998;55(4):530-6. Epub 1998/04/30.
221. Zucker MB, Friedman BK, Rapport MM. Identification and quantitative determination of serotonin (5-hydroxytryptamine) in blood platelets. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1954;85(2):282-5. Epub 1954/02/01.
222. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2002;71(4):533-54. Epub 2002/03/13.
223. Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, White JG, Escolar G, Galan AM. Serotonin enhances platelet procoagulant properties and their activation induced during platelet tissue factor uptake. *Cardiovascular research*. 2009;84(2):309-16. Epub 2009/06/23.
224. Vanags DM, Rodgers SE, Duncan EM, Lloyd JV, Bochner F. Potentiation of ADP-induced aggregation in human platelet-rich plasma by 5-hydroxytryptamine and adrenaline. *British journal of pharmacology*. 1992;106(4):917-23.

225. Zhou J, Li J, Rosenbaum DM, Barone FC. Thrombopoietin protects the brain and improves sensorimotor functions: reduction of stroke-induced MMP-9 upregulation and blood-brain barrier injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011;31(3):924-33. Epub 2010/09/30.

226. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Knerlich F, von Ahsen N, Jacob S, Sperling S, et al. A hematopoietic growth factor, thrombopoietin, has a proapoptotic role in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(3):862-7. Epub 2005/01/12.