

Université de Montréal

**Investigation des mécanismes physiologiques menant à
la libération du BDNF par les plaquettes et leur
susceptibilité aux médicaments antiplaquettaires**

Par :

Boulahya Rahma

Programme de Sciences biomédicales

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur

Sciences biomédicales

Option Médecine expérimentale

Novembre 2020

© Rahma Boulahya, 2020

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Investigation des mécanismes physiologiques menant à la libération du
BDNF par les plaquettes et leur susceptibilité aux médicaments
antiplaquettaires**

Présentée par :

Rahma Boulahya

Évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Identification du jury

Dr Éric Thorin..... Président rapporteur

Dr Audrey Claing..... Membre du jury

Dr Alain Rivard..... Membre du jury

Dr Stéphanie Lehoux Examineur externe

Dr Jaques Thibodeau..... Représentant du doyen

Résumé

Les plaquettes sont considérées comme l'un des réservoirs les plus importants non seulement des facteurs de croissance, mais aussi des facteurs neurotrophiques qui pourraient contribuer à la réparation des lésions vasculaires et à la prévention de la détérioration neurologique. Parmi ces facteurs, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* ou BDNF) – une protéine appartenant à la famille des neurotrophines – est largement exprimée à la fois dans l'hippocampe et au niveau des plaquettes. Les plaquettes constituent un important réservoir de BDNF; cependant, on ne sait que peu de choses sur les facteurs modulant la libération de ce dernier dans la circulation et si les médicaments antiplaquettaires affectent cette sécrétion. Dans le cadre de ce projet, nous avons émis l'hypothèse principale que les différentes voies d'activation plaquettaire peuvent mener à une libération de BDNF, où celle-ci est affectée par les antiplaquettaires.

A cette fin, les plaquettes ont été isolées à partir d'échantillons sanguins de volontaires sains (Groupe 1), de patients souffrant de maladies cardiovasculaires stables requérant la prise de médicaments antiplaquettaires [en prévention secondaire et en double thérapie à l'acide acétylsalicylique (ASA ou Aspirine) en association avec un antagoniste du récepteur P2Y₁₂], (Groupe 2) ou en monothérapie à l'ASA (Groupe 3), *versus* de patients atteints de maladies valvulaires ou de cardiomyopathies ne requérant pas la prise de médicaments antiplaquettaires (Groupe 4). L'agrégation plaquettaire a été étudiée par agrégométrie optique en réponse à des agonistes spécifiques : adénosine diphosphate (ADP), acide arachidonique (AA), épinéphrine, collagène et *Thrombin-receptor activated peptide 6* (TRAP-6 amide). Les antiplaquettaires testés sont dirigés contre la cyclo-oxygénase-1 ou COX-1 (ASA), contre le récepteur de P2Y₁₂ de l'ADP (AR-C) et contre le récepteur α Ib β 3 du fibrinogène (Abciximab). La libération du BDNF a été quantifiée par ELISA. La présence du BDNF et de son récepteur *Tropomyosin-Related Kinase Receptor type B* (TrKB) a été détectée par immunobuvardage.

Nous avons montré que l'activation des plaquettes par les différents agonistes testés induit une agrégation plaquettaire de l'ordre de 80% et permet de libérer jusqu'à 5 fois plus de BDNF, passant de 2500 pg / 250 x 10⁶ plaquettes à l'état basal à approximativement

13000 pg / 250 x 10⁶ plaquettes à l'état stimulé. Tous les antiplaquettaires testés réduisent la libération de BDNF par les plaquettes stimulées. Cependant, le niveau d'inhibition et sa significativité dépendent de la nature de l'agoniste; à savoir que l'ASA réduit significativement la sécrétion de BDNF en réponse à l'AA, à l'épinéphrine et au TRAP-6; alors que l'AR-C était plus efficace en réponse à l'ADP, l'AA et l'épinéphrine. L'Abciximab est un antagoniste qui inhibe la sécrétion de BDNF en réponse à tous les agonistes, en inhibant aussi l'agrégation plaquettaire. Notons que la libération de BDNF en réponse au collagène est inhibée par l'ASA et l'AR-C, alors que l'agrégation n'a pas été affectée. Ainsi, aucune corrélation positive et significative entre l'agrégation plaquettaire et la libération de BDNF n'a pu être obtenue. La présence des antiplaquettaires réduits à différents degrés la libération de BDNF chez les différents groupes des patients, malgré que son expression intraplaquettaire était similaire entre les groupes. On remarque que les antiplaquettaires réduisent plus significativement la quantité du BDNF relâchée chez les patients sous mono ou double thérapie antiplaquettaire en comparaison avec les volontaires sains et les patients atteints de maladies valvulaires. Nous avons aussi démontré que le BDNF exogène active les plaquettes isolées et lavées chez les volontaires sains, en induisant une forte agrégation stable et irréversible. Par contre, le BDNF exogène n'arrive pas à agréger les plaquettes en plasma riche en plaquettes. De plus, nos résultats indiquent que la forme tronquée du récepteur BDNF, le TrKB, est exprimée au niveau des plaquettes de volontaires sains. L'inhibition de l'activité kinase du TrKB abolit l'agrégation induite par le BDNF. Ces résultats suggèrent que l'action du BDNF dans les plaquettes lavées pourrait passer par l'intermédiaire du TrKB.

Cette étude nous permet de conclure que le BDNF est présent dans les plaquettes et est libéré suite à l'activation plaquettaire et que cette libération est réduite par les antiplaquettaires. Cependant, l'agrégation plaquettaire ne semble pas être associée directement à la sécrétion du BDNF, ce qui suggère que d'autres mécanismes sous-jacents pourraient intervenir dans le contrôle de cette sécrétion. Les antiplaquettaires réduisent la libération de BDNF et il semble que l'action pro-agrégante du BDNF sur les plaquettes lavées passe par l'intermédiaire du TrKB, sans exclure la possibilité que d'autres types de récepteurs plaquettaires soient impliqués dans le signal déclenché par le BDNF. L'implication physiopathologique du BDNF libéré suite à l'activation plaquettaire ou sa

biodisponibilité en présence des antiplaquettaires au niveau cardiovasculaire reste à être élucidée afin de révéler son potentiel diagnostique ou thérapeutique.

Mots-clés : BDNF, plaquettes, antiplaquettaires, libération, TrKB, maladies cardiovasculaires.

Abstract

Platelets are considered one of the most important reservoirs not only of growth factors but also of neurotrophic factors that may contribute to the repair of vascular lesions and prevention of neurological deterioration. Among these factors, the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), a protein belonging to the neurotrophin family, is largely expressed in both the hippocampus and platelets. In fact, platelets constitute an important reservoir of BDNF; however, little is known about the factors controlling its release into the circulation and whether antiplatelet drugs affect this secretion. Henceforth, the main hypothesis of this project is that platelet activation pathways lead to BDNF release which is affected by antiplatelet agents.

For this purpose, platelets were isolated from the blood of four groups of human subjects following their consent. Group 1 consisted of healthy volunteers; Group 2 and Group 3 consisted of patients with stable cardiovascular disease on, respectively, dual antiplatelet therapy (aspirin + P2Y₁₂ receptor antagonist) or monotherapy (aspirin) as secondary prevention; and Group 4 consisted of patients with valvular disease or cardiomyopathy who are not on antiplatelet therapy. Platelet aggregation was studied by optical aggregometry in response to the following agonists: adenosine diphosphate (ADP), arachidonic acid (AA), epinephrine, collagen, and thrombin-receptor activated peptide 6 (TRAP-6 amide). The antiplatelet agents that were tested antagonize cyclooxygenase-1 (COX-1) (acetylsalicylic acid (ASA) or aspirin), ADP P2Y₁₂ receptor (AR-C), and fibrinogen receptor α Ib β 3 (Abciximab). BDNF release was quantified by ELISA. BDNF protein and its Tropomyosin-Related Kinase Receptor Type B (TrKB) receptor were detected by immunoblotting.

Our results show that platelet activation in response to several agonists tested induced 80% platelet aggregation and augmented BDNF release by 5 folds, from 2500 pg / 250 x 10⁶ platelets at baseline to approximately 13000 pg / 250 x 10⁶ after stimulation. Moreover, all the tested antiplatelet agents reduced the release of BDNF by stimulated platelets. However, the level of reduction varied differentially between platelet antagonists depending on the platelet agonist used. Indeed, ASA significantly reduced BDNF secretion in response to AA, epinephrine, and TRAP-6, whereas AR-C was more effective in

response to ADP, AA, and epinephrine. Abciximab inhibited BDNF secretion as well as platelet aggregation in response to all agonists. Noteworthy, the release of BDNF in response to collagen was inhibited by ASA and AR-C, while platelet aggregation was not affected. Accordingly, no significant correlation between platelet aggregation and BDNF release could be obtained. Although intra-platelet expression was similar in the different groups, the presence of antiplatelet agents reduced the release of BDNF to varying degrees between groups. As such, antiplatelet agents reduced BDNF release more significantly in patients on dual or mono antiplatelet therapy (Groups 2 and 3) as compared to healthy volunteers (Group 1) and valvular disease patients (Group 4). We have also shown that exogenous BDNF activated isolated/washed platelets from healthy volunteers, inducing strong, stable, and irreversible aggregation. In contrast, exogenous BDNF could not induce aggregation of platelets in platelet-rich plasma. In addition, our results indicate that the truncated form of the BDNF receptor, TrKB, is expressed in platelets of healthy volunteers. Hence, the inhibition of TrKB kinase activity abolished BDNF-induced aggregation. These results suggest that the action of BDNF in washed platelets might ensue through TrKB.

We conclude from this study that BDNF is present in platelets and released following platelet activation, and its release is reduced by antiplatelet agents. However, platelet aggregation does not appear to be directly associated with BDNF secretion, suggesting that other underlying mechanisms may be involved in controlling its secretion. Antiplatelet agents reduce the release of BDNF, and it appears that the pro-aggregating action of BDNF on washed platelets ensues, non-exclusively, through TrKB, which means that other types of platelet receptors may also be involved in BDNF signaling. The pathophysiological implication of BDNF released following platelet activation or its bioavailability in the presence of antiplatelet agents in the cardiovascular system thus remain to be elucidated in order to reveal its diagnostic or therapeutic potential.

Keywords: BDNF, platelets, antiplatelet agents, release, TrKB, cardiovascular disease.

Table des matières

Identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract	vi
Table des matières	viii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xiv
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xvii
Introduction	1
Chapitre 1 : Les plaquettes	3
1.1 La thrombopoïèse.....	4
1.2 Le contenu granulaire des plaquettes	5
1.3 Adhésion et activation des plaquettes	7
1.3.1 Les voies d'activation plaquettaires	8
1.3.2 Les mécanismes impliqués dans la sécrétion granulaire	12
1.4 La thérapie antiplaquettaire.....	16
1.4.1 L'ASA.....	17
1.4.2 Les inhibiteurs des récepteurs purinergiques P2Y ₁₂	19
1.4.3 Les inhibiteurs du récepteur α I bb 3.....	20
Chapitre 2 : Le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)	22
2.1 Les neurotrophines.....	23
2.2 Le BDNF au niveau central	24
2.3 Structure génétique du BDNF.....	27
2.4 Expression du BDNF dans le SNC	28
2.5 Maturation et sécrétion du BDNF	29
2.6 Transport du BDNF	30
2.7 Le récepteur TrKB	31
Chapitre 3 : Le BDNF et les maladies cardiovasculaires	35
3.1 Expression au niveau périphérique du BDNF	36
3.2 Effet de l'exercice sur les taux du BDNF	37
3.3 Rôle du BDNF circulant au niveau cardiovasculaire.....	38
3.4 Rôle du BDNF dans l'angiogenèse.....	42
3.5 Effets pathologiques de l'axe BDNF-TrKB	43
Chapitre 4 : Le BDNF dans les plaquettes	46

4.1	Le BDNF circulant.....	47
4.2	La Libération du BDNF par les plaquettes	48
4.3	Effet des médicaments antiplaquettaires sur la libération du BDNF par les plaquettes	48
Chapitre 5 : Hypothèse, objectifs et méthodes.....		50
5.1	Problématique et hypothèse	51
5.2	Objectifs du projet de recherche	53
5.3	Déroulement de l'étude.....	54
	5.3.1 <i>Sélection des sujets</i>	54
	5.3.1.1. Groupe 1 : Volontaires sains.....	54
	5.3.1.2. Groupes 2 et 3: Patients souffrant de maladie coronarienne stable sous traitements antiplaquettaires (double ou monothérapie à l'Aspirine).....	55
	5.3.1.3. Groupe 4 : Patients souffrant de maladie valvulaire ou de cardiomyopathie.....	56
5.4	Description des techniques de laboratoire	57
	5.4.1 <i>Isolation des plaquettes à partir du sang périphérique</i>	57
	5.4.2 <i>Agrégation par transmission lumineuse (LTA)</i>	57
	5.4.3 <i>Dosage du BDNF plasmatique par la technique d'ELISA en sandwich</i>	59
	5.4.4 <i>Détection de BDNF intraplaquettaire par immunoblottage</i>	60
	5.4.5 <i>Stimulation des plaquettes par le BDNF</i>	60
	5.4.6 <i>Identification du récepteur TrKB chez les volontaires sains</i>	61
5.5	Estimation de la taille d'échantillon	62
	5.5.1 <i>Analyses statistiques</i>	64
Chapitre 6 : Effets des antiplaquettaires sur l'agrégation plaquettaire et la libération du BDNF.....		65
6.1	Effets des antiplaquettaires sur l'agrégation plaquettaire induite par les différents agonistes utilisés chez les volontaires sains.....	66
6.2	Effet des agonistes sur la libération du BDNF plaquettaire chez les volontaires sains.....	68
6.3	Effet des antiplaquettaires sur l'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire chez les volontaires sains	70
	6.3.1 <i>Effet des antiplaquettaires sur l'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire en présence des agonistes</i>	70
6.4	Effet des antiplaquettaires sur l'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire chez les patients	73
	6.4.1 <i>Effet de l'ASA sur l'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire en présence de tous les agonistes chez les patients sous ASA</i>	75
	6.4.2 <i>Effet de la DAPT sur l'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire en présence de tous les agonistes chez les patients sous DAPT</i>	76
	6.4.3 <i>L'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire en présence de tous les agonistes chez les patients atteints de maladies valvulaires</i>	78
6.5	Les niveaux d'expression plaquettaire du BDNF chez les 4 groupes.....	79
	6.5.1 <i>L'expression du BDNF dans les plaquettes non stimulées des volontaires sains</i>	80

6.5.1	<i>L'expression du BDNF dans les plaquettes non stimulées des groupes étudiés</i>	81
6.5.1	<i>Étude de l'association entre le BDNF plasmatique et le décompte plaquettaire des différents groupes d'étude</i>	82
6.5.1.1.	Association entre les niveaux du BDNF sous l'action du TRAP-6 et l'expression du BDNF dans les plaquettes des patients	84
Chapitre 7 : Effet du BDNF exogène sur les plaquettes		86
7.1	Le BDNF exogène n'a aucun effet sur l'agrégation plaquettaire chez les groupes étudiés	87
7.2	Le BDNF exogène n'a aucun effet sur l'agrégation plaquettaire chez les volontaires sains en synergie avec les différents agonistes	88
7.3	Le BDNF exogène n'a aucun effet sur l'agrégation plaquettaire chez les patients sous DAPT en synergie avec les différents agonistes	90
7.4	Le BDNF exogène n'a aucun effet sur l'agrégation plaquettaire chez les patients sous aspirine en synergie avec les différents agonistes	91
7.5	Le BDNF exogène active les plaquettes lavées chez les volontaires sains	92
7.5.1	<i>Les antiplaquettaires renversent l'effet du BDNF exogène sur l'agrégation des plaquettes humaines lavées</i>	93
7.6	L'expression de la forme tronquée du récepteur TrKB au niveau des plaquettes des volontaires sains	95
7.6.1	<i>Les kinases plaquettaires sont impliquées dans la signalisation du BDNF dans les plaquettes</i>	96
Chapitre 8 : Discussion		99
8.1	Les forces de l'étude	111
8.2	Les limites de l'étude	112
8.3	Conclusions et perspectives	113

Liste des figures

Figure 1: Les divers types de granules plaquettaires.	6
Figure 2: La cascade des réactions plaquettaires menant à la formation du thrombus.	8
Figure 3: La signalisation des protéines Gq dans les plaquettes induisant la sécrétion, le changement de forme, l'amplification et l'agrégation.	10
Figure 4: La fusion des granules médiée par le complexe SNARE.	14
Figure 5: Sites d'actions des antiplaquettaires.	17
Figure 6: Le yin et le yang des récepteurs et des fonctions des NTs.	24
Figure 7: Les actions biologiques du BDNF.	26
Figure 8: Structure génomique de BDNF humain.	28
Figure 9: La voie du BDNF de la synthèse à la sécrétion au niveau des neurones.	30
Figure 10: La signalisation des NTs.	34
Figure 11: Rôles du BDNF au niveau du système cardiovasculaire.	41
Figure 12: L'intervention du BDNF au niveau de l'athérosclérose.	45
Figure 13: Agrégation optique en PRP des volontaires sains avec différentes doses (Faible, moyenne et forte) de chaque agoniste et en réponse aux antiplaquettaires.	67
Figure 14: Dosage du BDNF en plasma de PRP par la méthode d'ELISA chez les volontaires sains.	69
Figure 15: Dosage du BDNF en plasma de PRP par la méthode d'ELISA en présence des antiplaquettaires et des agonistes utilisés en fonction de l'agrégation plaquettaire chez les volontaires sains.	70

Figure 16: Dosage du BDNF en plasma de PRP par la méthode d'ELISA en présence des agonistes utilisés en fonction de l'agrégation plaquettaire chez les patients sous ASA.....	75
Figure 17: Dosage du BDNF en plasma de PRP par la méthode d'ELISA en présence des agonistes utilisés en fonction de l'agrégation plaquettaire chez les patients sous DAPT.	76
Figure 18: Dosage du BDNF en plasma de PRP par la méthode d'ELISA en présence des agonistes en fonction de l'agrégation plaquettaire chez les patients atteints de maladies valvulaires.....	78
Figure 19: Gel représentatif de l'expression du BDNF au niveau des plaquettes lavées non stimulées provenant de quatre volontaires sains.	80
Figure 20: Expression du BDNF au niveau des plaquettes lavées chez les différents groupes expérimentaux.	81
Figure 21: Corrélation entre le niveau plasmatique basal du et le décompte plaquettaire.....	83
Figure 22: Corrélation entre les niveaux du BDNF relâchés sous l'action du TRAP-6 (3 μ M) et l'expression du BDNF au niveau des plaquettes isolées chez les patients.....	85
Figure 23: Agrégation optique en PRP chez les quatre groupes d'étude en présence du BDNF.....	87
Figure 24: Agrégation optique en PRP en réponse au BDNF chez les volontaires sains en présence de différents agonistes.....	89
Figure 25: Agrégation optique en PRP en réponse au BDNF chez les patients sous DAPT en présence de différents agonistes.	90

Figure 26: Agrégation optique en PRP en réponse au BDNF chez les patients sous aspirine en présence de différents agonistes.	91
Figure 27: Agrégation optique en plaquettes lavées de volontaires sains.	93
Figure 28: Agrégation optique des plaquettes lavées de volontaires sains en présence du BDNF et des antiplaquettaires.	94
Figure 29: Gel représentatif suggérant l'expression du récepteur TrKB tronqué au niveau des plaquettes lavées de volontaires sains.	96
Figure 30: Agrégation optique des plaquettes lavées de volontaires sains en réponse au BDNF et en présence des inhibiteurs des récepteurs TrKB.	98

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des participants retenus dans le projet..... 74

Liste des abréviations

ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AA	Acide arachidonique
ASA	Acetylsalicylic <i>Acid</i> /Acide acétylsalicylique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AVC	Accident vasculaire cérébral
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
Calcium	Ca ²⁺
COX-1	Cyclo-oxygénase-1
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
DAPT	<i>Double Anti-Platelet Therapy</i>
DAG	Diacylglycérol
GP	Glycoprotéine
ELISA	<i>Enzyme Linked immunosorbent assay</i>
IM	Infarctus du myocarde
IP3	Inositol trisphosphate
MK	Mégacaryocytes
MMP	Métalloprotéinases matricielles
MAPK	Protéine kinase activatrice du mitogène (<i>Mitogen Activating Protein Kinase</i>)
NTs	Neurotrophines
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
NFκB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> / Facteur de croissance des nerfs
P75 ^{NTR}	<i>Pan 75 neurotrophin receptor</i>
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> / Cellules mononucléaires du sang périphérique
PAR	<i>Protease-Activated Receptor</i> / Récepteur activé par les protéases

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PLC	Phospholipase C
PRP	Plasma riche en plaquettes
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
PKC	Protéines kinases C
SNC	Système nerveux central
SCA	Syndrome coronarien aigu
SNARE	<i>Soluble NSF Attachment Protein Receptors</i>
Stx	Syntaxines
SNAP	<i>Synaptosome-Associated Protein</i>
vSNARE	<i>Soluble NSF Attachment Protein Receptors vésiculaires</i>
tSNARE	<i>Soluble NSF Attachment Protein Receptors target</i>
TrK	<i>Tropomyosin receptor kinase</i>
TrKB	<i>Tropomyosin-Related Kinase Receptor Type B</i>
TRAP-6	<i>Thrombin-receptor activated peptide 6</i> / Peptide activateur du récepteur de la thrombine 6
TXA ₂	Thromboxane A ₂
VAMP	<i>Vesicle-Associated Membrane Protein</i>
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mes directeurs de thèse Yahye Merhi et Marie Lordkipanidzé. Un énorme merci à Dr Merhi pour ton soutien, ton appui et ton encouragement depuis ma maîtrise (en tant que directeur) jusqu'à mon doctorat en tant que codirecteur.

Je remercie également mes collègues de laboratoire et les étudiants du laboratoire de mon co-directeur. Mes remerciements vont également aux co-investigateurs de ce projet : Dr Jean-François Tanguay, Dr E. Marc Jolicoeur, ainsi qu'à la coordinatrice de recherche Madame Sophie Robichaud.

Je souhaite finir par remercier ma petite famille qui a supporté ce travail et qui, grâce à elle, m'a permis d'avancer dans mon parcours académique. Un merci particulier à mon mari qui a cru en moi et qui m'a encouragé tout au long de mon doctorat. Un grand merci à tous pour chaque mot, chaque geste et chaque preuve d'amour!

Merci à tous ceux qui ont contribué dans ce projet de recherche; directeurs de recherche, collaborateurs, infirmier(e)s de recherche, volontaires, étudiants, stagiaires et collègues.

Je dédie cette thèse pour l'âme de mon père, paix à âme!

Introduction

Le BDNF appartient à la famille des neurotrophines (NTs) et est essentiellement connu pour son rôle dans la différenciation et la morphologie des neurones, la plasticité synaptique et la mémoire au niveau du système nerveux central (SNC)^{1 2 3-5}. La fonction neuronale du BDNF est principalement médiée par son récepteur tyrosine kinase, le TrKB, qui se retrouve sur les terminaisons synaptiques. Deux formes du BDNF extracellulaire sont présentes : le pro-BDNF (la forme précurseur de la protéine mature) et le BDNF mature libéré dans l'espace extracellulaire et pouvant se retrouver en circulation^{6, 7}. Des études récentes ont démontré que les plaquettes constituent le réservoir périphérique le plus important pour le BDNF en circulation^{8, 9}. Il est intéressant de noter que le BDNF endogène est exprimé à des concentrations beaucoup plus élevées dans les plaquettes circulantes (100 à 1000 fois) que dans les neurones⁹⁻¹³. Les plaquettes activées libèrent le BDNF dans le plasma⁹. D'après l'état actuel des connaissances, les récepteurs du BDNF (dont le TrKB et le Pan 75 neurotrophin (p75^{NTR})) ne sont présents ni au niveau des plaquettes ni au niveau des mégacaryocytes (MK)^{14 15}. De plus, il a été rapporté que les plaquettes pourraient stocker le BDNF par voie d'internalisation⁹. Par le fait même, des questions se posent d'une part sur la présence des récepteurs du BDNF (dont la présence demeure inconnue au niveau des plaquettes); d'autre part, sur l'implication d'autres types de récepteurs capables d'internaliser le BDNF.

À ce stade, il est difficile de définir l'origine de BDNF plaquettaire, car ce sujet reste méconnu. D'un côté, le BDNF semble avoir une demi-vie plasmatique très courte (<10 minutes)^{16, 17 18 19} et peut faiblement franchir la barrière hématoencéphalique, ce qui remet en question l'hypothèse émise par certaines études selon lesquelles les neurones pourraient être la source du BDNF en circulation^{20, 21 22}. D'un autre côté, après avoir détecté la protéine au niveau des MK et des proplaquettes,¹² il a été suggéré que le BDNF plaquettaire pourrait provenir des MK. Notons que les MK, les plaquettes ainsi que le sérum de souris sont dépourvus de BDNF^{12 23 24}. Le nombre d'études actuelles qui examinent l'origine de la protéine reste faible; ainsi d'autres études futures seront nécessaires afin d'identifier l'origine du BDNF plaquettaire.

Les maladies cardiovasculaires sont considérées parmi les causes principales de la mortalité et de la morbidité dans le monde. L'identification et la gestion des facteurs de risques tels que l'âge, le sexe, la sédentarité, l'obésité, le tabagisme permettent de ralentir l'évolution des maladies cardiovasculaires²⁵. L'utilisation de médicaments tels que les antiplaquettaires comme traitement de premier choix dans les maladies coronariennes s'est traduite, au cours des dernières décennies, par une diminution marquée de la mortalité associée à ces maladies²⁶⁻²⁸. L'espérance de vie des patients augmente grâce aux traitements antiplaquettaires, d'où l'importance soulignée de la prévention et de la découverte de nouveaux biomarqueurs cardiovasculaires permettant le diagnostic de la maladie à un stade précoce.

Les patients coronariens reçoivent des agents antiplaquettaires pour la prévention d'événements thrombotiques. Les agents les plus fréquemment utilisés sont l'ASA (ou l'aspirine) et les inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂ de l'adénosine diphosphate (ADP)²⁹⁻³¹. Les NT et leurs récepteurs sont exprimés au niveau du muscle cardiaque et des vaisseaux en développement^{32, 33}, où le BDNF joue un rôle important au niveau de l'angiogenèse et la contractilité cardiaque³⁴. À ce jour, l'effet des médicaments antiplaquettaires sur la libération du BDNF par les plaquettes demeure méconnu, et ce malgré son abondance dans celles-ci. Il est donc important d'investiguer les effets des antiplaquettaires sur la libération du BDNF par les plaquettes dans le système vasculaire. C'est dans un tel contexte que la présente étude vise à étudier l'effet des médicaments antiplaquettaires sur la libération de BDNF par les plaquettes des patients souffrant de maladie cardiovasculaire stable requérant la prise de médicaments antiplaquettaires.

Cette thèse s'articule en trois volets : le premier comprend la partie théorique résumant nos connaissances actuelles des plaquettes, du BDNF, des maladies cardiovasculaires et des antiplaquettaires. Le deuxième volet présente des contributions originales réunies en deux chapitres, où le premier abordera l'effet des antiplaquettaires sur l'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire chez des patients; le deuxième chapitre présente l'effet du BDNF sur l'agrégation plaquettaire chez les volontaires sains. Le dernier volet propose l'interprétation et la discussion des résultats expérimentaux en concomitance avec les données de la littérature.

Chapitre 1 : Les plaquettes

1.1 La thrombopoïèse

Les plaquettes sanguines ont été décrites pour la première fois par l'italien Giulio Bizzozero comme étant des corpuscules discoïdes sans noyau, constitués d'une membrane et d'une matrice dans laquelle se trouvent quelques granules dispersées³⁵. Depuis, les chercheurs ont consacré d'importants efforts à une meilleure compréhension de leur origine et de leurs rôles physiologique et pathologique. La production de plaquettes est un processus complexe impliquant des cellules souches hématopoïétiques (CSH). La découverte de l'origine des plaquettes revient à James Homer Wright, un pathologiste américain, qui a trouvé que les MK de la moelle osseuse étaient responsables de la production de plaquettes sanguines. En 1958, le terme thrombopoïétine a été inventé pour décrire la substance humorale responsable de la production des plaquettes^{36, 37}. Cette substance est synthétisée principalement par le foie. Il s'agit d'un médiateur physiologique, le plus important dans le processus de régulation de la production des plaquettes³⁸. Il a été estimé que chaque MK donne lieu à 1000-3000 plaquettes avant l'élimination des matières nucléaires résiduelles par phagocytose médiée par les macrophages. Ce processus implique la réorganisation massive des membranes des MK et des composants cytosquelettiques, y compris l'actine et la tubuline, au cours d'un processus actif³⁹. La formation des plaquettes se déroule en plusieurs étapes à partir des cellules souches dans la moelle osseuse; elles perdent progressivement leur capacité d'autorenouvellement et deviennent restreintes à une lignée⁴⁰.

En phase G0, les CSH sont au repos. Peu de divisions cellulaires symétriques en comparaison aux autres phases de différenciations cellulaires se font pour maintenir et reconstituer ce « pool » de cellules. D'autres divisions cellulaires asymétriques suivront, où celles-ci conduiront à la génération de cellules progénitrices. Lors de la thrombopoïèse, les cellules souches migrent hors de la « niche des cellules souches », commençant à se différencier et à proliférer progressivement^{40 41-44}. On observe des phases successives de différenciation cellulaire : la première est caractérisée par l'autorenouvellement (division de type symétrique) des CSH résidant dans les niches ostéoblastiques. Dans la seconde phase, elles prolifèrent et se différencient pour amplifier le nombre de progénitures de MK et cela,

pour devenir des MK immatures avec une capacité de prolifération limitée. Au cours de la troisième phase de développement, les MK immatures subiront une série d'événements de maturation. La maturation cytoplasmique est une des propriétés fondamentales acquises par la lignée mégacaryocytaire pour faciliter une production importante de plaquettes, où cette dernière se situerait entre 2000 et 11 000 plaquettes libérées par les MK dans la moelle osseuse par jour. Le cytoplasme s'organise davantage, de sorte que des corps denses, des vésicules sécrétoires et des organelles comme les mitochondries et les ribosomes se trouvent dans les plaquettes naissantes^{45 46-49}. Bien qu'il soit universellement admis que les plaquettes dérivent des MK, les mécanismes par lesquels les plaquettes se forment et se libèrent de ces cellules précurseurs restent controversés. Plusieurs modèles de production des plaquettes ont été suggérés, notamment le bourgeonnement plaquettaire, la fragmentation cytoplasmique à partir du *Demarcation Membrane System* et la formation des pro-plaquettes⁵⁰. Notons que la reproduction de la biogenèse plaquettaire *in vitro* est un processus qui reste tout de même complexe afin de mimer au plus près le microenvironnement de la moelle osseuse. La découverte de la thrombopoïétine a conduit à la mise en place des systèmes qui récapitulent la biogenèse des plaquettes, ce qui a abouti à une nouvelle compréhension de la thrombopoïèse.

1.2 Le contenu granulaire des plaquettes

Les plaquettes sont des cellules anucléées de forme discoïde avec un diamètre moyen de 2 à 5 μm , une épaisseur de 0,5 μm et une durée de vie d'environ 7 jours. Elles circulent dans le sang à raison de 150 à 350 000 plaquettes / μl ^{50, 51}. Elles sont composées d'une membrane plasmique, du cytosquelette et des granules. Les granules plaquettaires contiennent un grand nombre de protéines variées qui sont libérées lors de l'activation plaquettaire et agissent entre autres sur l'hémostase, la thrombose, l'inflammation et les défenses de l'hôte⁵². Les granules (Figure 1) se divisent en trois types principaux d'organites sécrétoires: les granules denses, les granules α et les lysosomes⁵³. Les granules α contiennent plusieurs protéines adhésives⁵⁴ (comme le fibrinogène, le facteur *von Willebrand* (vWF) qui interviennent dans les interactions plaquettes-plaquettes et plaquettes-endothéliales⁵²) qui sont impliquées dans l'hémostase, ainsi que des glycoprotéines impliquées dans l'inflammation, la cicatrisation des blessures et les

interactions cellulaires^{55, 56}. Elles possèdent une variété hétérogène de facteurs tels que les facteurs de coagulation, des ligands d'adhésion (fibronectine, P-sélectine), des facteurs impliqués dans la fibrinolyse, des facteurs angiogéniques, des cytokines et des glycoprotéines membranaires. Les granules denses sont connus pour rassembler les cations et les petites molécules comme le calcium (Ca^{2+}), la sérotonine, l'ADP, l'adénosine triphosphate (ATP), les polyphosphates et les pyrophosphates. Les lysosomes rassemblent les enzymes (comme les protéases, les phosphatases, et les β -galactosidases), ainsi que des protéines membranaires telles que les *Lysosomal-associated membrane protein*⁵⁷⁻⁵⁹.

La figure 1 présente spécifiquement les contenus des différents granules plaquettaires.

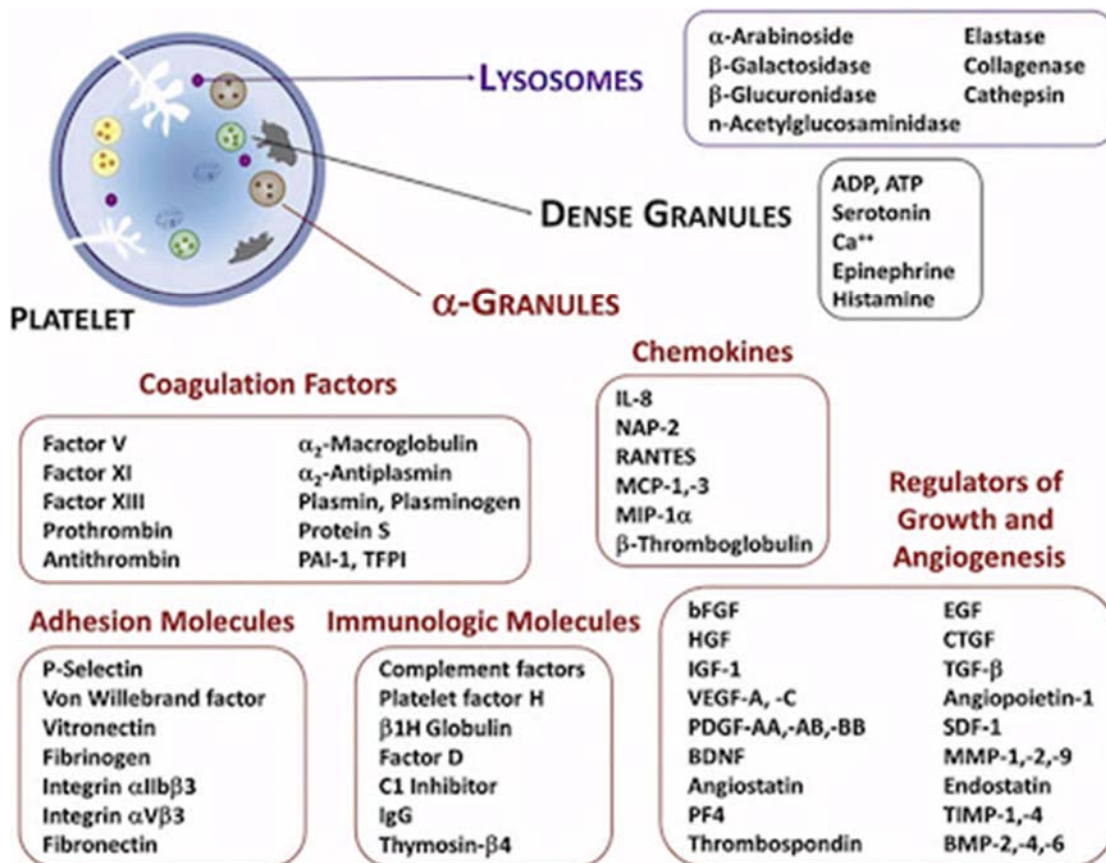


Figure 1: Les divers types de granules plaquettaires.

Les plaquettes stockent une panoplie de substances puissantes pour l'hémostase, la défense de l'hôte, l'angiogénèse et la réparation des tissus. D'après Burnouf T, et al. (*Biomaterials*. 2016;76:371-87)⁶⁰. © 2016, Elsevier Ltd.

1.3 Adhésion et activation des plaquettes

Les plaquettes ont un rôle très important dans l'hémostase. Lors d'une brèche vasculaire, la première étape de ce processus est caractérisée par l'exposition du collagène et des protéines de la membrane basale; ceci permet aux plaquettes d'adhérer à la matrice sous-endothéliale. Les plaquettes adhérentes s'agrègent et libèrent des médiateurs d'activation plaquettaire tels que l'ADP et le thromboxane A₂ (TXA₂). En parallèle, la thrombine est produite par les voies extrinsèque et intrinsèque de la coagulation et contribue à une suractivité plaquettaire et à la génération de la fibrine qui consolide les réactions plaquettaires^{51, 61}.

Une grande variété de récepteurs recouvrent la membrane plaquettaire : des glycoprotéines telles que les intégrines (α IIb β 3, α 2 β 1, α 5 β 1, α 6 β 1, α v β 3)⁶², des récepteurs riches en leucine (GPIIb-V-IX et *Toll-like Receptors*) et des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G (RCPG) comme les *Protease-Activated Receptors* (PARs). Les plaquettes possèdent aussi des récepteurs appartenant à la superfamille des immunoglobulines comme le PECAM au niveau de la membrane plaquettaire^{50, 55}. Lors d'une brèche vasculaire, le collagène de la matrice sous-endothéliale est exposé et lie les récepteurs plaquettaires afin de permettre l'adhésion des plaquettes. Cette interaction est médiée par la fixation du collagène à l'intégrine α 2 β 1 et à la glycoprotéine GPVI⁶³. Ceci active des voies de signalisation qui permettent l'augmentation des niveaux du Ca²⁺ et l'activation des phospholipases^{64, 65}. Par la suite, l'activation plaquettaire se caractérise par un étalement sur la surface et la sécrétion du contenu de leurs granules. La sécrétion de molécules bioactives telles que l'ADP conduit au recrutement d'autres plaquettes circulantes. La signalisation initiée par l'activation des plaquettes provoque également l'activation de l'intégrine α IIb β 3. La liaison du fibrinogène à l'intégrine α IIb β 3 activée contribue à la formation de l'agrégat initial. La coagulation génère la thrombine et la formation de la fibrine qui contribue à la stabilisation du thrombus^{56, 59, 66}. La figure 2 illustre les principales protéines et récepteurs impliqués dans les réactions plaquettaires suite à un endommagement vasculaire et menant à la formation d'un thrombus.

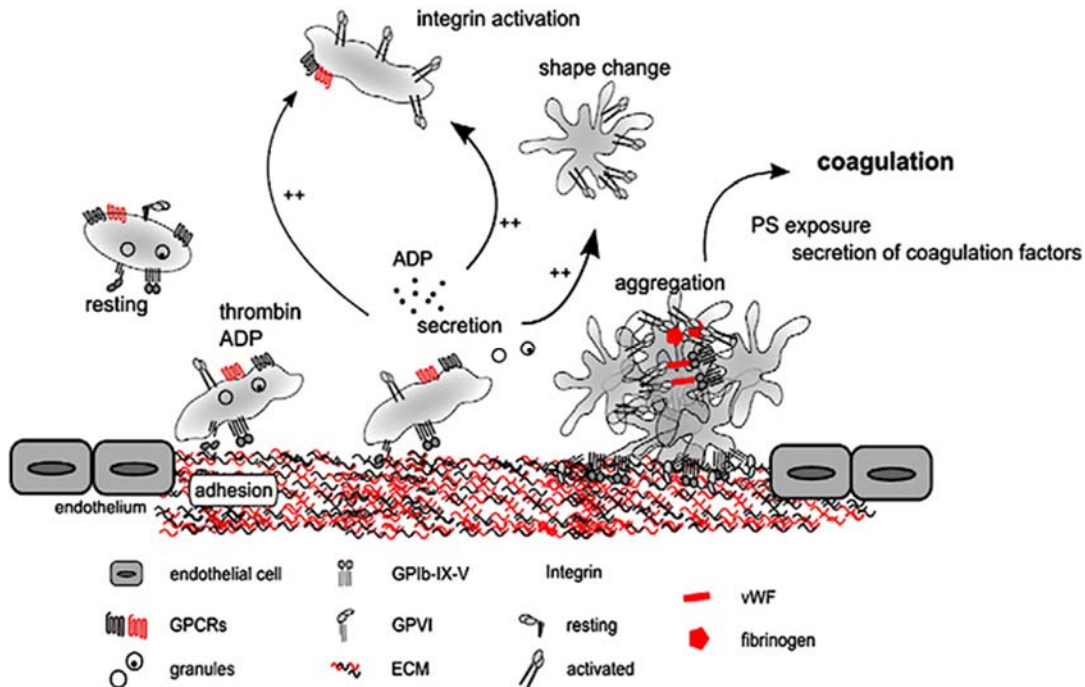


Figure 2: La cascade des réactions plaquettaires menant à la formation du thrombus.

L'adhésion aux composantes de la matrice *via* les récepteurs de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et du GPVI ou l'activation avec des agonistes solubles *via* les RCPG conduit à l'activation des plaquettes. Une des caractéristiques de l'activation plaquettaire est la sécrétion de molécules bioactives à partir des granules, qui peuvent alors agir pour activer d'autres plaquettes de manière autocrine et/ou paracrine. Ceci provoque également l'activation de l'intégrine $\alpha I I \beta 3$. Les plaquettes subissent un changement de forme augmentant leurs surfaces disponibles pour l'adhésion à la matrice et les unes aux autres. L'intégrine activée $\alpha I I \beta 3$ *via* sa liaison au fibrinogène et la fibrine contribuent à la formation du clou plaquettaire initial. La cascade de la coagulation contribue à la stabilisation du thrombus. D'après Golebiewska EM et al. (*Blood reviews*. 2015 ; 29 :153-6)⁵⁹.

1.3.1 Les voies d'activation plaquettaires

Lors de la première étape d'adhésion plaquettaire, les glycoprotéines jouent un rôle primordial en fixant des ligands tels que le vWF ce qui active les protéines kinases qui se trouvent impliquées dans une panoplie de cascades signalétiques, ainsi que dans l'activation de la phospholipase C gamma 2 (PLC $\gamma 2$)⁶⁷.

Les immunorécepteurs de type *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, le GPVI et le GPIb-V-IX vont faire intervenir une signalisation mettant en place des *Src Family Kinases*^{68 69}. Le récepteur GPVI forme un complexe avec le récepteur plaquettaire Fc γ et est associé à certaines kinases telles que les protéines *Tyrosine-protein kinase Lyn* et la *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn*. Il a été rapporté que ces deux protéines

étaient nécessaires pour une signalisation optimale du GPVI^{70, 67, 71, 72}. Une fois les *Src Family Kinases* activées, cette réaction active l'effecteur intracellulaire PLC γ 2, ce qui permet la conversion du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP3). Plus en détail, la *Tyrosine-protein kinase* Lyn et la *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase* Fyn s'associent aux résidus proline au niveau de la queue cytoplasmique du récepteur GPVI, où elles phosphorylent les résidus tyrosine des protéines des chaînes FcR γ : cette cascade cellulaire favorise ainsi l'association d'une deuxième tyrosine kinase, soit la *Spleen tyrosine kinase*. L'interaction de cette dernière déclenche ensuite une cascade de signalisation de protéines adaptatrices *Linker for Activation of T-Cells* et *Src homology domain containing leucocyte protein of 76 kDa* aboutissant à l'activation de la PLC γ 2 et la génération des seconds messagers DAG et IP3^{67, 73 74 75}. Le second messenger DAG active les protéines kinase C (PKC) et l'IP3 se lie à son récepteur au niveau du système tubulaire dense : ceci renforcera la libération du Ca²⁺ à partir des réserves intracellulaires. L'élévation du Ca²⁺ est essentielle dans le processus de l'activation plaquettaire et à la signalisation intracellulaire. Le Ca²⁺ est nécessaire pour presque toutes les fonctions plaquettaires, notamment l'adhésion stable des plaquettes, le changement de forme, l'agrégation et à la sécrétion plaquettaire⁶⁷ (Figure 3). Une génération de TXA₂, fort vasoconstricteur et agent amplificateur de l'activation plaquettaire, permet le recrutement d'autres plaquettes avoisinantes^{70, 72, 76-80 81}.

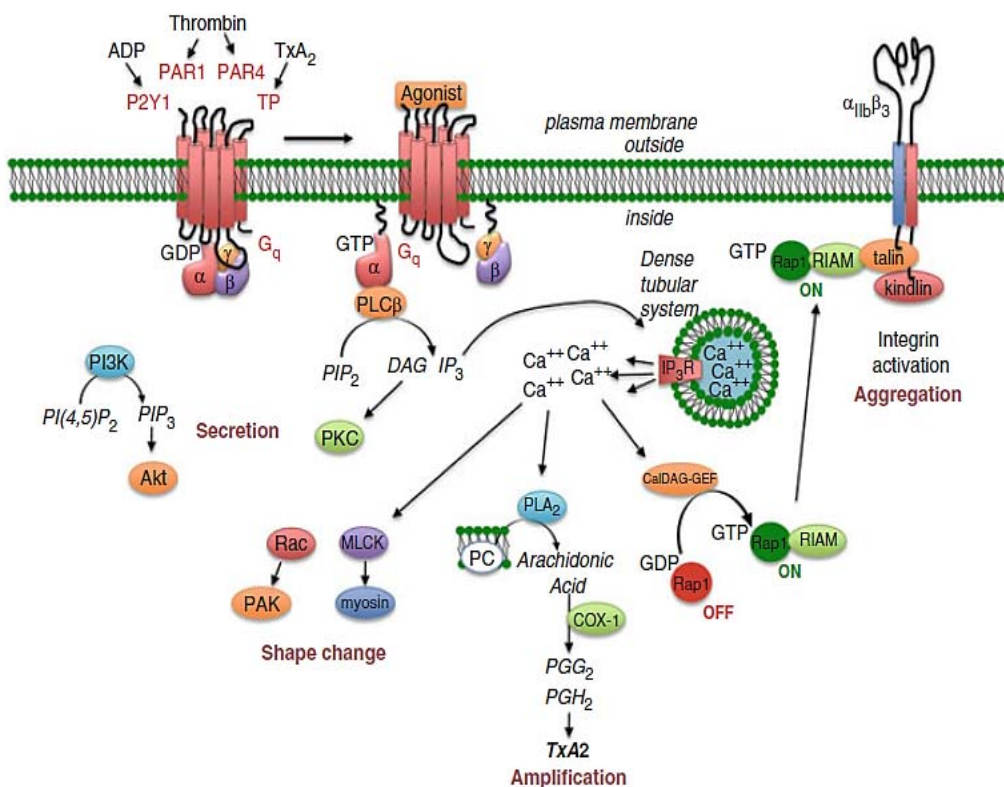


Figure 3: La signalisation des protéines Gq dans les plaquettes induisant la sécrétion, le changement de forme, l'amplification et l'agrégation.

D'après Lawrence F. Brass et al. (*Handb Exp Pharmacol.* 2012:59-85)⁸².

Des récepteurs plaquettaire de type RCPG tels que les récepteurs PARs ou *thromboxane receptor* (TP) vont lier les agonistes solubles lors de l'activation plaquettaire comme la thrombine, l'ADP, l'épinéphrine ou encore le TXA₂, ce qui va amplifier la réponse et recruter d'autres plaquettes circulantes⁸³. Il est de plus en plus évident que les RCPG peuvent signaler par plus d'un mécanisme⁸². Les plaquettes humaines expriment dix membres des familles de protéines G. Cela comprend au moins un membre de la famille G_s, quatre membres de la famille G_i (G_{i1}, G_{i2}, G_{i3} et G_z), trois membres de la famille G_q (G_q, G₁₁ et G₁₆) et deux membres de la famille G₁₂ (G₁₂ et G₁₃)⁸². Le signal est induit *via* les protéines G hétérotrimériques de type α, β ou γ. Les deux propriétés essentielles des RCPG sont la capacité d'interagir avec différentes sous-unités de la protéine G et leurs actions en tant que facteurs d'échange de nucléotide guanine (ce qui permet la libération de guanosine diphosphate pour faciliter la liaison de guanosine triphosphate), activant plusieurs sous-unités de la protéine G pour l'amplification du signal⁸⁴. Les médiateurs

solubles, par exemple l'ADP, la sérotonine, la thrombine, l'épinéphrine ou encore la prostaglandine activent principalement les RCPG qui sont des effecteurs de la transduction du signal au niveau des plaquettes⁸⁵. L'ADP libérée active fortement les plaquettes de manière autocrine et paracrine. L'activation des plaquettes par l'ADP est médiée par les récepteurs, P2Y₁ et P2Y₁₂. Le récepteur P2Y₁ est couplé à une protéine Gq, alors que le récepteur P2Y₁₂ est couplé à la protéine Gi, en particulier à Gi2^{85 86}. L'activation des deux récepteurs est nécessaire pour une activation plaquettaire soutenue et complète⁸⁷. Le récepteur P2Y₁ est nécessaire pour l'induction de l'agrégation plaquettaire par l'ADP et peut initier le processus de l'agrégation plaquettaire, mais ne suffit pas pour une réponse d'agrégation complète à l'ADP^{88, 89}. Le récepteur P2Y₁₂ en particulier est intégralement impliqué dans l'activation des récepteurs $\alpha_{IIb}\beta_3$ stimulés par l'ADP et le TXA₂, provoquant par le fait même une augmentation de la dégranulation des plaquettes, l'achèvement du processus d'agrégation, ainsi qu'une agrégation plaquettaire prolongée^{89, 90 91}. Les signalisations intracellulaires impliquant différents effecteurs, comme cité plus haut, vont converger pour aboutir à des événements communs tels que le changement de forme des plaquettes et la sécrétion granulaire^{92, 93}.

D'autres types de molécules sont classées comme des sensibilisateurs ou amorceurs, comme l'épinéphrine qui n'est pas capable d'activer les plaquettes, mais potentialise l'effet d'autres stimuli. L'épinéphrine agit *via* le récepteur α_2A -adrénergique qui est couplé à une autre classe de protéine G, soit la protéine G_Z membre de la famille des protéines G_i^{94 95}. De plus, les protéines G de type Gi couplent les récepteurs de manière inhibitrice, régulant ainsi une variété de canaux ou d'enzymes, y compris l'adénylate cyclase ou la phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)^{85, 96}.

Chez l'homme comme chez la souris, l'épinéphrine est capable de potentialiser les effets d'autres agonistes. La potentialisation a été attribuée à la capacité de l'épinéphrine à inhiber la formation de l'AMPC. L'épinéphrine n'a pas d'effet direct sur la PLC et ne provoque pas de changement de forme des plaquettes. Les études de *knock-out* montrent que les réponses à l'épinéphrine dans les plaquettes de souris sont abolies lorsque l'expression de G α est abolie⁹⁷.

1.3.2 Les mécanismes impliqués dans la sécrétion granulaire

Bien que les plaquettes soient anucléées, elles peuvent synthétiser une variété limitée de nouvelles protéines^{98,99 100}, à partir de l'ARNm qui a été hérité des MK lors de leur maturation¹⁰¹. Cependant, les contenus granulaires des plaquettes dérivent surtout des MK. Les plaquettes peuvent aussi emmagasiner des protéines circulantes *via* des mécanismes peu explorés^{54, 102}.

Il a été rapporté que les plaquettes libèrent leurs contenus granulaires de manière programmée^{103 104}. Certaines protéines anti-angiogéniques comme l'endostatine ont été localisées dans des compartiments granulaires distincts des protéines proangiogéniques¹⁰⁵. Dans le même contexte, au niveau des plaquettes humaines au repos, il a été noté que le fibrinogène et le vWF sont localisés dans des granules différents et que, lors de l'activation plaquettaire, les plaquettes semblent retenir les deux protéines différemment; cela est cohérent avec leurs localisations dans différentes granules¹⁰⁶. Il est à noter qu'il n'est pas avéré qu'il y ait un lien entre la libération différentielle de contenu granulaire et les niveaux d'activation des plaquettes¹⁰⁷. D'autres preuves comme la présence de différentes classes de granules de type sphérique ou multivésiculaire¹⁰⁸ permet de conclure que l'opinion classique selon laquelle les granules représentent une population homogène est contestée depuis quelque temps. De plus, l'équipe de Kamykowski et *al.*¹⁰⁹ a rapporté, lors du marquage de 15 protéines plaquettaires, différentes localisations des protéines marquées avec une variation considérable de leurs distributions. Les résultats de cette équipe soulèvent deux possibilités : soit qu'il existe plusieurs populations individuelles de granules, soit qu'il n'y a qu'une seule population dans laquelle les protéines sont séparées de manière différentielle par rapport à leurs localisations.

Tout d'abord, l'endocytose et l'exocytose plaquettaire sont deux mécanismes importants dans la sécrétion plaquettaire. L'endocytose est un processus qui se fait en plusieurs étapes et qui emprunte des chemins différents lors du trafic cytoplasmique. De nombreux régulateurs facilitent le cheminement dynamique *via* une signalisation complexe dans les plaquettes¹¹⁰. Lors de la survenue d'un thrombus, l'endocytose permet probablement aux plaquettes de moduler les interactions des récepteurs avec leurs environnements immédiats. Elle permet également aux plaquettes de traduire les signaux en circulation et de fonctionner comme un « aspirateur » vasculaire, recherchant des lésions

ou des dommages et réagissant en fonction de ce qu'elles détectent^{111, 112}. L'exocytose (qui repose sur la sécrétion des granules) dépend de deux événements de fusions membranaires : une fusion homotypique entre les granules et une fusion hétérotopique entre les granules et le système caniculaire ouvert¹¹³. La fusion membranaire joue un rôle clé dans la sécrétion des granules plaquettaires. Après l'activation des plaquettes, les granules s'accumulent au centre de la cellule et peuvent fusionner ensemble et avec le système canaliculaire ouvert, libérant alors leur contenu dans l'espace extracellulaire¹¹⁴⁻⁵⁵. De plus, il semble que la perturbation de la barrière du cytosquelette au repos facilite la sécrétion des granules, mais qu'un certain degré de polymérisation de l'actine soit toujours nécessaire pour cette dernière¹¹⁵⁻¹¹⁷. Ce mécanisme se fait grâce à la membrane plasmique et implique une classe de protéines nommée *Soluble NSF Attachment Protein Receptors* (SNAREs). Les SNAREs associées aux granules sont appelées les vSNARE pour « vésiculaires », tandis que celles associées à la membrane sont appelées les tSNARE pour cibles ou « *target* »¹¹⁸. La dégranulation s'opère grâce à une machinerie complexe et une multitude de protéines qui nécessitent de l'ATP pour une production d'énergie suffisante afin de catalyser des réactions permettant la fusion des membranes¹¹⁹. Ce processus ATP-dépendant permet l'association et la dissociation des SNAREs. Ainsi, chacune de ces protéines SNAREs a une distribution sous-cellulaire distincte dans les plaquettes, et chacun de ces compartiments membranaires présente une composition de protéine SNARE unique¹²⁰. Elles regroupent des classes de protéines importantes comme les *Vesicle-Associated Membrane Protein* (VAMP), les syntaxines (Stx) et les *Synaptosome-Associated Protein* (SNAP) qui diffèrent par leur localisation et les protéines qui s'y associent. La protéine VAMP8 est la plus dominante au niveau des plaquettes et va être responsable de la dégranulation des granules α . Les Stx2 et 4 participent à la sécrétion des granules α ¹¹⁸. Les vSNARE et les tSNARE interagissent ensemble pour former un complexe d'arrangement de quatre hélices parallèles en structure *coiled-coil*, ce qui conduira à la fusion des membranes et achèvera le processus d'exocytose (Figure 4). La polymérisation de l'actine facilite la sécrétion des granules α , deux protéines s'y trouvent impliquées après l'activation des plaquettes, soit la VAMP8 et la Stx2. D'autres protéines comme les protéines SNAP-23 et Stx4 sont associées à l'actine dans les plaquettes au repos et après leurs activations^{52, 117}. Il a été rapporté que la Stx2 permet la libération des facteurs pro-

angiogéniques^{121 119}, tandis que la Stx4 permet la libération des facteurs anti-angiogéniques, ce qui montre que la nature des Stx influence la libération des granules α ¹¹⁹. Bien que des études aient démontré un rôle pour les VAMP dans la sécrétion plaquettaire^{111, 120, 122}, il reste à comprendre leurs répartitions et leurs fonctions relatives dans le phénomène d'étalement plaquettaire.

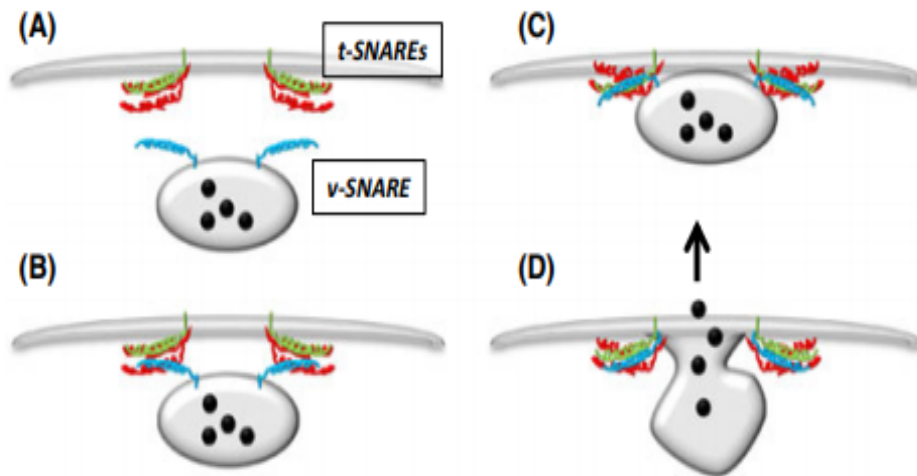


Figure 4: La fusion des granules médiée par le complexe SNARE.

Les vSNARE et les tSNARE résident sur des membranes opposées. En réponse à une stimulation, les vésicules se dirigent près de la membrane cible et des quatre domaines SNARE associés (A). Un changement de conformation dans le complexe rapproche les membranes (B) et conduit finalement à lier la membrane permettant (C) la fusion des membranes et la libération de contenus granulaires (D). Ce modèle est le cœur de la machine SNARE qui est exprimée de manière omniprésente dans toutes les cellules eucaryotes. D'après Golebiewska EM et al. (*British journal of haematology*. 2013)¹²³. ©, 2013 *British Journal of Haematology*.

Les plaquettes contiennent 7 familles de GTPases. Parmi ces enzymes, on trouve la famille rab qui rassemble plus de 60 membres et qui est associée à tous les événements de transport vésiculaire dans de nombreuses cellules¹²⁴. Les unes contrôlent la maturation des granules denses et d'autres régulent le flux de Ca^{2+} nécessaire à l'exocytose^{123, 125}. La suppression de la GTPase rab27b induit un défaut de nombre des granules et de la sécrétion, ce qui implique le rôle important de ces GTPases dans la sécrétion plaquettaire^{59, 123, 126}. L'équipe de Huang et al¹²⁷ a utilisé les petites GTPases comme marqueurs pour montrer la présence de deux populations distinctes d'endosomes : les endosomes précoces et les

endosomes recyclés. Ces compartiments distincts liés à la membrane peuvent être des stations de cheminement pour les molécules internalisées¹²⁸. Les GTPases lient des protéines comme la *Protein unc-13 homolog D* (Munc13D ou Munc13-4) qui est très exprimée dans les plaquettes et qui a été initialement identifiée comme une protéine de liaison à rab27b. Rab27b régule la sécrétion des granules denses par sa liaison à Munc13D, suggérant le rôle important de ces GTPases dans la sécrétion des plaquettes^{123, 126}.

La PKC phosphoryle la *mammalian uncoordinated-18* en inhibant son interaction avec la Stx 4, la libérant pour se lier aux vSNARE et réguler ainsi la fusion membranaire¹²⁹¹³⁰. Étant donné que Munc18c est associé avec les Stx 2 et 4, il joue donc un rôle important *via* son intervention dans les événements de sécrétion plaquettaire. La dissociation de la protéine Munc18c et de la Stx 4 induite par le Ca²⁺ favorise l'exocytose, où ce processus est probablement dû à la phosphorylation de la PKC^{121 113 131}.

De plus, la phosphorylation d'une autre protéine appartenant à la même famille, soit la *mammalian uncoordinated-18*, affecte la dynamique de la sécrétion ainsi que la cinétique, mais pas le nombre d'événements plaquettaires¹³². Il a été également démontré que la phosphorylation de Munc18a a diminué son affinité pour la Stx d'environ 100 fois¹³²¹³³ et que la phosphorylation de Munc18a contrôle le processus de fusion membranaire, mais peut ne pas jouer de rôle dans l'assemblage du complexe SNARE¹³⁰. Il existe encore quelques incertitudes concernant les protéines clés ayant un impact direct sur la sécrétion plaquettaire, mais il semble donc que les protéines *mammalian uncoordinated-18* soient nécessaires pour l'exocytose et l'agrégation plaquettaire.

La PKC phosphoryle également la Stx 4 et la SNAP-23, qui modulent probablement leurs interactions favorisant la fusion vésiculaire¹³⁴. Il a été rapporté que la PKC dans les plaquettes activées et ses effets inhibiteurs sur la liaison de la Stx 4 peuvent jouer un rôle important dans le processus de signalisation intracellulaire et de la sécrétion plaquettaire¹³⁵. De ce fait, la phosphorylation par la PKC peut être importante pour moduler les interactions du complexe SNARE pendant le trafic membranaire et la fusion vésiculaire.

Plus récemment, des études évaluant les mécanismes moléculaires de la fusion des membranes plaquettaires ont démontré le rôle des protéines SNARE comme des régulateurs importants de la sécrétion^{136, 137}. Plusieurs SNAREs sont phosphorylées d'une manière dépendante de la PKC^{132, 134, 138}. Chez la souris, il a été montré que l'absence de la

PKC α implique une réduction très importante de la sécrétion des granules α et δ en réponse aux agonistes,¹³⁹ ce qui montre le rôle de cette classe de kinases dans la biogenèse des granules. Les différentes isoformes de PKC ont des fonctions spécifiques et figurent parmi les régulateurs importants de la sécrétion plaquettaire, ce qui montre leurs implications dans la formation du thrombus^{139 140}. Finalement, il est clair que le contenu plaquettaire est hétérogène et que la sécrétion plaquettaire est une machinerie complexe qui assure un contrôle différentiel de protéines.

1.4 La thérapie antiplaquettaire

La thérapie antiplaquettaire joue un rôle important dans la gestion des maladies cardiovasculaires et vise à inhiber les voies d'activations plaquettaires qui sont impliquées dans les réactions thrombotiques et les complications de la maladie. Par conséquent, les patients qui risquent fortement de développer des maladies coronariennes (prévention primaire) et ceux qui sont atteints de maladie coronarienne (prévention secondaire) reçoivent des agents antiplaquettaires en prévention des événements thrombotiques. Les agents les plus fréquemment prescrits sont l'ASA et les inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂. Le premier inhibe la cyclo-oxygénase de type 1 (COX-1), l'enzyme responsable de la formation de TXA₂ (un activateur plaquettaire et un vasoconstricteur), et l'autre inhibe la fixation de l'ADP au récepteur P2Y₁₂¹⁴¹ (Figure 5). L'ADP est responsable de l'amplification du signal plaquettaire et du recrutement des plaquettes avoisinantes *via* sa liaison au P2Y₁₂³⁰. La double thérapie, en associant l'ASA avec un antagoniste des récepteurs P2Y₁₂ comme le Clopidogrel, le Prasugrel ou le Ticagrelor, a été évalué bénéfique chez des patients avec un syndrome coronarien aigu (SCA) et/ou ceux subissant une intervention coronarienne percutanée¹⁴².

La thérapie antiplaquettaire repose aussi sur d'autres types d'inhibiteurs pharmacologiques qui visent un autre type de récepteur, tels que l'intégrine α IIb β 3 qui est inhibée par des antagonistes spécifiques comme l'Abciximab. La stimulation des plaquettes en circulation par des agonistes tels que le collagène, la thrombine, ou par des forces biomécaniques, telle la contrainte de cisaillement, entraîne l'activation des plaquettes *via* une signalisation qui produit des changements de conformation de l'intégrine

α IIb β 3, conduisant à une agrégation plaquettaire qui sera abolie par l'intervention d'un antiplaquettaire¹⁴¹ (Figure 5).

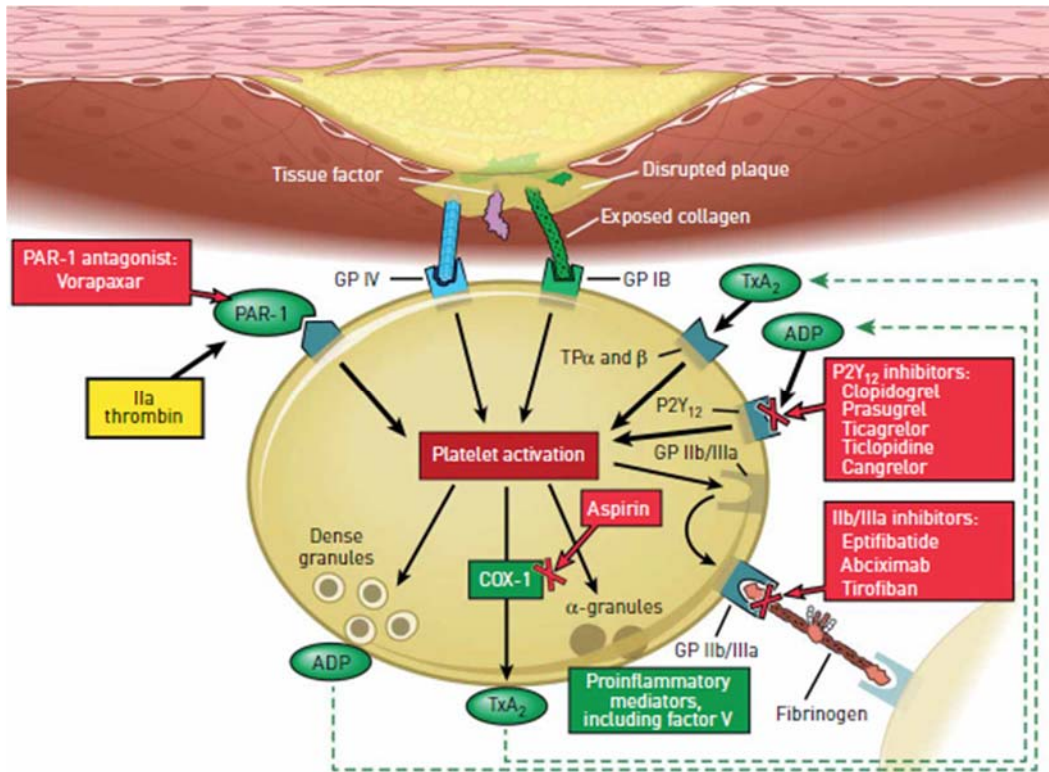


Figure 5: Sites d'actions des antiplaquettaires

D'après Abuqayyas S et al. (*Eur Respir Rev.* 2017;26)¹⁴³.

Dans la partie suivante, nous décrivons seulement les antiplaquettaires qui ont été utilisés dans le cadre de ce projet de recherche.

1.4.1 L'ASA

Les effets pharmacologiques de l'ASA ou l'aspirine sont médiés principalement par son interférence avec la biosynthèse des prostaglandines et persistent au cours du cycle de vie des plaquettes¹⁴⁴. Cette voie de synthèse commence par la génération de l'AA qui constitue ensuite le substrat sur lequel se déroule une série de réactions enzymatiques afin de libérer les prostaglandines par les cyclooxygénases (COX), puis le TXA₂ par le thromboxane synthétase⁵⁰. Même à faible dose, l'ASA inhibe la synthèse des

prostaglandines ce qui inhibe à son tour la voie d'amplification de l'activation plaquettaire¹⁴¹.

L'ASA est rapidement absorbé par l'estomac et l'intestin, et les concentrations plasmatiques maximales surviennent 30 à 40 minutes après l'ingestion. Ainsi, l'inhibition de la fonction plaquettaire est évidente après 1 heure¹⁴⁴.

Il existe deux isoformes de COX, soit les isoformes 1 et 2. La COX-1 est la forme constitutive au niveau des plaquettes, alors qu'une faible expression de la COX-2 a été détectée au niveau des plaquettes humaines⁵⁰. Le mécanisme moléculaire de l'inactivation permanente de l'activité de l'enzyme par l'ASA est dû à l'acétylation d'un résidu de sérine situé en position 529 de la COX-1 et en position 516 de la COX-2, ce qui empêche l'accès du substrat au site catalytique de l'enzyme^{141, 144 145}.

Une méta-analyse a démontré que la prévention primaire chez les patients à haut risque repose sur l'utilisation d'une dose journalière de 75 mg d'aspirine. De même, la dose optimale suggérée pour les patients après un SCA est aussi de 75 mg en prévention secondaire¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Pour les préventions secondaires, une double thérapie à l'aspirine en association avec un deuxième antiagrégant plaquettaire comme un inhibiteur du récepteur P2Y₁₂ montre une meilleure efficacité¹⁴⁶. Dans les années 80, la deuxième étude internationale sur l'infarctus du myocarde (IM), (ISIS-2)¹⁴⁹ a démontré que l'aspirine était aussi efficace pour réduire la mortalité vasculaire que la streptokinase (appartenant à la famille des médicaments fibrinolytiques), sans induire une hémorragie cérébrale. Dix ans plus tard, le même résultat a été démontré¹⁵⁰. L'efficacité de l'aspirine comme un moyen de prévention de l'IM et de la mort vasculaire chez les patients atteints d'athérosclérose est évidente. L'étude d'*Antithrombotic Trialists Collaboration*¹⁴⁶, qui a mené 100 essais avec l'aspirine, a rapporté une réduction de 25% de tous les événements vasculaires, une réduction de 30% de l'IM et une réduction de 15% des décès comparativement au placebo. Les bénéfices sur l'ensemble des événements dépassent largement le risque de saignement¹⁵¹. L'aspirine reste donc une partie essentielle du traitement et de prévention secondaire des syndromes ischémiques.

Un autre point à souligner quant à cet antiplaquettaire est le problème de la « résistance » qui contribue à la réponse variable des patients au traitement. Des données suggèrent que des patients pourraient être hyporéactifs à l'aspirine et que ce manque de

réponse pourrait être associé à des événements ischémiques récurrents. Les patients résistants à l'aspirine présentent un risque plus élevé de morbidité cardiovasculaire à long terme^{152, 153}. La résistance biochimique réelle à l'aspirine, mesurée par l'activité directe de l'enzyme COX-1, n'est observée que chez un nombre faible de patients (<1%)¹⁵⁴.

1.4.2 Les inhibiteurs des récepteurs purinergiques P2Y₁₂

En général, la liaison de l'ADP au P2Y₁₂ inhibe l'activité de l'adénylate cyclase qui assure le maintien des plaquettes au repos par la libération de l'AMPc¹⁵⁵.

Le récepteur P2Y₁₂ est également impliqué dans la potentialisation de la sécrétion plaquettaire indépendamment de la génération de TXA₂¹⁵⁶ et intervient dans la stabilisation des agrégats plaquettaires induite par la thrombine ou le TXA₂^{155, 157}. La ticlopidine a été la première thiéno-pyridine à être utilisée en clinique au début des années 90. Elle a démontré un bénéfice significatif pour la prévention des événements cardiovasculaires secondaires après un SCA¹⁵⁸. L'aspirine pourrait inhiber l'effet de l'agrégation induite seulement à de faibles doses d'ADP. À forte dose d'ADP, il faut l'intervention des agents antiplaquettaires tels que le Clopidogrel, le Ticagrelor ou encore le Prasugrel. Le métabolite actif du Clopidogrel qui appartient à une famille de huit stéréo-isomères a été identifié au cours de l'année 2000 par *Savi et al.*¹⁵⁹. Il s'agit d'une inhibition irréversible qui s'effectue au niveau de la protéine P2Y₁₂. Le Clopidogrel inhibe sélectivement le récepteur P2Y₁₂ sans avoir un effet sur les récepteurs P2Y₁ et P2X₁ de l'ADP^{160, 161}. Les récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ sont différenciellement impliqués dans l'agrégation plaquettaire, le P2Y₁ ne jouant qu'un rôle mineur, tandis que le P2Y₁₂ soutient l'amplification de ces réponses¹⁵⁵. La liaison de l'ADP à P2Y₁ stimule l'activation du récepteur α IIb β 3, ce qui entraîne la mobilisation du Ca²⁺, le changement de forme et l'agrégation transitoire des plaquettes^{162, 163}. Notons que cet antiplaquettaire inhibe l'activation du récepteur α IIb β 3 en réponse à l'ADP sans avoir à moduler les niveaux du Ca²⁺ plaquettaires^{161, 162}.

Le bénéfice de la double thérapie a induit une avancée spectaculaire dans le traitement des SCA, mais le risque des saignements est à prendre en considération chez ces patients pendant le traitement^{164, 165}. Un nombre important de patients continue de présenter des complications thrombotiques récidivantes lors du traitement par le clopidogrel¹⁶⁵. Une variabilité dans la réponse au traitement est a été attribuée aux polymorphismes génétiques

et à la pharmacocinétique de la molécule¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. Jusqu'à 25%, des patients avec un sous *ST-segment-elevation myocardial infraction* présentent une résistance à cet inhibiteur¹⁶⁸.

Deux nouveaux antagonistes puissants de l'ADP comme le Prasugrel et le Ticagrelor réduisent les complications thrombotiques, mais leurs métabolismes sont différents de celui du clopidogrel^{170, 171}. Ces nouveaux antiplaquettaires ont un profil pharmacocinétique et pharmacodynamique plus favorable que le Clopidogrel et ne semblent pas interagir avec les polymorphismes génétiques identifiés à ce jour. Les variantes génétiques du cytochrome ont des effets variables sur la réponse inhibitrice plaquettaire du Clopidogrel et du Prasugrel, en raison de leurs voies métaboliques distinctes menant à la production de métabolites actifs. Le Ticagrelor agit comme antagoniste de l'ADP à action directe et réversible et ne subit pas de biotransformation dépendante de ces cytochromes^{172, 173 142}.

1.4.3 Les inhibiteurs du récepteur $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

Cette intégrine plaquettaire est hautement exprimée au niveau de la surface plaquettaire et elle est connue depuis longtemps comme un récepteur d'adhésion et d'agrégation. Ce récepteur subit un changement de conformation, suite à l'activation plaquettaire, qui lui permet de fixer différents ligands tels que le fibrinogène qui forme des ponts entre plaquettes activées, induisant ainsi une agrégation plaquettaire^{92, 174}. Dans les plaquettes au repos, l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est maintenue dans un état de faible affinité¹⁷⁵. Il existe maintenant de nombreuses preuves selon lesquelles l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activé peut agir en tant que transducteur de signal en se couplant à des effecteurs intracellulaires pour générer une multitude d'événements de signalisation. L'étalement plaquettaire, la formation de thrombus stable et la rétraction du caillot impliquent des contributions importantes de la machinerie plaquettaire et, par conséquent, une signalisation *via* l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ^{176 199}. La famille SFK joue un rôle dominant dans ces événements de signalisation. La liaison du ligand à l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ déclenche une signalisation *outside-in* avec une affinité élevée. La signalisation déclenchée met en jeu plusieurs kinases parmi lesquelles on trouve les Src, Spleen tyrosine kinase, PI-3K, SLP-76 et PLC γ 2. Cette signalisation mène à la sécrétion du contenu des granules et à la génération de TXA₂^{76 177 178, 179}. D'autres effecteurs sont impliqués dans la sécrétion et la désensibilisation des récepteurs tels que les isoformes de

la PKC⁸⁴. Il a été rapporté que les isoformes PKC β et PKC θ sont associées à des queues cytoplasmiques de l'intégrine $\beta 3$ ¹⁷⁵, ce qui a fait de ce récepteur une cible pharmacologique intéressante afin de bloquer l'agrégation des plaquettes^{180, 181}. Les traitements actuels sont l'Abciximab, le Tirofiban et l'Eptifibatide et sont administrés par voie intraveineuse¹⁸². L'Abciximab (ReoPro[®]) se lie irréversiblement à son récepteur afin de bloquer la liaison de fibrinogène et d'autres molécules d'adhésion, ce qui supprime l'agrégation plaquettaire¹⁸³. Il s'agit du premier composé qui a été introduit en clinique dans cette classe et qui est un fragment Fab (Fragment de liaison de l'antigène) chimérique d'un anticorps monoclonal¹⁸⁴. Après le succès clinique du composé, l'Abciximab est devenu la molécule modèle pour la poursuite du développement de médicaments. À noter que le site de liaison de l'Abciximab est situé au niveau de la sous-unité β du récepteur et il est différent de celui de l'Eptifibatide et du Tirofiban qui sont des inhibiteurs peptidiques^{180, 185}.

Finalement, pour avoir un meilleur effet antiplaquettaire, les lignes directrices actuelles recommandent que l'ASA soit prescrit à vie chez des patients atteints d'une maladie coronarienne, et que la combinaison d'ASA avec un inhibiteur des récepteurs P2Y₁₂ soit initiée lors d'un SCA ou d'une intervention percutanée de revascularisation et soit maintenue pour 12 mois¹⁸⁶.

Plusieurs autres types d'agents antiplaquettaires comme l'antagoniste du PAR-1 le Vorapaxar et d'autres qui sont actuellement en développement clinique comme les antagonistes des récepteurs P2Y₁, les inhibiteurs oraux des glycoprotéines, des antagonistes du récepteur GPVI^{187 188}, mais ne seront pas abordés dans le cadre de cette thèse.

Chapitre 2 : **Le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)**

2.1 Les neurotrophines

Les neurotrophines (NTs) sont des protéines qui régulent différentes étapes du développement biologique et de fonctions neuronales comme la survie et la synaptogenèse tant à l'échelle embryonnaire qu'à celle de l'âge adulte. Elles sont d'abord synthétisées en tant que pro-NTs qui sont activées biologiquement et subissent un clivage enzymatique afin de libérer la forme mature¹⁸⁹. Il s'agit d'un groupe de protéine qui inclut le NGF (Nerve Growth Factor), le BDNF, la NT3, la NT4 et la NT5 au niveau du cerveau des mammifères. Il a été mis en évidence qu'elles sont neuroprotectrices et qu'elles agissent afin de permettre la survie neuronale. Ces actions sont médiées par l'intermédiaire de deux types de récepteurs; les TrK appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase et les récepteurs p75^{NTR}^{190, 191}. Le p75^{NTR} est un récepteur transmembranaire de type I, qui possède un domaine extracellulaire, un domaine intracellulaire, un domaine de mort ainsi qu'un domaine d'activation pour la protéine G¹⁹². Ce récepteur a été considéré comme récepteur de NT de « faible affinité ». Bien qu'il ne possède pas de domaine kinase, le p75^{NTR} peut coopérer avec de nombreux partenaires comme la sortiline pour former des complexes de récepteurs multimériques^{193, 194}. En plus des interactions extracellulaires, le domaine intracellulaire de p75^{NTR} peut également interagir avec des protéines adaptatrices comme le *TNF Receptor Associated Factor 6* (TRAF6)^{1, 195, 196}. Des déficits sensoriels et sympathiques importants, mais incomplets, sont observés chez des souris dépourvues de p75^{NTR}^{197, 198}. Les effets biologiques lors de la signalisation par les NTs et/ou les pro-NT *via* les récepteurs TrK et/ou p75^{NTR}, sont différents et souvent opposés. Il s'agit d'un phénomène qui repose sur la nature du ligand et la voie intracellulaire activée. Des recherches rapportent que l'activation des récepteurs TrK par les NTs va promouvoir la survie cellulaire et la transmission synaptique, alors que des preuves solides existent à l'appui d'un rôle opposé lors de l'activation du récepteur p75^{NTR} qui repose sur le déclenchement de la voie de l'apoptose (Figure 6)¹⁹⁹¹. Le BDNF, et les NT4 / 5 peuvent chacun se lier au récepteur TrKB. Le NGF est le ligand du récepteur TrKA. Le NT3 semble être le ligand des récepteurs TrKC^{200 201}. Par conséquent, le récepteur p75^{NTR} lie les NTs et les pro-NTs et il serait le récepteur par haute affinité au pro-BDNF²⁰² qui est le précurseur de la forme mature du BDNF. Les NTs agissent *via* une voie autocrine ou

paracrine suite à l'activation de leurs récepteurs spécifiques. L'interaction entre le BDNF et le TrkB est à l'origine de plusieurs processus dont la survie cellulaire et la régulation de l'activité synaptique¹⁹³.

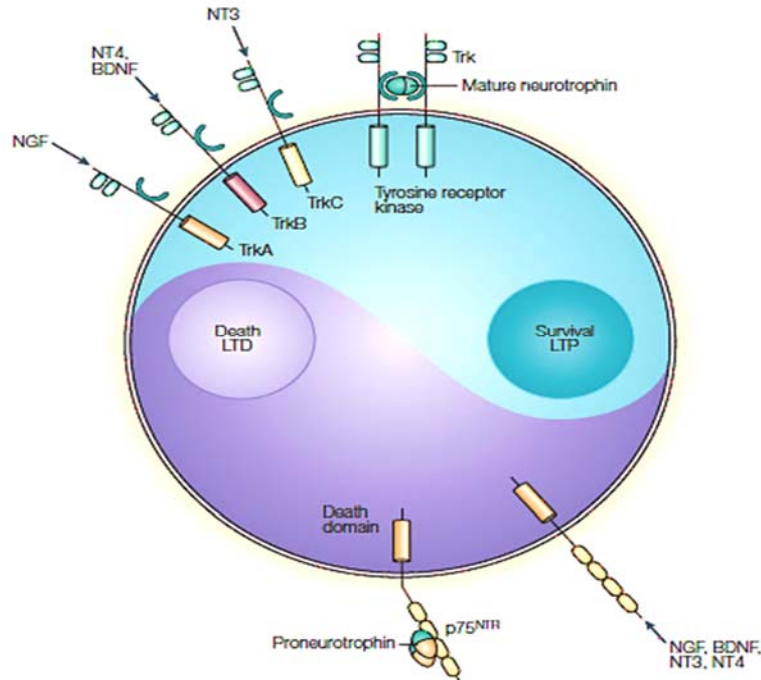


Figure 6: Le yin et le yang des récepteurs et des fonctions des NTs.

D'après Lu B et al. (*Nature reviews Neuroscience*. 2005;6:603-14)¹. © 2005, Springer Nature.

2.2 Le BDNF au niveau central

Le BDNF est une NT qui a été découvert en 1982 où 1 µg / 1.5 kg a été isolé au niveau du cerveau porcin. Il s'agit du deuxième facteur découvert peu de temps après le NGF²⁰³⁻²⁰⁵. Le BDNF est une protéine neuroprotectrice qui joue un rôle dans le développement et la maturation du SNC en stimulant la survie, la différenciation, le maintien de la plasticité synaptique et l'induction de la neurogenèse et la synaptogenèse. La fonction neuronale du BDNF est principalement médiée par son récepteur tyrosine kinase ou TrK, qui se retrouve sur les terminaisons synaptiques^{6 4 206-208 209}. Il participe à la croissance et à la ramification des terminaisons axonales des neurones périphériques et centrales. De plus, il a été démontré chez la souris que la suppression de TrkB pendant le développement neuronal entraîne une diminution des varicosités axonales, une diminution du nombre des synapses et une altération de la morphologie ultra-structurale des synapses

de la région CA1 de l'hippocampe, ce qui met en évidence son rôle dans l'embryogenèse^{210, 211 212}. Il a été suggéré que le BDNF avait la capacité de contrôler non seulement le maintien de la structure dendritique, mais aussi la forme et le nombre des épines dendritiques. Des recherches montrent que la signalisation du BDNF-TrKB régule de manière sélective la croissance dendritique. Le contrôle de la croissance dendritique peut mettre en jeu deux voies de signalisations *via* la phosphorylation de TrKB soient la voie de l'AMPC et la voie de la PLC γ ^{213, 214 215}. En se liant à son récepteur, le BDNF régule sa propre production. Cette boucle d'autorégulation pourra être en effet crucial dans le contrôle de développement, la croissance, la forme et la densité des neurones^{216 217}. La signalisation du BDNF qui assure la plasticité synaptique passe par les récepteurs inotropes au glutamate *N-Methyl-D-aspartate* (NMDA). À travers le BDNF, ce récepteur est un acteur principal dans la consolidation de la mémoire qui se fait par une interaction directe ou indirecte avec le récepteur NMDA. Certains auteurs se sont mis d'accord sur le fait que le BDNF modulait l'activité des récepteurs NMDA qui aurait un impact sur les fonctions cognitives²¹⁸⁻²²⁰. L'élévation des concentrations calciques régule l'ARNm de la NT et sa sécrétion. Il s'agit d'un mécanisme courant afin d'induire la transcription du gène du BDNF au niveau du SNC dont la signalisation se fait *via* l'augmentation des niveaux de l'AMPC et de l'activation des certaines voies intracellulaires telles que la voie *AMPC Response Element-binding protein* (CREB), la voie *nuclear factor-kappa B* (NF κ B), la voie *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase* (CaMKII) ou encore de *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)^{221 222 223}. Une fois libéré au niveau des synapses, le BDNF active les récepteurs TrKB, ce qui entraîne l'activation des cascades de signalisation en aval et l'expression ultérieure de gènes essentiels à la survie et à la plasticité des neurones. La signalisation par le BDNF entraîne également des effets rapides sur l'excitabilité membranaire et la transmission synaptique, notamment en modifiant la cinétique d'activation des récepteurs NMDA et en augmentant le nombre de vésicules synaptiques au niveau des terminaisons présynaptiques (Figure 7)²²⁴.

Au niveau de l'hippocampe adulte, le BDNF mature joue un rôle primordial dans le maintien de la potentialisation à long terme. Ce phénomène va permettre une transmission du signal plus efficace entre deux neurones, ce qui va promouvoir la transmission synaptique. Les niveaux élevés du Ca²⁺ déclenchent l'activation de courte

durée de plusieurs enzymes qui interviennent dans l'induction de la potentialisation. Grâce à ses actions sur les NMDA, le BDNF pourrait aussi moduler la potentialisation à long terme par le renforcement de l'influx du Ca^{2+} au niveau des terminaisons dendritiques²²⁵²²⁶²²⁷. Or, un déficit au niveau des taux centraux du BDNF a une conséquence importante sur la signalisation synaptique. Il a été noté que les effets du BDNF mature ne se limitent pas qu'à l'induction de la potentialisation à long terme. En effet, il peut y avoir un rôle inhibiteur pour promouvoir celle-ci en inhibant le signal de la dépression à long terme, qui est considéré comme une atténuation de la transmission synaptique, dans l'hippocampe et le cortex visuel. Dans ce cas, le rôle du BDNF est bidirectionnel^{228, 229}.

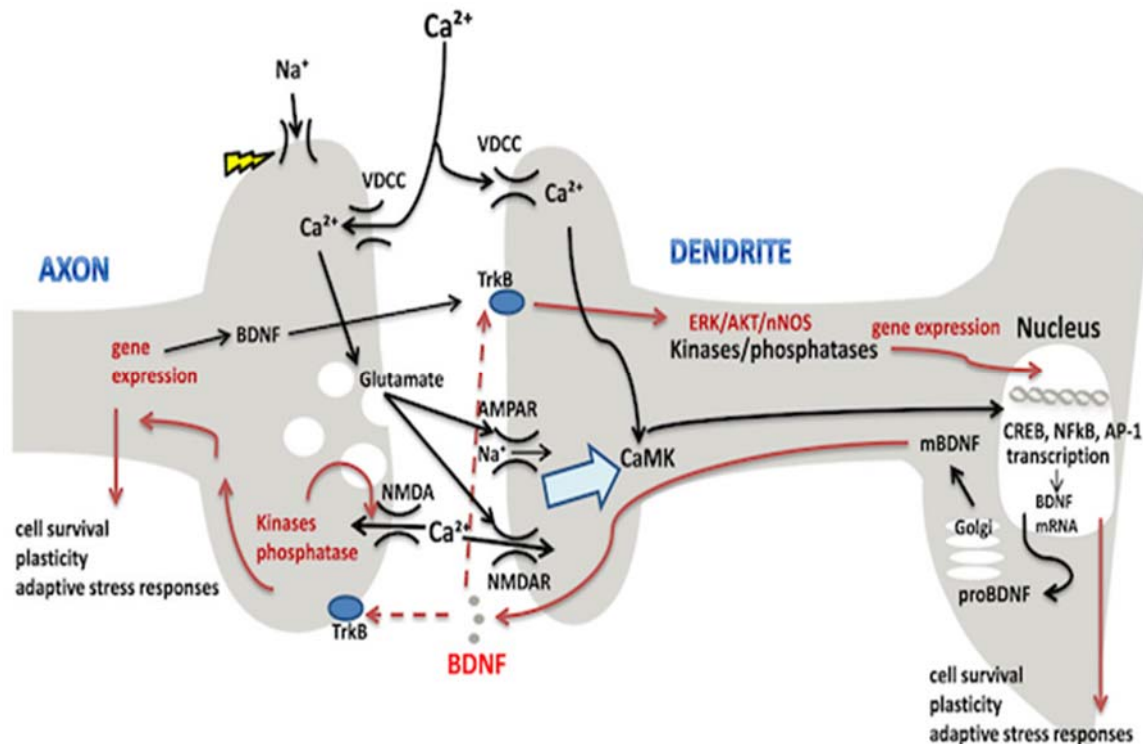


Figure 7: Les actions biologiques du BDNF.

Lorsqu'un potentiel d'axone atteint la terminaison présynaptique, l'influx du sodium dépoliarise la membrane plasmique, ce qui déclenche l'influx du Ca^{2+} et la libération du glutamate. Le glutamate se lie aux récepteurs spécifiques au niveau de la membrane postsynaptique. L'induction de ces récepteurs entraîne une dépoliarisation de la membrane et l'augmentation du Ca^{2+} . Cette action engage les voies de signalisation CaMK, CREB et NFκB qui induisent à leur tour la transcription génétique du BDNF. D'après Marosi K et al. (*Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2014;25:89-98)²²⁴. © 2014, Elsevier Ltd.

Le BDNF est impliqué dans la récupération neurologique post-ischémique, car le prétraitement au BDNF, intraventriculaire chez le rat, réduit la taille de l'infarctus après une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne²³⁰, ce qui améliore la récupération des fonctions neurologiques après une lésion cérébrale ischémique. En 2009, l'équipe de *Ploughman et al.*²³¹ publiait la première étude démontrant l'importance du BDNF dans le réapprentissage de la motricité après un AVC. Il a été proposé qu'il soit possible que l'effet du BDNF dans cette récupération passe à travers plusieurs mécanismes : le premier consisterait en la protection contre les lésions ischémiques aiguës; suivi par l'induction de l'angiogenèse et finalement, la stimulation de la neurogenèse et de la plasticité synaptique²³². De ce fait, il est évident que le rôle du BDNF au niveau du SNC est d'une importance cruciale.

2.3 Structure génétique du BDNF

Chez l'homme, le gène codant le BDNF est au niveau du chromosome 11p de la région p13 et 14. Le gène du BDNF humain couvre environ 70 kb. Le gène du BDNF humain et des rongeurs contiennent neuf exons (I – IX), où chaque exon possède son propre promoteur, résultant en au moins 10 transcriptions différentes, et tous les transcrits sont traduits en une protéine BDNF identique. La distribution des exons se trouve au niveau central et périphérique, de ce fait on trouve les exons I, II et III au niveau du SNC et l'exon IV dans le cœur et les vaisseaux (Figure 8). L'exon IV a été le plus caractérisé et a été reconnu comme source de promoteurs qui régulent l'expression du BDNF. De plus, les exons I, II, IV et VI du BDNF sont hautement conservés entre les humains et les rongeurs et la structure spatiale protéique de la NT s'organise en cinq boucles assemblées avec plusieurs ponts disulfures²³³⁻²³⁷. Le BDNF mature est hautement conservé et cette caractéristique a été rapportée chez plusieurs espèces notamment l'homme²³⁷, la souris^{238 239}, le rat^{240 239} et le poisson zèbre²⁴¹. Ce degré de conservation concerne aussi le prodomaine de la protéine qui serait très important non seulement pour le repliement de la protéine, mais aussi il pourrait avoir des rôles biologiques intéressants au niveau de l'organisme^{242, 243, 244}. Il est à noter que le BDNF se retrouve sous forme de monomère, dimère ou hétérodimère. Il peut former un complexe hétéromérique avec d'autres NTs telle

que le NT3 et le NGF avec des niveaux de stabilités différentes^{245, 246}. L'activité du BDNF sous forme de monomère semble être plus faible que la forme dimérique qui possède une conformation beaucoup plus stable²⁴³.

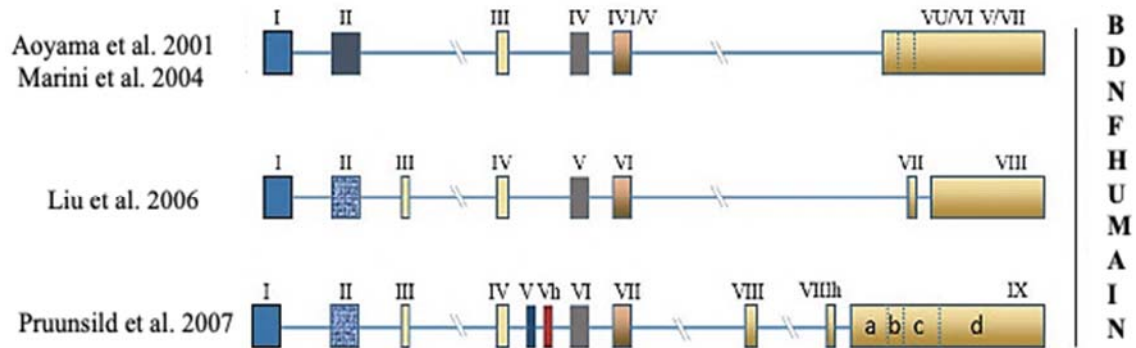


Figure 8: Structure génomique de BDNF humain.

Les exons sont colorés selon l'étude présentée. Les exons sont représentés par des cases tandis que les introns sont représentés par des lignes. Figure adaptée de Notaras et *al.* (2018). © 2018, *Neuroscientist*.

Au niveau du gène humain, un siège de polymorphisme qui se localise au niveau du codant 66 a été rapporté; celui-ci se traduit par une méthionine (Met) au lieu d'une valine (Val). Ce remplacement altère la sécrétion de BDNF dépendante de l'activité neuronale²⁴⁷. La mutation Met-BDNF est exprimée chez 40% des humains qui sont homozygotes (5%) ou hétérozygotes pour cette mutation^{247, 248}. Il a été démontré précédemment que les transcrits portant le polymorphisme Met66 du BDNF montrent une diminution du trafic dendritique de la protéine, ce qui induit à des troubles comprenant la performance de la mémoire²⁴⁹.

2.4 Expression du BDNF dans le SNC

Les premières études ont permis de localiser le BDNF au niveau du cortex par l'identification d'une grande quantité de son ARNm²⁵⁰⁻²⁵². L'analyse immunohistochimique a révélé une localisation neuronale étendue du BDNF dans de nombreuses zones du SNC, mais de manière importante au niveau de l'hippocampe²⁵³. Les cellules qui présentent une quantité importante du BDNF sont les cellules pyramidales hippocampiques de la région CA3^{254, 255}. De même, sa localisation a été identifiée au niveau

du néocortex, l'amygdale et le cervelet, et il est considéré comme un modulateur biologique; étant donné qu'il est libéré par les vésicules sécrétoires pré et post synaptiques²⁵⁶. Plusieurs études ont eu recours à des cultures neuronales préparées à partir de l'hippocampe de rongeur au stade embryonnaire pour démontrer que le BDNF est localisé au niveau des axones et des dendrites²⁵⁷⁻²⁵⁹.

2.5 Maturation et sécrétion du BDNF

Au niveau du SNC, le pré-pro-BDNF (la forme précurseur du pro-BDNF) est clivé par les protéases extracellulaires. Une première séquence mature comportant 118 acides aminés sera libérée, possédant un poids moléculaire de 14 kDa²⁴⁸ soit le BDNF mature ainsi qu'une deuxième séquence de 17 kDa soit le pro-domaine^{260, 261} ou encore une forme tronquée du BDNF de 28 kDa, avec une activité biologique encore inconnue²⁶⁰.

Ces actions seront exécutées par les furines, les convertases PC 1/7 ou sous l'action des métalloprotéinases matricielles (MMP), MMP3 et MMP7, les plasmines, et/ou l'activateur tissulaire du plasminogène²⁶². Les NTs peuvent exercer leurs actions cellulaires selon deux voies de sécrétion, la première est la voie constitutive et la seconde est la voie régulée^{248, 257, 263}. D'une manière plus précise, l'ARNm du BDNF est traduit au niveau du ribosome. Le pré-pro-BDNF est séquestré au niveau du réticulum endoplasmique et une fois au niveau des vésicules du réseau transgolgien, les protéases peuvent le cliver et le BDNF mature sera libéré de manière constitutive. En revanche, si le pro-BDNF s'accumule dans les vésicules sécrétoires immatures contenant les enzymes de clivage, le BDNF mature sera délivré vers la membrane plasmique dans des vésicules de sécrétion matures. Sa libération se fait que lors d'un signal qui va lui permettre d'être relâché sous sa voie de sécrétion régulée (Figure 9)²⁶⁴. La sécrétion ainsi que la synthèse du BDNF augmentent sous l'action de différents stimuli tels que le Ca^{2+} , une voie prédominante de signalisation au niveau post-synaptique. L'élévation des concentrations calciques régule l'ARNm de la NT et sa sécrétion. Il s'agit d'un mécanisme courant afin d'induire la transcription du gène du BDNF au niveau du SNC. Après la sécrétion, les effets du BDNF peuvent être autocrine ou paracrine, ceci dépendra du site d'expression de son récepteur TrKB^{221 222 223}.

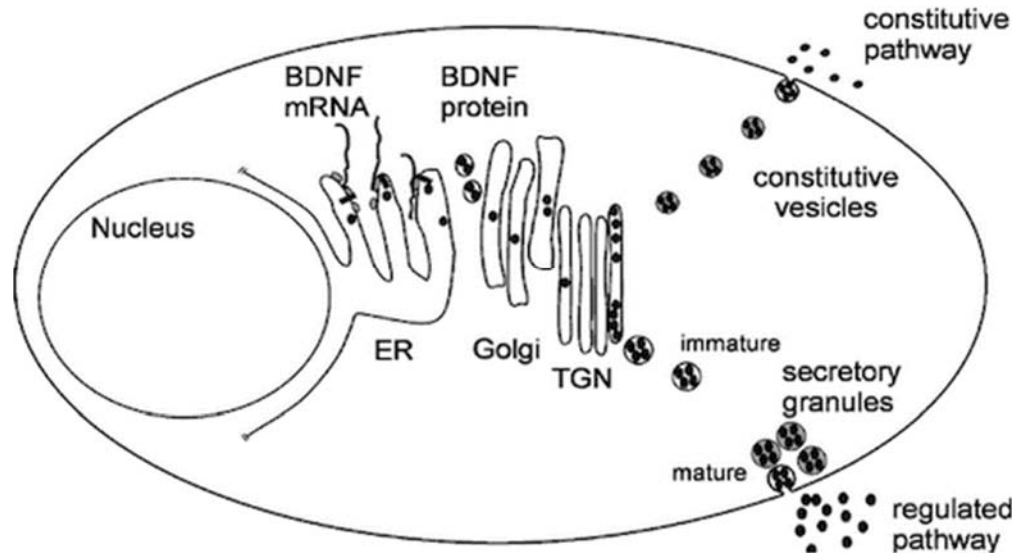


Figure 9: La voie du BDNF de la synthèse à la sécrétion au niveau des neurones.
 D'après Lessmann V, et al. (*Progress in neurobiology*. 2003;69:341-74)²⁶⁴. © 2003, Elsevier Ltd.

Certains auteurs rapportent que les neurotransmetteurs peuvent affecter la sécrétion du BDNF. Le glutamate,²⁶⁵ l'acétylcholine,^{266, 267} la dopamine²⁶⁸ et la sérotonine²⁶⁹ ont un effet inducteur sur la sécrétion de BDNF. Or, l'équipe de *Zafra et al.*²⁷⁰ rapporte que l'acide gamma-aminobutyrique inhibe la sécrétion de la NT, car la stimulation de ce système réduit l'ARNm du BDNF dans l'hippocampe et dans les noyaux septaux.

Les avis scientifiques quant aux quantités du BDNF synthétisé sont en dépit des controverses théoriques concernant la synthèse du pro-BDNF. D'après l'équipe de *Matsumoto et al.*²⁷¹ en 2008, les neurones ont une capacité très limitée à sécréter le pro-BDNF : il s'agirait en fait d'une biosynthèse transitoire intermédiaire. Par contre, l'équipe de *Yang et al.*²⁷² en 2009 a rapporté que les neurones peuvent le produire et que les niveaux du pro-BDNF sont élevés au niveau du SNC postnatal chez la souris.

2.6 Transport du BDNF

D'un point de vue classique, le BDNF est libéré selon la voie régulée ou constitutive et il sera par la suite exprimé au niveau des terminaisons axonales suivant un mode de transport rétrograde (des terminaisons axonales jusqu'au soma). Les vésicules peuvent être transportées du soma jusqu'aux terminaisons axonales selon la voie antérograde. La

concentration du BDNF va dépendre de son mode de transport. Quand les expressions sont élevées, c'est le mode antérograde qui sera suivi²⁶⁴. En 1974, les premières études *in vivo* ont montré que l'injection intraoculaire de NT radioactifs (¹²⁵I-NGF), se traduit par une accumulation préférentielle de radioactivité dans les ganglions cervicaux supérieurs du côté de l'injection, ce qui promouvait un transport axonal rétrograde²⁷³. Dans le même contexte, au niveau des projections dans la rétine, il a été démontré que cinq différents NT (incluant le BDNF) avaient un transport de direction antérograde commençant des corps cellulaires jusqu'aux terminaisons axonales afin d'être libérées²⁷⁴. Des données montrent que le BDNF emprunte le transport antérograde axonal et laisse penser que la signalisation du BDNF ne repose pas sur le mode connu de la délivrance d'un facteur d'une cellule cible postsynaptique à une autre présynaptique. Le transport antérograde semble être le plus utilisé par le BDNF et a été observé dans différentes régions du cerveau^{275, 276}.

Parmi les protéines impliquées dans le transport du BDNF, on trouve la sortiline, aussi connue sous le nom de *neurotensin receptor 3*, qui est exprimée au niveau du SNC et périphérique et qui interagit avec le BDNF pour réguler son trafic intracellulaire. La sortiline appartient à la famille des récepteurs *vascular protein sorting 10*²⁷⁷ et agit comme corécepteur pour les pro-NTs au niveau de la membrane et comme protéine de transport au niveau intracellulaire. Elle est abondante au niveau de l'appareil de Golgi, l'endosome, les axones, les vésicules synaptiques et les granules. Elle a été colocalisée avec le BDNF au niveau des granules sécrétoires. Or, la présence de la forme tronquée de la sortiline perturbe le trafic du BDNF, ce qui suggère son rôle dans la sécrétion du BDNF, et son effet sur la biodisponibilité du BDNF^{278, 279}.

2.7 Le récepteur TrKB

Le gène humain de TrKB a été identifié au cours des années 80 lors d'une biopsie du carcinome du côlon, ce qui a permis de découvrir un nouveau membre de la famille des tyrosines kinases composées de 790 acides aminés²⁸⁰. Il contient au moins 24 exons et peut créer jusqu'à 100 isoformes pouvant coder 10 protéines différentes²⁸¹. Peu de temps après, deux formes de récepteurs ont été suggérées par les auteurs chez la souris soient le gp145trKB et le gp95trKB, actuellement définies comme la forme complète et la forme tronquée, respectivement. Ces deux structures du récepteur possèdent une différence au

niveau de la structure chimique. Seule la forme complète contient une longue région cytoplasmique, qui comprend un domaine catalytique tyrosine kinase^{282 281}. La forme complète du récepteur est d'un poids moléculaire autour de 145 kDa et la forme tronquée est autour de 95 kDa^{281, 283, 284 282, 285, 286}. Le rôle de la forme tronquée reste mal connu, mais des études suggèrent que ce récepteur possède la particularité de pouvoir inhiber la signalisation de la forme complète par le BDNF, bien que sa fonction exacte reste controversée^{287, 288}. La forme tronquée du TrKB peut lier à son tour le BDNF et agit en tant que récepteur négatif dominant, inhibant le signal du BDNF en formant des hétérodimères non fonctionnels avec la forme complète du récepteur^{288 289}. Les formes tronquées pourraient se comporter comme une barrière efficace et sélective empêchant la signalisation du BDNF en l'éliminant par internalisation²⁹⁰. Par conséquent, le BDNF agit comme modulateur en régulant la signalisation de son propre récepteur.

Le BDNF se lie sélectivement à son récepteur de haute affinité TrKB à des concentrations de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-10} M²⁹¹. La signalisation du BDNF *via* la forme complète du récepteur module la différenciation et l'activité des neurones. Le BDNF active en aval le TrKB, ce qui provoque sa dimérisation et son activation et conduit à l'initiation de cascades de signalisation intracellulaire et de différentes réponses biologiques^{225, 286}. Trois voies de signalisation intracellulaires principales seront activées lors de cette interaction : 1) la phosphorylation au niveau de la tyrosine Y515 et le recrutement des molécules adaptatrices entraînent la signalisation *via* les protéines *Ras-mitogen-activated protein kinase* (MAPK), ce qui favorise la différenciation et la croissance neuronale; 2) l'induction de la cascade de PI3K qui permet la survie des neurones et d'autres types cellulaires par le biais de la molécule *GRB-associated binder 1*; 3) le recrutement de la PLC γ 1 qui va induire la production de l'IP3 et le DAG, ce qui va activer les PKC et favoriser donc la libération du Ca²⁺ (Figure 10)^{225, 292 293}. D'autres adaptateurs supplémentaires, contenant le domaine *Src Homology 2*, ont été identifiés et interagissent avec TrKB²⁹⁴. Chacune de ces voies de signalisation régule également la transcription des gènes et certaines peuvent être impliquées dans la potentialisation à long terme^{293, 295}.

Concernant les principales voies activées par le récepteur p75^{NTR} *via* les pro-NT, il est connu que ce dernier agit comme inducteur de l'apoptose *via* un mécanisme majeur

mettant en jeu la c-Jun N-terminal kinase (JNK). Plus précisément, l'isoforme 3 de cette kinase, exprimé exclusivement dans le système nerveux, serait requis pour induire cet effet^{296 297}. Or, *via* la fixation des NT, il a été rapporté que le même récepteur régule des voies de signalisation dont plusieurs favorisent la survie neuronale, telle la voie de NF- κ B (Figure 10). De plus, en présence des récepteurs TrK, le récepteur p75^{NTR} peut promouvoir les signalisations de ces derniers à la surface des cellules, en régulant négativement leurs ubiquitinations, où ceci est le cas des récepteurs TrKA et TrKB²⁹⁸. Dans le même contexte, ce récepteur régule l'activité des récepteurs TrK, en collaborant avec ceux-ci, afin d'augmenter leurs affinités pour leurs ligands et de promouvoir une liaison efficace et plus prolongée²⁹⁹.

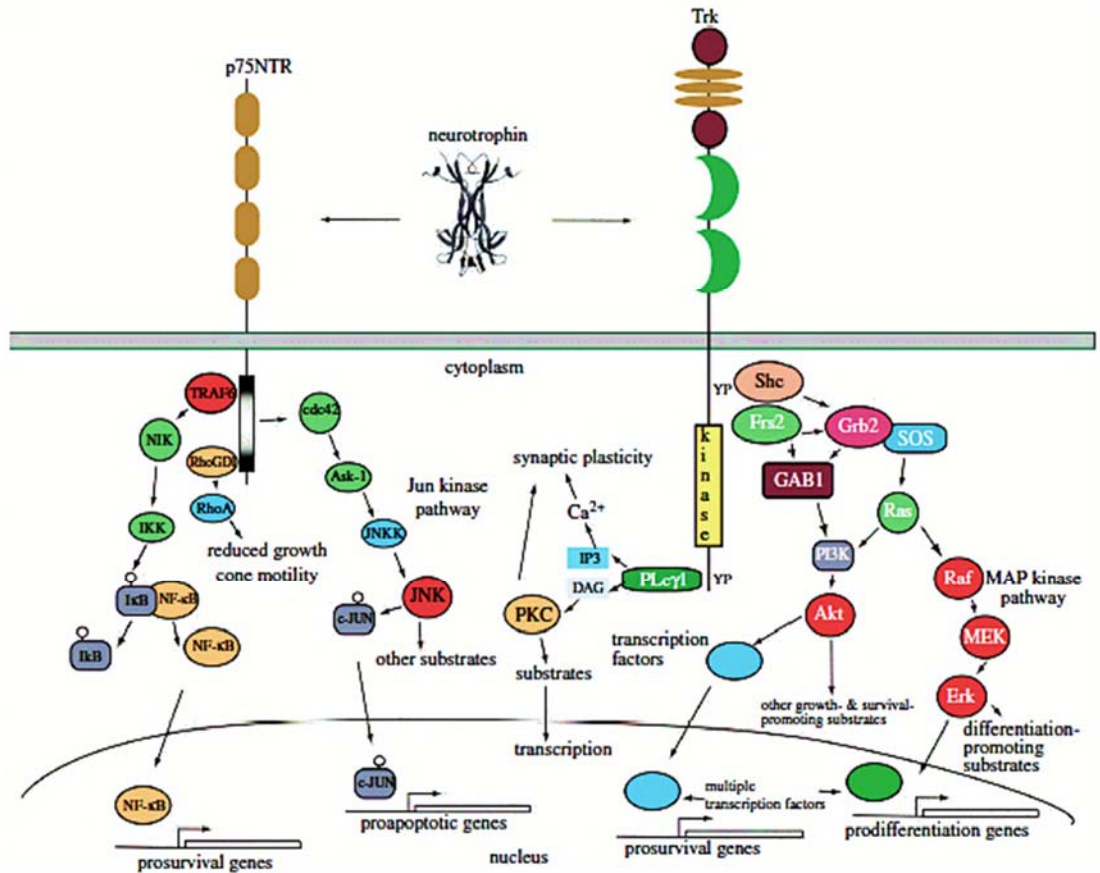


Figure 10: La signalisation des NTs.

Cette figure décrit les interactions de chaque NTs avec les récepteurs TrK et p75^{NTR} et les principales voies de signalisation intracellulaire activées à travers chaque récepteur. Le récepteur p75^{NTR} régule trois voies de signalisation principales. Chaque récepteur TrK contrôle également trois principales voies de signalisation. Chacune de ces voies de signalisation régule également les gènes de transcription. D'après Reichardt LF. (*Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2006;361:1545-64).²⁹³ © 2006, the Royal Society.

Chapitre 3 : **Le BDNF et les maladies cardiovasculaires**

3.1 Expression au niveau périphérique du BDNF

Le BDNF était considéré comme une NT principalement exprimée par les neurones. Actuellement, il est bien démontré que d'autres sources cellulaires expriment le BDNF³⁰⁰. En dépit du manque des recherches sur la présence du BDNF au niveau périphérique, il a été prouvé que différents types cellulaires contiennent de BDNF, tels que la moelle épinière,^{301, 302} la microglie³⁰³⁻³⁰⁵, les astrocytes^{306, 307}, les cellules mésenchymateuses^{308, 309}, les cellules épithéliales³¹⁰, les lymphocytes B et T, les monocytes, les cellules endothéliales, les macrophages³¹¹⁻³¹⁴, les MKs¹⁴, les plaquettes^{9, 11}, les cellules musculaires lisses³¹⁵ et les éosinophiles³¹⁶.

À l'échelle cellulaire, il a été rapporté que les cellules endothéliales³¹⁴ et les cellules immunes (telles que les monocytes et les lymphocytes humains) expriment faiblement le gène du BDNF³¹². Dans le même contexte, des taux significatifs d'ARNm de ce dernier ont été détectés dans les MK à la fois chez le rat et chez l'homme. Les niveaux d'ARNm sont environ 200 fois plus élevés chez le rat et l'homme, par rapport à ceux que l'on observe chez la souris¹².

Au niveau tissulaire, le BDNF a été identifié au niveau des organes périphériques, dans les artères pulmonaires, les poumons, le cœur, le thymus, le foie, la rate, la rétine et les muscles^{33, 317-322}.

La source de BDNF périphérique étant encore mal identifiée, il a été noté que de faibles taux (non significatifs) de BDNF traversent la barrière hématoencéphalique^{323 324}. Cependant, une neuroprotection avec ce facteur reste possible après une administration par voie intraveineuse soit dans le cerveau antérieur transitoire³²⁵, soit lors d'une ischémie cérébrale focale permanente³²⁶ si le BDNF est conjugué avec un système médicamenteux qui cible la barrière hématoencéphalique. Selon un rapport récent³²⁷, une hypothèse concernant l'action du BDNF *via* l'organe subfornical a été proposée. Il s'agit d'une zone située au niveau du SNC, ne possédant pas de barrière hématoencéphalique contrairement à la grande majorité des régions du cerveau, et fortement vascularisée connue pour ses rôles dans la régulation cardiovasculaire et neuroendocrinienne³²⁸. De plus, l'ARNm du BDNF et de son récepteur sont exprimés au niveau de cette zone³²⁹. Il a été rapporté que les micro-

injections de BDNF chez les rats étaient spécifiques au site d'injection et avaient un effet sur la pression artérielle, car la micro-injection de BDNF dans des zones situées en dehors des limites anatomiques de cet organe était sans effet³²⁷. Ainsi, les organes ne contenant pas de barrière au niveau du SNC pourraient être un élément important de centre de contrôle autonome, où le BDNF exerce ses effets sur la régulation cardiovasculaire.

Ces données suggèrent que le SNC pourrait être un contributeur du BDNF en circulation, mais il n'est pas la seule source; il est donc important que les études futures identifient la source primaire de BDNF périphérique; s'il s'agit du SNC, il serait important de démontrer son passage exclusif par la barrière hématoencéphalique.

3.2 Effet de l'exercice sur les taux du BDNF

Il existe des preuves que les taux de BDNF peuvent varier selon des facteurs comme l'exercice physique. Ce dernier augmente les taux du BDNF sérique chez les personnes actives³³⁰⁻³³². De plus, il a été démontré que l'exercice augmente les niveaux de BDNF non seulement dans le cerveau et le sérum, mais aussi dans le muscle squelettique³³³. Il a été rapporté que l'expression du BDNF induite par l'exercice physique est associée à une expression accrue de plusieurs kinases de la voie PI3k / Akt³³⁴. De même, il a été démontré que les taux circulants de BDNF augmentent progressivement en fonction du temps lors de l'exercice³³⁵ et que cette augmentation semble être reliée à la consommation d'oxygène³³⁶. L'équipe de Matthews et al³³⁷ a rapporté que les taux du BDNF en circulation augmentaient immédiatement après l'exercice et que la surexpression *in vivo* de la forme mature du BDNF dans le muscle squelettique ne permet pas de promouvoir sa concentration systémique, car celle-ci reste inchangée. De plus, le BDNF peut agir comme une NT régulatrice pour atténuer l'augmentation de la pression artérielle pendant les périodes d'activité physique soutenues³²⁷. Des études sur les volontaires sains confirment une augmentation « essentiellement transitoire » des concentrations du BDNF après un exercice aigu^{338, 339}. Finalement, une méta-analyse regroupant 29 études a rapporté que le sexe a considérablement modéré l'effet de l'exercice des niveaux du BDNF, de sorte que le BDNF n'augmente pas autant chez les femmes après l'exercice que chez les hommes. Aucune différence significative n'a été rapportée entre les personnes en bonne santé et celles avec comorbidités (par exemple : le diabète)³⁴⁰.

Il est donc difficile de conclure si les changements des niveaux sériques du BDNF causés par l'exercice résultent d'un changement au niveau central ou périphérique.

3.3 Rôle du BDNF circulant au niveau cardiovasculaire

La biologie moléculaire des maladies cardiovasculaires reste très complexe et liée à différents processus comme l'inflammation, la réparation vasculaire et l'angiogenèse³⁴. Si le BDNF est une protéine importante dans le SNC par son effet protecteur, en est-il de même au niveau périphérique et plus précisément au niveau cardiovasculaire ? Au cours du développement précoce du muscle cardiaque, les NTs ainsi que leurs récepteurs assurent le bon développement et la croissance cardiovasculaire. Ils contribuent à la croissance des cellules endothéliales, des cellules vasculaires et du cardiomyocyte. Ils agissent aussi au cours du développement postnatal.³⁴

Le BDNF peut activer le facteur de la survie cellulaire NF- κ B dans différentes cellules par la voie TrKB-PI3-k. Il a été constaté qu'une fois la voie de NF- κ B inhibée, les effets du BDNF contre différents dommages comme la dépolarisation mitochondriale et la nécrose ont été diminués. Ainsi, le BDNF peut inhiber la nécrose par le renforcement du potentiel de la membrane mitochondriale³⁴¹. Il a été aussi rapporté que le BDNF réduit l'expression des cytokines pro-inflammatoires et augmente celle des cytokines anti-inflammatoires^{342, 343}. Lors de l'inflammation, les cytokines pro-inflammatoires vont promouvoir la sécrétion du BDNF par les monocytes³¹¹. L'effet cardioprotecteur du BDNF sur la viabilité des cardiomyocytes a également été remarqué après l'exposition de cardiomyocytes à l'hypoxie. Une augmentation du BDNF circulant favorise la survie des cardiomyocytes et est associée à une expression accrue de facteurs proangiogéniques grâce à une signalisation intracellulaire impliquant le récepteur TrKB²⁸⁴. Une faible concentration de BDNF a été aussi associée à des facteurs de risque connus de fibrillation auriculaire^{344, 345}. Par conséquent, le BDNF possède des propriétés multifonctionnelles et des effets potentiels dans des conditions de survie / défaillance cardiaques. Outre son rôle en neurobiologie, il est de plus en plus évident que le BDNF est également impliqué dans le développement cardiovasculaire et la physiopathologie.

Les rapports initiaux selon lesquels la concentration de BDNF est considérablement plus élevée dans le sérum que dans le plasma ont conduit à l'hypothèse que l'activation

plaquettaire stimule la libération de BDNF en circulation^{346 347}. Cette information a été confirmée par la libération de BDNF par les plaquettes à l'aide d'agonistes plaquettaires puissants⁹. Chez les volontaires sains, il a été rapporté que les taux moyens de BDNF sont étroitement corrélés à sa concentration plaquettaire³⁴⁸. La relation entre l'activité des plaquettes, la libération de BDNF et les maladies cardiovasculaires mérite d'être plus explorée lors des études futures.

Au niveau plasmatique, des résultats divergents ont été obtenus. Chez les patients avec un SCA, les taux plasmatiques de BDNF sont plus faibles^{349, 350} et une corrélation positive a été observée entre les taux plasmatiques de BDNF et de multiples facteurs de risque métaboliques^{234, 351} à savoir que plus le taux de BDNF est faible et plus la personne est à risque. La diminution des taux de BDNF plasmatique pourrait être associée à de futurs événements coronaires^{352, 353}. Notons que le BDNF plasmatique a été détecté en tant que facteur prédictif indépendant d'un événement coronarien majeur sur 4 ans chez les patients souffrant d'angine de poitrine^{354 355}. De plus, de rares données épidémiologiques suggèrent que des taux de BDNF élevés pourraient être associés à une diminution de risque cardiovasculaire et à une mortalité plus faible³⁵⁶.

Une autre étude³⁵⁷ a montré que les taux plasmatiques de BDNF augmentaient significativement quelques heures après une reperfusion myocardique et revenaient aux niveaux initiaux après 24 heures³⁵⁷.

Une étude récente³⁵⁸ a mis en évidence l'effet antithrombotique du BDNF plasmatique. Cet effet a été validé par une réduction de la densité du réseau de fibrine du thrombus. Le BDNF a affecté le réseau de fibrine de manière dépendante de la concentration en particulier, aux doses les plus élevées utilisées du BDNF, ce qui a permis une diminution d'environ 15% à 30% de la densité des fibres de fibrine³⁵⁸. Avec le peu d'études soulevant des contradictions quant au rôle du BDNF dans l'hémostase cardiaque, il est difficile de tirer une conclusion claire concernant les variations des niveaux de BDNF dans la pathologie cardiovasculaire, spécifiquement lors d'un SCA.

Par conséquent, bien que les données probantes suggèrent un rôle protecteur et bénéfique du BDNF, il pourrait toujours avoir des effets opposés qui nécessitent d'être identifiés dans les futures études.

Au niveau sérique, un taux élevé de BDNF pourrait diminuer le risque des maladies cardiovasculaires et avoir un rôle protecteur^{359, 360 361}. Les auteurs ont également observé que les taux sériques de BDNF étaient nettement plus élevés chez les patients présentant un IM que chez ceux souffrant d'angine de poitrine avec un décompte plaquettaire similaire³⁵⁰. En outre, un décompte plaquettaire et une réactivité plus élevée ont été associés à des taux sériques de BDNF plus importants chez les patients atteints de diabète de type 2³⁶². Cela semble indiquer que les plaquettes des patients avec un IM ont un taux de BDNF plaquettaire élevé et que l'augmentation de nombre des plaquettes ne conduit pas automatiquement à une augmentation des taux de BDNF plaquettaires dans certaines maladies.

Une seule étude³⁵⁰ a montré que les taux sériques de BDNF étaient plus élevés chez le groupe de patients avec IM que celui avec une angine de poitrine stable. Chez les patients avec IM, il a été constaté qu'il y avait une corrélation significative entre les taux de BDNF circulant et la P-sélectine soluble. En revanche, aucune corrélation n'a été observée chez les patients atteints d'angine stable. L'étude a suggéré que les taux sériques de BDNF chez les patients avec un IM pourraient être liés à l'activation des plaquettes et à la réponse inflammatoire. De plus, l'équipe de Tamura et *al.*⁸ a confirmé la présence de BDNF dans les granules- α avec une distribution cytoplasmique. Une fois les plaquettes stimulées, seul le BDNF granulaire était sécrété⁸. Cependant, il n'existe pas de données disponibles pour tirer une conclusion définitive sur les isoformes de BDNF situées au niveau de deux compartiments plaquettaires. Comme le BDNF a été détecté au niveau des granules dans les mêmes fractions que la P-sélectine⁸, et que leurs concentrations étaient positivement corrélées³⁵⁰, il est possible que le BDNF et la P-sélectine soient relâchés par les mêmes mécanismes marquant ainsi l'activation plaquettaire. Il est donc probable que la P-sélectine soit directement associée aux taux circulants de BDNF, car ce dernier est relâché par dégranulation du contenu plaquettaire.

Les données suggèrent que le rôle du BDNF balance entre le maintien de la viabilité cardiovasculaire (Figure 11) et la pathologie. En effet, l'administration de BDNF a entraîné une augmentation des dommages au niveau du myocarde après une occlusion artificielle du cœur³⁶³, ce qui laisse penser qu'il est possible que l'implication de BDNF soit une réponse locale et/ou systémique à un dommage et qu'elle serait contrôlée par d'autres

mécanismes de signalisation encore méconnus. Les tentatives des recherches visant à augmenter la production locale ou systémique de BDNF dans les maladies cardiaques serviraient à mieux définir le rôle spécifique de ce peptide dans la pathologie cardiovasculaire³⁶⁴.

Il devient évident que le BDNF joue un rôle important au sein de ce système complexe et dynamique. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si le BDNF serait cardioprotecteur et/ou nuisible pour la santé cardiovasculaire et pour identifier les mécanismes conduisant à des gains ou de pertes de fonctions au niveau périphérique.

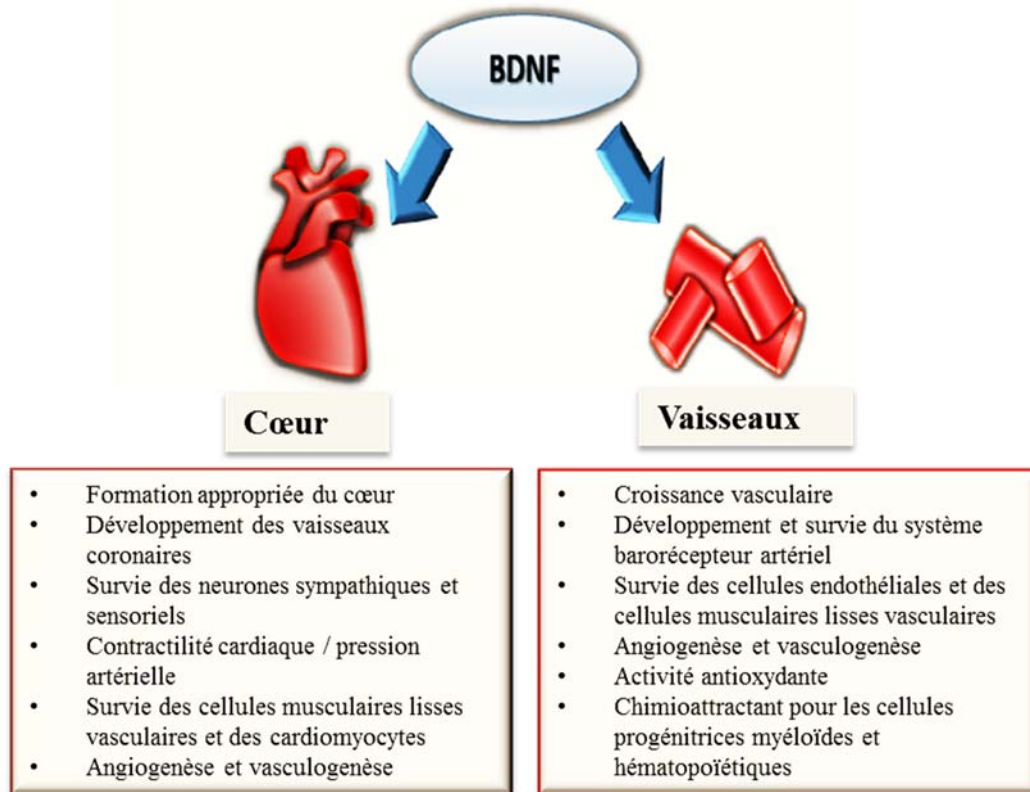


Figure 11: Rôles du BDNF au niveau du système cardiovasculaire.

Figure modifiée d'après Pius-Sadowska E et al. (*Journal of molecular and cellular cardiology*. 2017;110:54-60).³⁴⁵ © 2017, Elsevier.

3.4 Rôle du BDNF dans l'angiogenèse

Il a été noté que le BDNF promouvait la stabilisation des artères et des capillaires intramyocardiques chez la souris pendant l'embryogenèse, et ce, par son effet sur la survie des cellules endothéliales^{13, 365}. Le rôle du BDNF a été rapporté comme stimulateur de la libération du facteur de croissance vasculaire endothélial^{13, 365}. De plus, il a été proposé que le BDNF induit la mobilisation des cellules progénitrices, ce qui induit la formation des vaisseaux sanguins et met en évidence le rôle du BDNF sur la vasculogenèse³⁴.

Afin de promouvoir la stabilisation du système vasculaire nouvellement formée, le recrutement des péricytes est considéré comme une étape importante pour la maturation de ce dernier. Or, les auteurs ont signalé que le BDNF n'induit pas le recrutement de péricytes dans les vaisseaux sanguins, mais qu'il favorise plutôt le recrutement des cellules progénitrices *via* un mécanisme inconnu. Ce phénomène mérite de plus amples informations afin de démontrer le potentiel du BDNF dans le traitement de maladies telles que l'ischémie cardiaque^{366 367}. De plus, la synthèse de l'angiogénine par les cellules *Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC)* après leur incubation en présence du BDNF pendant 24h a été quantifiée. La concentration de l'angiogénine était significativement plus élevée dans les cellules en présence du BDNF par rapport à celles non stimulées³⁶⁸. Il a aussi été démontré que dans des cellules endothéliales cardiaques isolées des souris au troisième jour postnatal, le BDNF a été impliqué dans l'angiogenèse et le maintien de l'intégrité vasculaire¹³.

Des études utilisant des modèles de souris *knockout* ont soulevé les rôles spécifiques du BDNF et des récepteurs TrK dans la formation du cœur et du système vasculaire myocardique^{13 369 320 355}, comme le fait que son absence entraînait une hémorragie intraventriculaire et une réduction de la contractilité cardiaque¹³. Les souris déficientes en BDNF présentent des dommages myocardiques importants après un infarctus expérimental, et l'administration périphérique de BDNF a restauré de manière significative leur phénotype cardiaque²⁸⁴. La perturbation de l'expression de BDNF et de son récepteur pourrait provoquer des troubles cardiaques³⁷⁰. Aussi, l'expression de BDNF était régulée positivement après une ischémie-reperfusion dans le ventricule gauche³⁷¹, d'autant plus qu'un réseau décrivant les voies de signalisation activées lors de la stimulation des cellules par le BDNF montre 56 associations moléculaires, 93 réactions de

type enzyme-substrat, 15 événements de translocation, 23 événements d'activation/inhibition et 261 gènes régulés de manière différentielle qui se produisent lors de la stimulation de TrKB et de p75^{NTR} ³⁷². Finalement, il a été rapporté que le BDNF augmente les facteurs qui favorisent la survie des cardiomyocytes et stimule l'angiogenèse pour réduire les troubles cardiaques après 14 jours dans les cœurs post-IM^{373 345}.

Ainsi, il est clair que le BDNF peut soutenir l'activité angiogénique afin de promouvoir l'assemblage local de nouveaux vaisseaux.

3.5 Effets pathologiques de l'axe BDNF-TrKB

Le TrKB est exprimé au niveau des cellules endothéliales tapissant les artères coronaires³⁶⁵ et contribue à la formation de l'endothélium cardiaque et de l'intégrité fonctionnelle pendant le développement³⁷⁴. Il a été décrit que la déficience en BDNF et en TrKB entraîne une apoptose, une hémorragie de la paroi intraventriculaire, une diminution de la contractilité cardiaque ainsi qu'un décès postnatal précoce chez la souris^{13, 375}. L'expression de BDNF et de TrKB augmente au niveau des musculaires lisses en culture chez le rat ³⁷⁶. Ces résultats suggèrent d'après l'étude que cette NT joue un rôle important dans la régulation de la réponse suite à une lésion vasculaire.

Les niveaux d'expression de BDNF et de TrKB sont considérablement augmentés après une lésion artérielle chez le rat, et des taux accrus persistent pendant la formation de néointima³⁷⁶. De plus, les artères athérosclérotiques présentent des taux de BDNF significativement plus élevés³⁵³ et son expression semble être élevée dans l'intima athéromateuse et l'adventice des artères athérosclérotiques ainsi que dans les macrophages proches de la lésion^{352, 353}. Notons que le BDNF pourrait promouvoir l'expression de la MMP-9 *via* une signalisation dépendante de la voie ERK et essentiellement *via* son récepteur TrKB. L'expression abondante de TrKB et du BDNF au niveau des lésions athérosclérotiques nous laisse penser que le BDNF pourrait induire l'expression des MMPs au niveau des lésions *via* son récepteur^{376 377}. L'activation locale des MMP, que ce soit par l'activation de signaux inflammatoires ou de radicaux libres, conduit à la dégradation du collagène et de l'élastine en fragments peptidiques et permet des perturbations telles que la rupture de la plaque. La présence de cellules inflammatoires, telles que les macrophages activés et les cellules T dans la zone de progression de la plaque athérosclérose contribue

à accélérer ce processus³⁷⁸. De plus, il a été démontré que le BDNF augmentait l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase) ainsi que la génération des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules musculaires lisses, ce qui active les MMP et conduit à l'instabilité des plaques athéroscléroses^{350 379 380} (Figure 12).

Quant au mécanisme athérogène du BDNF au site de la lésion, deux mécanismes ont été suggérés. Le premier est que l'activation par le BDNF du récepteur TrkB améliore la transcription de la MMP-9^{381 382}. L'activation de la MMP-9 par le BDNF a été démontrée dans les neurones. On ignore si le BDNF est capable d'activer la MMP-9 dans et autour des lésions, bien que la forte concentration de BDNF associée à la matrice extracellulaire des lésions athéroscléroses confirme cette hypothèse³⁸³. L'activation de la NADPH oxydase par le BDNF a également été suggérée comme déclencheur possible de la régulation positive de la MMP-9, car les espèces réactives de l'oxygène produites par l'activité de la NADPH oxydase peuvent activer la MMP-9³⁸⁴.

L'expression abondante de TrkB dans les cellules musculaires lisses des artères¹³ suggère que celles-ci pourraient être parmi les cellules activées par le BDNF au niveau des lésions et que le BDNF stimule leur recrutement suite à une activité chimiotactique au niveau de la plaque de manière autocrine ou paracrine *via* le récepteur TrkB³⁸⁵. Malgré l'intérêt récent porté au rôle de BDNF dans la maladie cardiovasculaire, la relation entre le BDNF et l'athérombose reste limitée.

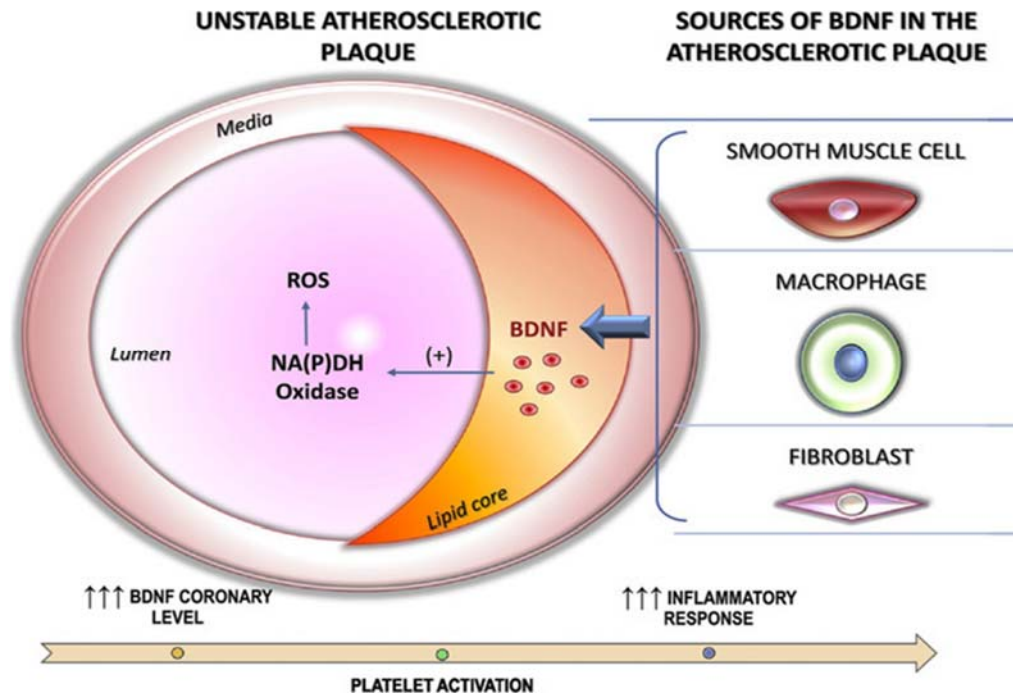


Figure 12: L'intervention du BDNF au niveau de l'athérosclérose.
 D'après Pius-Sadowska E et al. (*Journal of molecular and cellular cardiology*. 2017;110:54-60)³⁴⁵. © 2017, Elsevier.

Chapitre 4 : **Le BDNF dans les plaquettes**

4.1 Le BDNF circulant

En 2011, l'équipe de Klein et *al.*²³ a comparé les niveaux de BDNF plasmatique et sérique chez trois espèces. Elle a rapporté qu'il y avait une corrélation positive entre les taux plasmatiques et/ou sériques du BDNF et les concentrations au niveau de l'hippocampe chez le rat et le porc à l'opposé de celles observées chez la souris. Bien que le BDNF ait aussi été détecté dans le sang humain, sa source en circulation n'est pas encore bien établie³¹⁴. Il a été suggéré que les plaquettes constituent la source potentielle de BDNF circulant, car, au cours de la coagulation, les plaquettes vont libérer le BDNF, ce qui explique la différence entre les niveaux plasmatiques et sériques de cette NT^{9 10}. Les études fonctionnelles suggèrent que la stimulation des plaquettes est nécessaire à la libération de BDNF, probablement par dégranulation plaquettaire^{8, 9, 386 12, 60}.

Il a été rapporté récemment que les proplaquettes dérivées des cellules souches humaines exprimaient le BDNF, ce qui suggère qu'il pourrait provenir des MKs matures¹². De plus, les taux périphériques du BDNF plaquettaire sont jusqu'à 1000 fois plus importants que les taux au niveau du SNC⁹. L'étude de *Framingham Heart Study* en 2014³⁸⁷ a suggéré un lien inverse entre les niveaux sériques du BDNF et la survenue des déficits cognitifs, en se basant sur les niveaux du BDNF et l'association statistique avec les diagnostics de déficits cognitifs.

L'équipe de Yamamoto et *al.*¹¹ était la première équipe au cours des années 90 à avoir identifié l'ARNm et la protéine de BDNF au niveau des plaquettes humaines, ce qui a conduit d'autres équipes à vouloir l'identifier. Jusqu'à présent, le mécanisme par lequel les plaquettes emmagasinent la NT reste inconnu, mais il semble que le BDNF soit stocké et libéré par les granules α ⁸. Ces derniers contiennent un nombre de protéines impliquées dans la guérison des plaies hormis les facteurs de croissance.

D'après les nouvelles théories traitant de l'origine neuronale et de l'implication du BDNF au niveau périphérique lors d'un dysfonctionnement cardiovasculaire, il a été suggéré que des signaux allant du cœur jusqu'au cerveau conduisent à l'induction du système cérébral rénine-angiotensine-aldostérone et à la libération du BDNF au niveau central. Ce mécanisme aboutit à une augmentation des taux circulants et peut atténuer les

effets cardiaques néfastes d'une activité sympathique élevée³⁸⁸. Ceci reste une hypothèse de recherche parmi d'autres à vérifier.

4.2 La Libération du BDNF par les plaquettes

Les plaquettes libèrent le BDNF non seulement suite à leur activation par des agonistes spécifiques, mais aussi lors d'un traitement pharmacologique³⁸⁶. La présence du BDNF dans les plaquettes humaines et sa libération lors de la stimulation par des agonistes étaient rapportées par l'équipe de Fujimura⁹ qui constitue une étude clé pour ce projet de recherche. La thrombine, le collagène, le Ca²⁺ inophore et la contrainte de cisaillement induisent une libération rapide de BDNF et dépendante de la nature de l'agoniste^{389 386}. Les plaquettes semblent lier, stocker et libérer le BDNF lors de leurs activations³⁹⁰. Le BDNF a été identifié dans les granules α et dans le cytoplasme de plaquettes humaines, et seul le BDNF au niveau des granules α est libéré lors de l'activation plaquettaire^{8,9}. Les plaquettes pourraient avoir un rôle à jouer *via* la libération du BDNF par l'intermédiaire d'un récepteur qui reste méconnu. Les récepteurs canoniques du BDNF, à savoir le TrKB et le p75^{NTR}, n'ont pas été détectés à ce jour au niveau des plaquettes, ce qui suggère que d'autres récepteurs pourraient jouer le rôle de transmetteur du signal *via* la liaison du BDNF^{14, 15}.

Concernant l'internalisation du BDNF au niveau des plaquettes, elle pourrait se faire *via* un récepteur ou un système de transport semblable à celui de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT)³⁹¹. Cependant, il a été suggéré que les plaquettes emmagasinent le BDNF en l'internalisant à travers des récepteurs plaquettaires possédant deux densités et affinités différentes (80 et 3450 sites/plaquettes)⁹.

4.3 Effet des médicaments antiplaquettaires sur la libération du BDNF par les plaquettes

Le BDNF sérique s'accumule à des concentrations beaucoup plus élevées que celles plasmatiques^{10, 11}, comme décrit plus haut. Une seule étude a été publiée et investiguait l'impact des médicaments antiplaquettaires sur la libération du BDNF³⁹². Elle a été portée sur 24 volontaires sains qui ont été exposés à une dose de charge unique d'aspirine (500 mg) ou de Clopidogrel (600 mg). Le test utilisé est le PFA-100[®], un test qui est aujourd'hui

reconnu comme étant insensible aux effets de l'Aspirine et du clopidogrel^{393, 394}. Les liens entre les niveaux d'activité plaquettaire sous ces médicaments et le BDNF ne peuvent donc pas être établis de manière précise à partir de cette étude. Néanmoins, les chercheurs ont rapporté qu'une seule dose de charge de Clopidogrel réduit de façon significative la libération du BDNF par les plaquettes chez les volontaires sains, alors que l'aspirine ne semble pas avoir d'effet³⁹². Un décompte plaquettaire et une réactivité plus élevée ont été associés à des taux sériques de BDNF plus élevés chez les patients atteints de diabète de type 2 sous monothérapie à l'aspirine qui prenaient une dose quotidienne de 75 mg pendant au moins 3 mois comme un moyen de prévention de l'IM³⁶². Une autre corrélation positive a été rapportée par l'équipe de Lommatzsch M. et al.³⁴⁸, où des taux sériques du BDNF et du facteur *Transforming growth factor beta 1* (un marqueur de granule α) ont été augmentés chez les volontaires sains marquant ainsi l'activation plaquettaire. La relation entre l'activité des plaquettes, la libération du BDNF et les maladies cardiovasculaires reste un sujet de recherche qui intéresse de nombreux chercheurs actuellement et sur lequel plusieurs questions restent sans réponse.

Peu d'études ont également été menées sur l'impact du polymorphisme BDNF Val66Met sur le SCA. Bien qu'il ne soit pas en corrélation avec les niveaux de BDNF, la fréquence des homozygotes pour ce polymorphisme nucléotidique était significativement plus basse chez les patients présentant un angor instable plutôt que stable³⁹⁵ chez une cohorte chinoise. Dans une étude similaire, aucune association n'a pu être établie entre l'IM et ce polymorphisme³⁹⁶. Ces variations génétiques pourraient s'expliquer par différents facteurs y compris les fréquences d'allèles ainsi que les habitudes de vie de la population étudiée. Il reste à savoir s'il y a un lien direct ou pas entre le polymorphisme et la maladie et comment il serait possible de considérer les données d'une étude récente rapportant un phénotype prothrombotique auquel il a été associé dans l'athérombose³⁹⁷.

Chapitre 5 : **Hypothèse, objectifs et méthodes**

5.1 Problématique et hypothèse

Malgré le fait que les plaquettes constituent le réservoir le plus important de BDNF et qu'elles le relâchent en grande quantité dans la circulation, peu de choses sont connues sur les facteurs qui influencent sa libération dans le sang. Bien que les effets des antidépresseurs sur les niveaux circulants du BDNF soient de plus en plus étudiés, peu d'études existent sur les effets des médicaments antiplaquettaires sur sa sécrétion. Une seule étude publiée en 2011³⁹² a investigué l'impact de l'Aspirine et du Clopidogrel sur la libération du BDNF. Bien que l'étude montre qu'une seule dose orale de Clopidogrel, mais pas d'Aspirine, réduit significativement la libération de BDNF plaquettaire chez les volontaires sains, les liens entre les fonctions plaquettaires en présence de ces médicaments et le BDNF n'ont pas été démontrés. Bien qu'il fût anticipé que le BDNF ait un rôle dans le système cardiovasculaire (nonobstant une prescription étalée de l'Aspirine et du Clopidogrel en prévention secondaire chez les patients coronaires), l'influence de ces antiplaquettaires sur les niveaux circulatoires de BDNF et sur l'agrégation plaquettaire reste aussi à être clarifiée.

Les études établies pendant ces 10 dernières années ont rapporté qu'en plus de sa localisation au niveau central, le BDNF se retrouve aussi au niveau périphérique et cet aspect reste à ce jour mal étudié. En tenant compte du faible nombre de publications qui ont vérifié la libération du BDNF par les plaquettes stimulées ainsi que l'effet des antiplaquettaires sur cette relâche, nous avons voulu confirmer la relâche de BDNF plaquettaire dans un premier temps. Par la suite, vérifier l'effet des antiplaquettaires sur cette relâche. Les antiplaquettaire utilisés en clinique sont facilement accessibles pour reproduire un modèle d'inhibition plaquettaire *in vitro*. De plus, les techniques employées sont des méthodologies étalons qui ont été souvent utilisées avec les agonistes cités dans cette thèse ainsi qu'avec les antiplaquettaires. Les données préliminaires et les tests des doses-réponses ainsi que d'autres expériences ont été entamés chez le groupe de volontaire sain initialement, notre groupe contrôle. Cette étude reste une étude exploratrice, qui a été planifiée pour générer des données préliminaires requises pour entreprendre des études de plus grande envergure. Comme le lien entre l'activation plaquettaire et la relâche de BDNF, en présence ou non d'inhibiteur plaquettaire, n'est pas connu, et que la maladie

coronarienne est plus facile à diagnostiquer, on a décidé de conduire l'étude chez les patients avec une maladie coronarienne qui suivent une thérapie antiplaquettaire. On avait collaboré avec deux cardiologues de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour avoir accès aux patients. Nous avons voulu distinguer l'effet de l'aspirine seul sur la libération du BDNF de celui de la double thérapie. Nous avons par la suite, inclut un groupe de patients atteints de maladies valvulaires privé de thérapie antiplaquettaire, pour pouvoir distinguer l'effet des antiplaquettaires par rapport aux volontaires sains (généralement plus jeunes que les patients) et aussi vérifier s'il y aurait un impact d'autres facteurs comme les comorbidités et l'âge dans une prochaine étape du projet. Le groupe incluant les patients atteints de maladies valvulaires privé de thérapie antiplaquettaire va nous aider dans l'interprétation des résultats, nous avons donc planifié 4 groupes de patients à cet effet.

L'utilisation chronique de médicaments antiplaquettaires employés dans la prévention secondaire de maladie cardiovasculaire pourrait affecter la cinétique de la relâche et/ou capture de BDNF par les plaquettes. Nous pensons que les antiplaquettaires diminuent la relâche de BDNF afin de libérer ce dernier de façon programmée et non inutilement. Notons que l'hyperactivité plaquettaire est une caractéristique importante qui accompagne les maladies vasculaires et résulte en une augmentation importante du risque d'évènement thrombotique. Si le BDNF arrive à activer les plaquettes et permet l'agrégation de celles-ci, par conséquent, les antiplaquettaires pourraient agir en freinant la libération du BDNF. Cette diminution dans la relâche de BDNF permet un équilibre dans la quantité du BDNF en circulation et celle au niveau des plaquettes lors des événements thrombotiques.

Nous ne nous pouvons pas établir un lien ou aller de l'avant sur l'action de BDNF *in vivo* compte tenu du fait que d'autres expériences complémentaires devraient identifier la pertinence clinique d'une prise à long terme des antiplaquettaires.

L'hypothèse principale de ce projet est que les différentes voies d'activation plaquettaire peuvent mener à une libération du BDNF par les plaquettes, où cette dernière est affectée par les antiplaquettaires.

5.2 Objectifs du projet de recherche

Le but spécifique de ce projet de recherche est d'étudier l'effet des médicaments antiplaquettaires sur la libération de BDNF par les plaquettes des patients souffrant de maladie cardiovasculaire stable requérant la prise de médicaments antiplaquettaires.

Les groupes de comparaison sont les suivants : les volontaires sains, les patients souffrant de maladie cardiovasculaire stable requérant la prise de médicaments antiplaquettaires (en prévention secondaire) *versus* un groupe témoin apparié pour l'âge, souffrant de maladie valvulaire ou de cardiomyopathie, mais ne requérant pas la prise de médicaments antiplaquettaires.

Volet 1 : Effets des antiplaquettaires sur l'agrégation plaquettaire et sur la libération du BDNF

Objectif 1 : Étudier l'effet des médicaments antiplaquettaires sur la libération du BDNF par les plaquettes traitées *in vitro* et provenant de volontaires sains.

Objectif 2 : Étudier l'effet des médicaments antiplaquettaires sur la libération du BDNF par les plaquettes *in vivo* en étudiant les plaquettes des patients souffrant de maladie cardiovasculaire stable requérant la prise des médicaments antiplaquettaires en prévention secondaire.

Objectif 3 : Comparer les niveaux d'expression du BDNF intraplaquettaire entre les groupes de volontaires sains et de patients atteints de maladie coronarienne.

Volet 2 : Effet du BDNF exogène sur les plaquettes

Objectif 1 : Examiner l'effet du BDNF exogène, seul ou en synergie avec d'autres agonistes, sur les plaquettes en PRP (plasma riche en plaquettes) chez les volontaires sains et les patients atteints de maladie coronarienne.

Objectif 2 : Étudier l'effet de BDNF exogène sur les plaquettes lavées chez les volontaires sains.

Objectif 3 : Vérifier la présence du récepteur TrkB au niveau des plaquettes.

5.3 Dérroulement de l'étude

Cette étude a été évaluée et approuvée par le comité d'éthique de la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal (#16-1996). Elle a été effectuée au laboratoire de Dre Marie Lordkipanidzé et en collaboration avec le laboratoire du Dr Yahye Merhi. Les sujets intéressés à prendre part à cette étude ont été invités à contacter la coordonnatrice de l'étude qui en a planifié le déroulement. L'étude a été expliquée aux participants potentiels, puis ces derniers ont été invités à signer un formulaire de consentement avant leur entrée dans l'étude; leur participation s'est faite sur une base volontaire et le retrait des participants de l'étude pouvait se faire en tout temps, sur simple avis verbal. Une seule visite d'environ 30 minutes fut requise pour leur participation, où chacun des sujets fut interrogé sur leur état de santé et pour valider leur éligibilité à l'étude. En outre, une prise de sang de 45 ml pour les patients souffrant de maladie cardiovasculaire *versus* 90 ml pour les volontaires sains fut prélevée pour l'analyse.

5.3.1 Sélection des sujets

Le processus du recrutement a débuté en respectant les critères d'inclusion et d'exclusion pour chaque groupe d'étude.

5.3.1.1. Groupe 1 : Volontaires sains

Les volontaires sains sont abordés par affichage de l'étude au centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal et à l'Université de Montréal.

Critères d'inclusion

- Sujets adultes, âgés de 18 ans ou plus.
- Aptes à comprendre les consignes de l'étude et à signer le formulaire de consentement.

Critères d'exclusion

- Toute évidence de maladie athérosclérotique, présente ou passée.
- Diagnostic présent ou passé d'hypertension, de dyslipidémie ou de diabète.
- Usage de tout médicament autre que la pilule contraceptive au cours des 14 jours précédant le prélèvement sanguin; ceci inclut les médicaments antiplaquettaires, anti-inflammatoires ou antihistaminiques et antidépresseurs.

- Chirurgie majeure dans les 3 mois précédant le prélèvement sanguin.
- Décompte plaquettaire hors de l'intervalle de référence normal (150 – 450 x 10⁹ plaquettes/ml).
- Hémoglobine < 100 g/L ou hématicrite < 25%.

5.3.1.2. Groupes 2 et 3: Patients souffrant de maladie coronarienne stable sous traitements antiplaquettaires (double ou monothérapie à l'Aspirine)

Les patients souffrant de maladie coronarienne sont approchés par leur médecin traitant aux cliniques externes de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Les personnes ayant manifesté leur intérêt sont alors contactées par la coordonnatrice de l'étude, qui leur explique l'étude en détail avant de procéder à la prise de rendez-vous.

Critères d'inclusion

- Sujets adultes, âgés de 18 ans ou plus.
- Aptes à comprendre les consignes de l'étude et à signer le formulaire de consentement.
- Souffrant de maladie coronarienne stable pour laquelle une thérapie antiplaquettaire en prévention secondaire est requise à long terme.
- **Groupe 2 : Sous double thérapie (aspirine + un inhibiteur du récepteur P2Y₁₂ de l'ADP) :** Une combinaison d'Aspirine 80 mg une fois par jour avec un inhibiteur des récepteurs P2Y₁₂, c.-à-d. Clopidogrel 75 mg une fois par jour, Prasugrel 10 mg une fois par jour ou Ticagrelor 90 mg 2 fois par jour.
- **Groupe 3 : Sous monothérapie à l'aspirine 80 mg une fois par jour.**

Critères d'exclusion

- Syndrome coronarien aigu ou intervention coronarienne percutanée au cours des 3 mois précédant le prélèvement sanguin.
- Usage de médicaments anti-inflammatoires ou antihistaminiques ou antidépresseurs dans les 14 jours précédant le prélèvement sanguin.
- Chirurgie majeure dans les 3 mois précédant le prélèvement sanguin.
- Néoplasie sous traitement ou en rémission.

- Pathologie hépatique, insuffisance rénale chronique sévère (Clcr <30 cc/min).
- Décompte plaquettaire hors de l'intervalle de référence normal (150 – 450 x 10⁹ plaquettes/ml).
- Hémoglobine < 100 g/L ou hématocrite < 25%.

5.3.1.3. Groupe 4 : Patients souffrant de maladie valvulaire ou de cardiomyopathie

Ce groupe de patients est notre groupe contrôle pour l'âge et la maladie cardiovasculaire. Les patients souffrant de maladie valvulaire ou de cardiomyopathie sont approchés par leur médecin traitant aux cliniques externes de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Les personnes ayant manifesté leur intérêt seront alors contactées par la coordonnatrice de l'étude, qui pourra leur expliquer l'étude en détail et procéder à la prise de rendez-vous.

Critères d'inclusion

- Sujets adultes, âgés de 18 ans ou plus.
- Aptes à comprendre les consignes de l'étude et à signer le formulaire de consentement.
- Souffrant de maladie valvulaire ou de cardiomyopathie pour laquelle une thérapie antiplaquettaire n'est pas requise.
- Appariés (\pm 5 ans) aux participants souffrant de maladie coronarienne.

Critères d'exclusion

- Maladie coronarienne établie.
- Usage de médicaments antiplaquettaires, anti-inflammatoires ou antihistaminiques ou antidépresseurs dans les 14 jours précédant le prélèvement sanguin.
- Intervention chirurgicale ou percutanée majeure dans les 3 mois précédant le prélèvement sanguin.
- Néoplasie sous traitement ou en rémission.
- Pathologie hépatique, insuffisance rénale chronique sévère (Clcr <30 cc/min).
- Décompte plaquettaire hors de l'intervalle de référence normal (150 – 450 x 10⁹ plaquettes/ml).
- Hémoglobine < 100 g/L ou hématocrite < 25%.

5.4 Description des techniques de laboratoire

5.4.1 Isolation des plaquettes à partir du sang périphérique

Le prélèvement de sang est de l'ordre de 45 ml pour les patients souffrant de maladie cardiovasculaire ou de 90 ml pour les volontaires sains. Le prélèvement a été effectué par une personne qualifiée et infirmier(ère) de l'Institut de Cardiologie de Montréal, dans un endroit doté d'équipements nécessaires et fiables. La solution de 3,8 % de citrate de sodium (VWR) est utilisée comme anticoagulant. Par la suite, au laboratoire de Dre Lordkipanidzé ou à celui du Dr Merhi, une série de centrifugations fut effectuée afin d'isoler les plaquettes sanguines. La première étape consiste à centrifuger le sang à 200 g pendant 15 minutes à température ambiante pour obtenir le PRP. Une fois le PRP délicatement récupéré, il est transféré dans un tube conique de 50 mL pour éviter l'activation des plaquettes. Une partie est conservée pour l'immunobuvardage et l'autre partie pour les tests d'agrégation. Un décompte plaquettaire est effectué pour chaque échantillon de sang récolté.

Pour obtenir des plaquettes lavées, la PGE1 (Sigma-Aldrich) est ajoutée au PRP pour obtenir une concentration finale de 1 μ M. Par la suite, le PRP est centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes à température pièce. Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est éliminé et le culot est suspendu dans une solution tampon de tyrode (NaCl 137 mM, NaHCO₃ 11.9 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 0.4 mM, KCl 2.7 mM, glucose 5.6 mM, MgCl₂ 1.1 mM, pH 7,4) préparée au laboratoire et préalablement réchauffée à 37 °C. Le lavage est répété deux fois. Après la dernière centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes, les plaquettes sont suspendues dans le tampon tyrode à une concentration physiologique de 250 x10⁶ plaquettes/mL. Les plaquettes lavées sont laissées au repos pendant 30 min à température pièce avant le début des expériences. Ce processus d'isolation des plaquettes suit des procédés établis par l'équipe de Dr Merhi et adaptés au laboratoire de Dre Lordkipanidzé^{398, 399}.

5.4.2 Agrégation par transmission lumineuse (LTA)

Dans le but d'établir le lien entre l'activation plaquettaire et la libération du BDNF, une série d'expériences d'agrégométrie est effectuée en utilisant l'appareil ChronoLog Model 700. L'agrégométrie par transmission lumineuse est le test étalon (*gold standard*) dans

l'étude de la fonction plaquettaire. Cette technique permet la mesure de l'agrégation plaquettaire par analyse de la transmission de lumière à travers un échantillon de plaquettes en suspension (PRP ou plaquettes lavées). Dans la présente étude, nous avons utilisé le PRP, qui est un milieu turbide où la lumière passe peu. L'ajout d'un agoniste induit l'agrégation plaquettaire dans l'échantillon, ce qui provoque la formation d'amas plaquettaires et diminue la turbidité de l'échantillon, laissant passer davantage de luminosité. Ainsi, le niveau d'agrégation plaquettaire de l'échantillon est déduit de l'intensité de lumière captée suite à l'ajout d'un agoniste au PRP. Les échantillons sont ensuite stimulés sous agitation continue (1000 RPM / min) à 37 °C. L'agrégation plaquettaire est enregistrée et mesurée 5 min après l'addition des agonistes^{399 400}. L'agrégation plaquettaire est exprimée sous forme de pourcentage, le maximum étant fixé par la luminosité captée en plasma pauvre en plaquettes (PPP). L'agrégation plaquettaire de chaque participant est quantifiée selon l'amplitude des niveaux d'agrégation qui est fournie par l'appareil d'agrégométrie. Pour pouvoir quantifier le BDNF relâché pour chaque condition, à la fin de l'agrégation, l'éthylène-diamine-tétra-acétique à une concentration finale de l'ordre de 4 mM (soit 5 µl de la solution stock à une concentration de 100 mM pour chaque 125 µL d'échantillon) a été ajouté avant de centrifuger les échantillons (100 g pendant 15 minutes). Le PPP est recueilli délicatement et le culot est écarté. Un volume d'environ 300 µL est récupéré, séparé dans deux tubes qui sont entreposés à -80°C.

La technique d'agrégation offre l'avantage de pouvoir décortiquer les diverses voies d'activation plaquettaire en utilisant des agonistes plaquettaires spécifiques soit :

- L'AA (0.5 mM, 0.75 mM et 1 mM, Cayman)
- L'ADP (1 µM, 3 µM et 10 µM, Sigma)
- Le collagène (0.5 µg/mL, 2 µg/mL et 5 µg/mL, ChronoLog)
- L'épinéphrine (EPI), (5 µM, 10 µM et 30 µM, VWR)
- Le TRAP-6-amide (0.5 µM, 1 µM et 3 µM, Bachem)

Pour évaluer l'effet des médicaments antiplaquettaires sur la libération du BDNF, une série d'expériences *in vitro* sur les plaquettes isolées à partir de sang de volontaires sains est faite. Les inhibiteurs qui ont été utilisés sur les plaquettes isolées cibleront différents récepteurs^{401, 402 403} :

- Un inhibiteur de la COX-1 plaquettaire (ASA : 30 μ M, Sigma-Aldrich)
- Un antagoniste sélectif des récepteurs P2Y₁₂ (AR-C 66096 *tetrasodium salt* ou AR-C : 1 μ M, Tocris)
- Un antagoniste des récepteurs α IIb β 3 (Reopro ou Abciximab : 3 μ g/mL, Lilly).

Pour évaluer l'effet des inhibiteurs pharmacologiques des récepteurs TrK, nous avons utilisé deux inhibiteurs soient ;

- La cyclotraxine-B (5 μ M, Tocris)⁴⁰⁴
- Le GNF 5837 (1 et 30 μ M, Tocris)⁴⁰⁵

5.4.3 Dosage du BDNF plasmatique par la technique d'ELISA en sandwich

Dans le but de mesurer la concentration du BDNF relâché par les plaquettes dans les quatre groupes d'étude, les surnageants de la réaction d'agrégométrie collectés à la fin de l'expérience d'agrégation dans la section précédente ont été analysés pour la quantification du BDNF à l'aide de technique *d'Enzyme Linked immunosorbent assay* (ELISA). Le kit ELISA disponible commercialement (BDNF *Emax*® *ImmunoAssay System*, G7610, *Promega*)⁴⁰⁶ permet la quantification du BDNF dans les échantillons biologiques. L'analyse se fait en plaque de 96 puits, qui sont tapissés avec l'anticorps spécifiquement dirigé contre l'antigène du BDNF humain. L'incubation des échantillons se fait pendant 2 heures à température pièce. Les références standards ainsi que les solutions de dilution, de lavage, de révélation et de blocage sont fournies par la compagnie. La courbe standard de BDNF générée avec ce kit s'étale entre 0 et 500 pg/mL. Une série de dilution des échantillons a été effectuée, allant de 4 jusqu'à 25 fois afin de déterminer la dilution optimale à utiliser. La lecture de densité optique se fait dans des plaques de 96 puits (*Corning Costar*®) à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide d'un lecteur optique (*Infinite F50*, *Tecan Mannedolf*, Suisse). La sensibilité minimum de ce kit pour détecter le BDNF est de 15,6 pg/mL. L'analyse des données a été effectuée *via* GraphPad Prism 6 pour Macintosh (GraphPad Software Inc.). Les tests statistiques et les résultats sont présentés dans le chapitre 6. Les données des patients qui n'étaient pas inclus entre les limites de détection de ce kit ont été éliminées lors de l'analyse des données et validées par les directeurs de recherche.

5.4.4 Détection de BDNF intraplaquettaire par immunoblotage

Afin de vérifier la forme de la protéine (BDNF mature) au niveau des plaquettes, nous avons mesuré la présence de celle-ci à l'aide d'immunobuvardage (*western blot*)⁴⁰⁷. Différents essais et expériences ont été entamés avant de réussir à obtenir un protocole préliminaire au laboratoire. Les plaquettes isolées et lavées (250 x 10⁶ plaquettes/mL) sont lysées avec une solution de lyse préparée au laboratoire (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycérone, 1% β-mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA, 0.02% bleu de bromophénole). Les échantillons de protéines sont chargés à titre de 10 µl/puits et séparés *via* un gel de polyacrylamide-SDS à 14% pendant 2 h à 100V dans la solution de migration fraîchement préparée (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3-8.8) et transférée dans la solution de transfert (25 mM Tris base, 192 mM glycine, méthanol) toute la nuit à 50 mA. La membrane est bloquée dans une solution de lait 5% TBST (20 mM Tris base, 150 mM NaCl, contenant 0.1% Tween-20, pH 7.5) pour 60 min. La membrane est ensuite incubée toute la nuit avec l'anticorps primaire anti-BDNF à 4°C (*anti-BDNF monoclonal antibody 3C11, Icosagen*) dans une solution de *Bovine Serum Albumin* à 3% ou bien en présence de l'anticorps anti-β-actin (R&D), dilué 1 :10000 dans le TBST (tris-buffered saline) à température pièce pendant 2 heures. L'anticorps secondaire utilisé (*Peroxidase-conjugated goat anti-mouse, Jackson ImmunoResearch*) est dilué 1:10 000 et incubé pendant 1 heure à température pièce. La révélation est effectuée après une minute à température pièce. La densitométrie est effectuée par le logiciel d'analyse *ImageJ*. La normalisation de l'intensité des bandes du BDNF (14 kDa) se fait par rapport à celle de la β-actine (42 kDa) pour chaque échantillon plaquettaire, pour tous les gels et pour chaque groupe.

5.4.5 Stimulation des plaquettes par le BDNF

L'une des hypothèses émises dans ce projet de recherche est que le BDNF puisse lier deux différents types de récepteurs (TrKB et P75^{NTR}) au niveau des plaquettes afin d'induire une signalisation. Il pourrait se lier au même récepteur avec différentes forces d'interaction ou en ciblant différents récepteurs avec des affinités différentes. Les fonctions du BDNF au niveau du SNC sont paracrines et autocrines⁴⁰⁸, telles que discutées plus haut. À partir des données disponibles au niveau central, nous avons cherché à savoir si ce peptide avait une influence similaire sur la fonction plaquettaire. Nous voulions savoir si le BDNF exogène

pouvait provoquer une agrégation des plaquettes lavées. Le taux de BDNF sérique est environ 200 fois supérieur à celui du BDNF plasmatique d'après l'étude de Rosenfeld et *al.*³⁴⁶. L'agrégation plaquettaire et l'utilisation de 3 concentrations du BDNF sont un bon modèle d'étude qui nous permettra de comprendre l'action thrombotique ou antithrombotique du BDNF une fois en circulation. Afin d'étudier l'effet du BDNF sur la fonction plaquettaire et en se basant sur des essais préliminaires montrant l'absence d'une agrégation plaquettaire avec des concentrations physiologiques de BDNF, une mise au point des concentrations a été établie avec la directrice pour tester des concentrations allant de 1 à 10 µg/ml (approximativement 70 nM à 700 nM). Notons que selon la description du produit par la compagnie, la dose efficace médiane du BDNF recombinant, pour stimuler la prolifération des cellules C6 de rat, est de 0,5 à 1 µg / mL (Pepro Tech catalogue # 450-02). Nous avons aussi procédé à la stimulation du PRP avec la dose intermédiaire du BDNF soit 3 µg/mL en présence de la forte et la faible dose des agonistes classiques cités ci-dessus chez les quatre groupes d'étude. L'incubation des plaquettes en présence du BDNF était de 10 min avant la stimulation avec les agonistes à température pièce sans agitation.

5.4.6 Identification du récepteur TrKB chez les volontaires sains

Différents essais ont été entamés avant de réussir à avoir un protocole préliminaire au laboratoire. En utilisant la même technique semi-quantitative de *western blot*⁴⁰⁷ décrite plus haut, nous avons vérifié la présence du récepteur TrKB au niveau des plaquettes des volontaires sains.

La présence intraplaquettaire du TrKB a été étudiée en utilisant l'anticorps TrKB (R&D), dilué 1:500. L'expression a été mesurée sur des lysats de plaquettes isolées de volontaires sains, et dont la concentration a été ajustée à 10^7 plaquettes/mL. L'expression des récepteurs de BDNF au niveau des plaquettes n'a jamais été rapportée dans le passé. Ainsi, nous avons effectué plusieurs essais afin de mettre au point et standardiser la méthode. Les essais qui ont été réalisés avec des concentrations plus faibles de plaquettes nous ont permis de détecter une bande très faible de BDNF ou même inexistante dans certaines expériences. On a augmenté graduellement la concentration plaquettaire et nous avons constaté qu'à une concentration de 10^7 , la bande est facilement détectable.

Une première série d'expériences a été faite avant de valider la concentration de plaquettes utilisées. Les plaquettes isolées et lavées sont lysées avec la solution de lyse préparée au laboratoire (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycérole, 1% β -mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA, 0.02% bleu de bromophénole). Les échantillons de protéines ont été chargés à titre de 30 μ l/puits et séparées *via* un gel de polyacrylamide-SDS à 8%.

L'anticorps secondaire utilisé (*Peroxidase-conjugated goat anti-mouse*, Jackson ImmunoResearch), dilué 1:10 000, est incubé pendant 1 h à température pièce. La révélation est effectuée après une minute à température pièce. Les expériences représentent 15 échantillons de plaquette de volontaires sains.

L'anticorps anti- β -actine (R&D), dilué 1:10000 dans le TBST à température pièce pendant 2 H est utilisé comme contrôle. L'anticorps secondaire utilisé (*Peroxidase-conjugated goat anti-mouse*, Jackson ImmunoResearch), dilué 1:10 000, est incubé pendant 1 h à température pièce. La révélation est effectuée après 5 minutes à température pièce. Deux bandes devraient être détectées autour de 95 KDa et 145 KDa pour la forme tronquée et complète, respectivement^{409, 410}.

Les contrôles positifs qui ont été utilisés dans cette expérience sont :

- Des lysats de parenchyme de souris de type sauvage (échantillon fourni par le laboratoire de Dr Éric Thorin à l'Institut de Cardiologie de Montréal, 15 μ g/ puit)
- Des cellules PBMC de volontaires sains (35 μ L/ puit à une concentration de 5×10^6 /mL ou 7.5×10^6 /mL).
- Des plaquettes de volontaires sains (35 μ L/ puit à une concentration de 10^7 /mL).

5.5 Estimation de la taille d'échantillon

Il a été convenu que cette étude est une étude exploratrice, qui vise à générer des données préliminaires requises pour entreprendre des études de plus grande envergure. Puisque le lien entre l'activation plaquettaire et la relâche de BDNF, en présence ou non d'inhibiteurs plaquettaires, n'est pas connu, il nous est impossible de connaître à l'avance les données de moyennes et de variabilité attendues.

Une taille d'échantillon optimale pour des essais pilotes se situe entre 12 et 20 participants par groupe,⁴¹¹ permet d'optimiser la faisabilité et de contrôler la variance de moyenne des expériences. Nous avons donc choisi d'inclure au début de l'étude 20 participants par groupe (c.-à-d. volontaires sains, patients sans antiplaquettaires, patients sur monothérapie d'aspirine et patients sur thérapie antiplaquettaire combinée). L'objectif principal consistait à évaluer l'effet des médicaments antiplaquettaires sur le BDNF en comparant différents paramètres (ex. concentration de BDNF relâché, association avec le niveau d'agrégation plaquettaire) avant et après l'ajout *in vitro* d'inhibiteurs plaquettaires chez les volontaires sains. Un échantillon de 20 volontaires sains devait permettre de détecter une taille d'effet (moyenne de la différence avant-après / écart-type de la différence) de 0,66 avec une puissance de 80% et un niveau de signification de 0,05. Pour les comparaisons entre groupes de ces mêmes paramètres, une taille d'échantillon de 20 sujets par groupe permettrait de détecter une taille d'effet (différence entre moyennes de groupes / écart-type) de l'ordre de 0,91 avec une puissance de 80% et un niveau de signification de 0,05.

Durant la réalisation de ce projet, il y a eu une difficulté dans le recrutement des patients et la mise en place des protocoles fonctionnels au laboratoire. Le nombre de donneurs à la fin du projet fut révisé et complété avec 10 donneurs ou participants par groupe pour les groupes 2, 3 et 4. De plus, lors des analyses des résultats d'agrégation plaquettaire et des ELISA certaines données furent exclues en raison de leurs faibles courbes d'absorbance, de leurs densité optique et/ou décompte plaquettaire. Une fois ces données écartées de l'analyse, le nombre des participants inclus dans cette étude et regroupant les résultats de l'agrégation et du dosage de BDNF était le suivant:

Volontaires sains : 7 participants retenus/20 testés et analysés

Patients souffrant de maladie cardiovasculaire stable sous monothérapie à l'aspirine : 7 participants retenus/10 testés et analysés.

Patients souffrant de maladie cardiovasculaire stable sous DAPT (ASA + un antagoniste des récepteurs P2Y₁₂): 6 participants retenus/10 testés et analysés.

Patients souffrant de maladie valvulaire ou de cardiomyopathie : 5 participants retenus/10 testés et analysés.

Le nombre d'expériences (n) effectué pour chaque analyse dans chaque groupe est indiqué dans la section résultats et les légendes des figures. Un tableau représentatif des caractéristiques des participants est également présenté dans le chapitre 6.

5.5.1 Analyses statistiques

Les variables continues sont présentées sous forme de médiane [écart interquartile] si la distribution ne suit pas la loi normale. Les variables catégorielles sont présentées sous forme de fréquence et pourcentage. La normalité a été vérifiée par le test d'Agostino-Pearson. On a utilisé des tests non paramétriques d'ANOVA (Friedman ou Kruskal-Wallis) en ajustant le P pour le nombre de comparaisons. Le niveau de signification bidirectionnel est fixé à 0,05. Les analyses sont effectuées avec GraphPad Prism 6 pour Macintosh (GraphPad Software Inc.).

Puisque la distribution des données ne suit pas une loi normale, les tests non paramétriques de Friedman et Kruskal-Wallis ont été utilisés pour l'analyse de certains résultats.

**Chapitre 6 : Effets des antiplaquettaires sur
l'agrégation plaquettaire et la
libération du BDNF**

6.1 Effets des antiplaquettaires sur l'agrégation plaquettaire induite par les différents agonistes utilisés chez les volontaires sains

À ce stade, on ne connaît pas l'effet des antiplaquettaires sur la libération plaquettaire du BDNF, ni son effet une fois dans la circulation. Afin d'évaluer les effets des agents antiplaquettaires sur la quantité de BDNF relâchée chez les volontaires sains, nous avons tout d'abord effectué des tests d'agrégation en PRP préincubées avec les trois antiplaquettaires (ASA, AR-C ou Abciximab) avant de les stimuler avec les différents agonistes (collagène, ADP, AA, épinéphrine ou TRAP-6), choisis spécifiquement pour étudier les différentes voies d'activation plaquettaire. Par la suite, le plasma généré en réponse à la concentration la plus importante de l'agoniste en question a été récolté afin de quantifier la libération du BDNF par ELISA. Ceci nous permettra d'établir un lien entre l'activation/agrégation plaquettaire et la libération de BDNF. Les données sont présentées dans les sections suivantes.

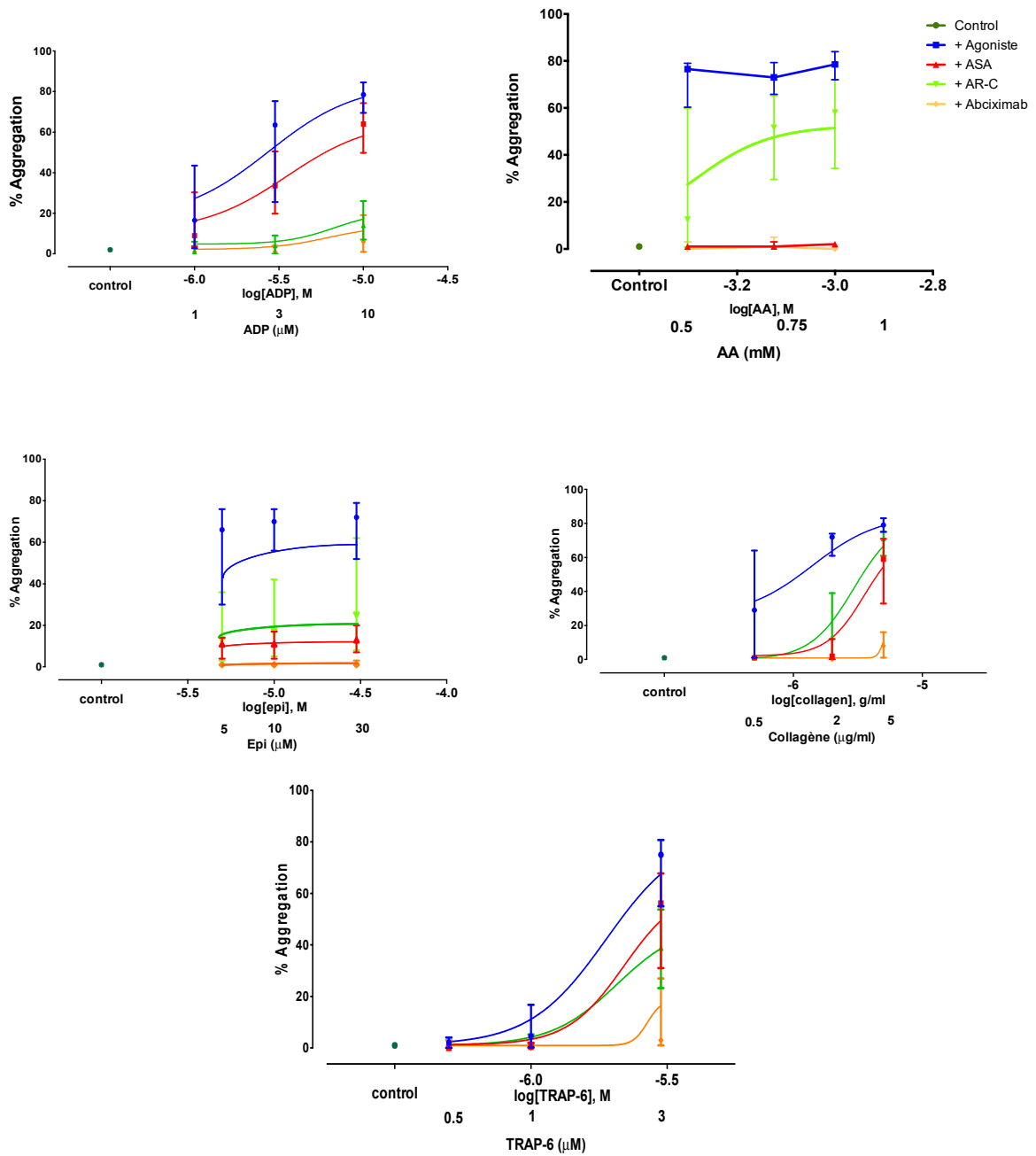


Figure 13: Agrégation optique en PRP des volontaires sains avec différentes doses (Faible, moyenne et forte) de chaque agoniste et en réponse aux antiplaquettaires. Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane \pm IQR, ADP (n=18), AA (n \geq 10), épinéphrine (EPI) (n=19), collagène (n \geq 15), Trap-6 (n=19).

Dans les graphiques de la figure 13, les résultats d'agrégation proviennent des analyses effectuées chez 20 sujets sains, dont le nombre des tests ayant pu être validés est indiqué dans la légende pour chaque agoniste. De manière générale, nous avons ciblé la voie d'amplification en choisissant l'ADP et l'AA, la voie de la sensibilisation avec l'épinéphrine, la voie de la coagulation avec le choix du TRAP-6, et l'adhésion plaquettaire en optant pour le collagène. La figure 13 montre que tous les agonistes testés induisent une agrégation plaquettaire d'une façon dose-dépendante, à l'exception de l'AA. À la dose la plus forte (dose d'intérêt pour l'étude de la libération du BDNF par les plaquettes), l'agrégation approximative était proche de 80%. Cependant, à la dose la plus faible, l'agrégation est variable, car ces doses sont suboptimales et induisent un stimulus d'amorçage qui dépend de la réactivité plaquettaire chez les différents donneurs. Les différents antiplaquettaires inhibent l'agrégation, que ce soit pour l'inhibiteur spécifique des récepteurs adénosines (AR-C) ou par l'inhibiteur de la COX-1 (ASA) et/ou par l'inhibiteur du récepteur α I**II** β 3 (Abciximab) impliqué dans l'agrégation plaquettaire *via* sa liaison au fibrinogène.

La prochaine partie de cette section abordera le premier objectif du projet de recherche, qui est d'étudier l'effet des médicaments antiplaquettaires sur la libération du BDNF au niveau des plaquettes de volontaires sains (retenus dans l'étude) traitées *in vitro* par des antagonistes spécifiques. Les résultats d'ELISA du BDNF ont été vérifiés et validés chez 7 sujets sains (Figure 14).

6.2 Effet des agonistes sur la libération du BDNF plaquettaire chez les volontaires sains

Le niveau du BDNF plasmatique a été quantifié chez les quatre groupes d'étude par la méthode d'ELISA en utilisant les mêmes paramètres d'analyse et de conditions expérimentales (température de conservation, concentration, volume, etc.). Comme l'effet des antiplaquettaires sur la libération du BDNF plaquettaire est très mal documenté, ces travaux de recherche vont nous permettre de vérifier si les antiplaquettaires influenceraient le réservoir du BDNF. Dans un premier temps, la vérification que les plaquettes peuvent sécréter le BDNF après une stimulation est représentée dans la figure 14 ci-dessous.

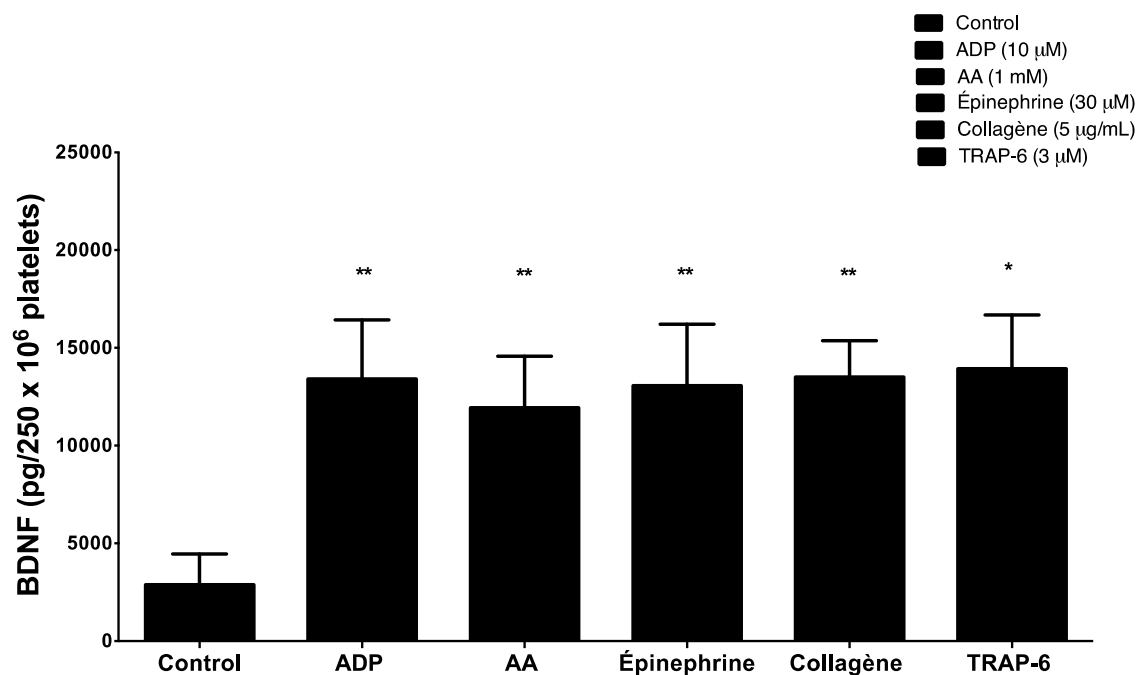


Figure 14: Dosage du BDNF en plasma de PRP par la méthode d'ELISA chez les volontaires sains.

Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane \pm IQR, n=7 (test de Friedman, **p<0,001 & *p<0,01 vs Contrôle).

La figure 14 montre que, à l'état basal (contrôle), la quantité plasmatique basale du BDNF chez les volontaires sains est faible (2627 pg / 250 x 10⁶ plaquettes). Tous les agonistes plaquettaire testés permettent d'augmenter significativement la libération de BDNF environ cinq fois en comparaison avec les niveaux basaux (\approx 12604 pg / 250 x 10⁶ plaquettes). Quel que soit l'agoniste utilisé, on a remarqué une forte libération du BDNF par les plaquettes, ce qui permet de confirmer que les plaquettes emmagasinent une quantité importante de BDNF. Reste à savoir si cette quantité va être influencée par l'ajout des antiplaquettaires; ceci va être vérifié dans les expériences suivantes.

6.3 Effet des antiplaquettaires sur l'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire chez les volontaires sains

6.3.1 Effet des antiplaquettaires sur l'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire en présence des agonistes

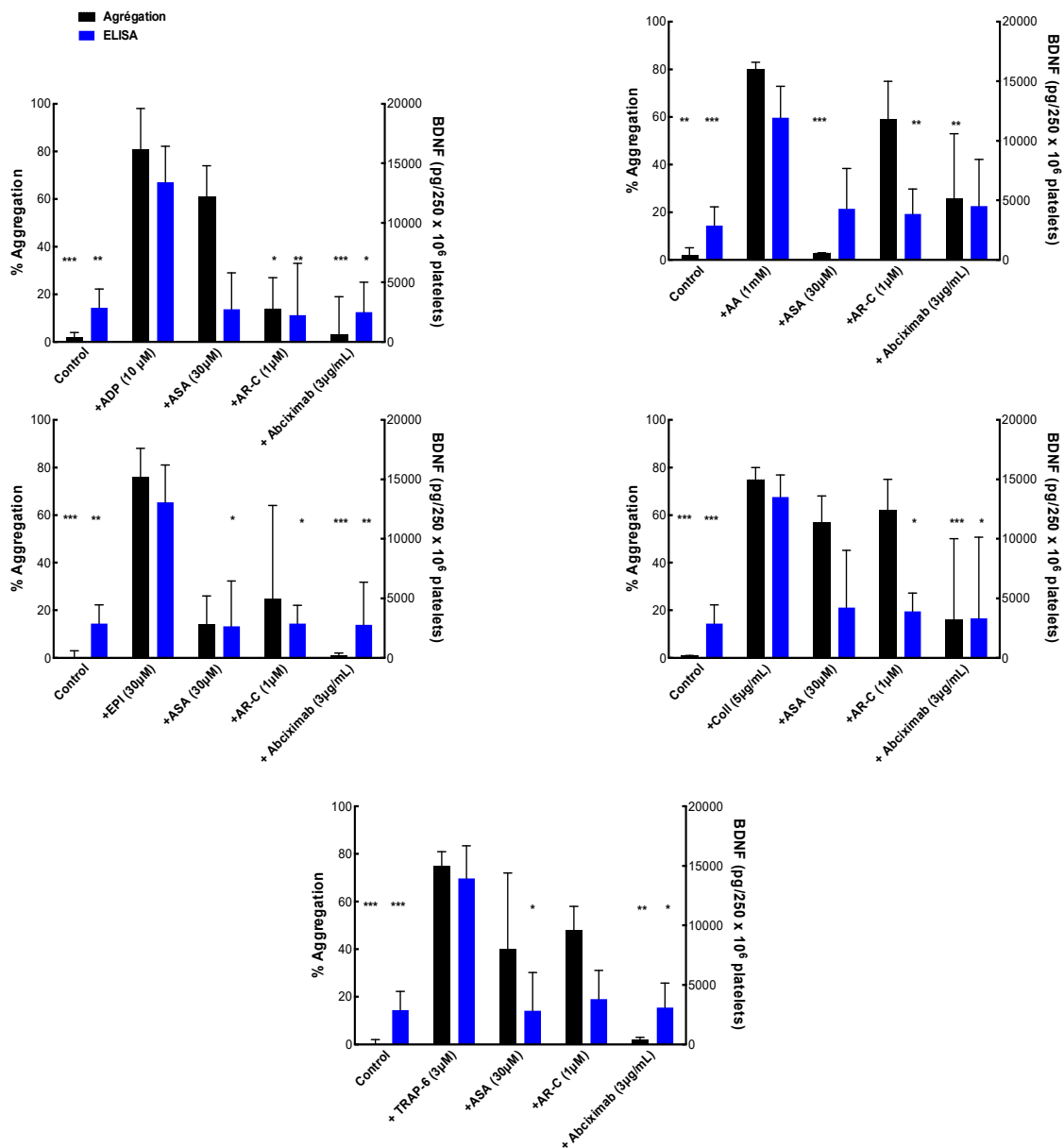


Figure 15: Dosage du BDNF en plasma de PRP par la méthode d'ELISA en présence des antiplaquettaires et des agonistes utilisés en fonction de l'agrégation plaquettaire chez les volontaires sains.

Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane \pm IQR, $n=7$ (test de Friedman, $p^{***}<0,0001$, $p^{**}<0,001$ & $p^{*}<0,01$ vs ADP; vs AA; vs TRAP-6; vs Collagène et vs EPI).

Comme prévu et tel que démontré dans la figure 15, les plaquettes activées libèrent du BDNF et cette libération est bloquée par des agents antiplaquettaires. En reproduisant l'effet des antiplaquettaires *in vitro* chez les volontaires sains en réponse à l'ADP, on a remarqué une inhibition significative par l'AR-C (2240 pg / 250 x 10⁶ plaquettes) et l'Abciximab (2498 pg / 250 x 10⁶ plaquettes) qui réduisent la libération du BDNF à un niveau comparable au niveau contrôle (2627 pg / 250 x 10⁶ plaquettes). L'ASA réduit de son côté cette sécrétion, mais cette dernière reste non significative. Du côté de l'agrégation, l'ADP induit une forte agrégation *via* les récepteurs purinergiques à l'adénosine, ce qui nous a permis d'enregistrer une agrégation de 80%. De plus, cette agrégation se trouve inhibée de manière significative par l'AR-C, l'antagoniste spécifique de l'ADP (ce qui est attendu) et par l'inhibiteur du récepteur α IIb β 3 impliqué dans l'agrégation plaquettaire *via* sa liaison au fibrinogène, sans être affectée par l'ASA. L'agrégation semble suivre la sécrétion du BDNF à des niveaux de signification proches. L'AA augmente la libération du BDNF de manière significative par rapport au contrôle (11933 pg / 250 x 10⁶ plaquettes). Du côté de l'agrégation, l'AA induit une forte agrégation *via* la libération du TXA₂. Nous avons enregistré une agrégation plaquettaire de 80% à une dose de 1 mM par rapport à la condition contrôle. Cette agrégation est suivie d'une sécrétion importante de BDNF. L'Abciximab réduit cette sécrétion, mais le résultat reste non significatif. De ce fait, l'ASA inhibe aussi bien l'agrégation que la libération plaquettaire du BDNF (4519 pg / 250 x 10⁶ plaquettes) en présence d'une forte dose d'AA. En présence de l'AR-C, on remarque que l'agrégation est de l'ordre de 60% alors que la libération du BDNF est inhibée significativement. Ceci suggère qu'en présence de cet antiplaquettaire, le BDNF plaquettaire n'est pas relâché même lors de l'agrégation.

Tous les antiplaquettaires utilisés inhibent significativement la libération du BDNF induite par l'épinéphrine à des niveaux comparables à la condition basale ou contrôle (2883 pg / 250 x 10⁶ plaquettes). L'effet de ce sensibilisateur se trouve remarquablement plus affecté par l'Abciximab. Encore une fois pour l'AR-C, l'activation des plaquettes a permis

d'enregistrer une réduction non significative à 40 % d'agrégation, malgré que le BDNF relâché était significativement inhibé.

Afin d'étudier la voie déclenchée par l'adhésion plaquettaire à la matrice extracellulaire riche en collagène, nous avons utilisé une forte dose de collagène pour activer les plaquettes. D'après la figure 15, nous avons remarqué que l'Abciximab réduit significativement la quantité du BDNF libéré en présence du collagène chez les volontaires sains (3329 pg / 250 x 10⁶ plaquettes), ce qui est comparable au niveau contrôle. Ce résultat se reproduit aussi au niveau de l'agrégation plaquettaire. Cela met en évidence que l'Abciximab inhibe non seulement l'agrégation plaquettaire (ce qui est attendu), mais aussi la libération du BDNF de manière significative chez les volontaires sains en présence du collagène. Les autres antiplaquettaires réduisent la libération du BDNF, mais cette dernière reste non significative. Ceci pourrait être dû à des variations importantes dans les réponses au collagène et le faible nombre des expériences. En revanche, les plaquettes de ces donneurs agrègent fortement, malgré la baisse importante du relâche du BDNF en présence de l'AR-C et de l'ASA. L'agrégation plaquettaire ne suit pas le même profil de la sécrétion du BDNF en présence de cet agoniste.

À travers le TRAP-6 amide, nous avons ciblé la voie de la coagulation qui mène à la formation de la thrombine et à l'activation de son récepteur de haute affinité le PAR-1. La liaison de TRAP-6 à PAR-1 provoque un changement de conformation des récepteurs α IIb β 3 plaquettaires, ce qui leur confère une haute affinité pour le fibrinogène. Le fibrinogène se lie ensuite aux récepteurs provoquant une agrégation.

La figure 15 indique que le TRAP-6 permet la libération de BDNF jusqu'à 5 fois plus que la quantité basale (13931 pg / 250 x 10⁶ plaquettes) et ceci est accompagné par une forte agrégation (80%). L'agrégation et la sécrétion se trouvent fortement et significativement inhibées en présence de l'Abciximab. Or la sécrétion du BDNF a été réduite par l'AR-C et significativement inhibée par l'ASA, sans pour autant suivre le même profil au niveau de l'agrégation, où les plaquettes agrègent à une moyenne de 45%.

En résumé, les données obtenues chez les donneurs sains nous permettent d'avancer que l'ajout des antiplaquettaire influence à la baisse la quantité du BDNF libérée par les plaquettes. Le profil de l'agrégation plaquettaire et la sécrétion de BDNF dépendent de

l'agoniste et de l'antiplaquettaire en question. L'activation plaquettaire semble être importante pour relâcher le BDNF plaquettaire.

6.4 Effet des antiplaquetitaires sur l'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire chez les patients

Cette section s'intéresse aux effets des antiplaquetitaires sur la libération du BDNF par les plaquettes des patients. Ainsi, on abordera l'objectif 2 de ce volet de recherche qui est d'étudier l'effet des médicaments antiplaquetitaires sur la libération du BDNF par les plaquettes *in vivo*, en étudiant les plaquettes des patients souffrant de maladie cardiovasculaire stable requérant la prise des médicaments antiplaquetitaires en prévention secondaire.

L'estimation initiale était de 20 donneurs par groupe, mais au cours de l'étude nous avons rencontré plusieurs difficultés pour trouver des patients ou les recruter dans des délais raisonnables, respectant le cadre de ce projet de doctorat. Ce projet pilote regroupe 10 donneurs par groupe. Le nombre des patients qui a été retenu dans chaque groupe de patients pour l'analyse, après vérification et validation des données d'agrégation et de libération du BDNF chez les mêmes sujets, est présenté dans le tableau 1, illustrant également le décompte plaquettaire, l'âge et le sexe des sujets.

Tableau 1 : Caractéristiques des participants retenus dans le projet

Patients sous ASA				
Patient	Décompte plaquettaire	Sexe	Âge	Autres maladies connexes
1	373	M	82	Hypertension artérielle
2	246	M	77	Diabète
3	245	M	78	Hypertension artérielle
4	251	M	59	Hypertension artérielle/Diabète
5	262	M	75	Hypertension artérielle/Diabète
6	350	M	66	Diabète
7	426	M	68	Diabète/Dyslipidémie/Hypertension artérielle
Moyenne: 72				
Patients souffrant de maladies valvulaires				
Patient	Décompte plaquettaire	Sexe	Âge	Autres maladies connexes
1	218	M	54	Hypertension artérielle pulmonaire
2	243	M	59	Hypercholestérolémie
3	394	M	75	Diabète/Dyslipidémie/Hypertension artérielle
4	174	F	75	Dyslipidémie/Hypertension artérielle
5	223	M	48	Aucune maladie connexe
Moyenne: 62				
Patients sous DAPT				
Patient	Décompte plaquettaire	Sexe	Âge	Autres maladies connexes
1	403	F	57	Hypertension artérielle/Hypercholestérolémie
2	349	M	77	Hypertension artérielle/Hypercholestérolémie
3	334	M	75	Hypercholestérolémie/Diabète
4	346	M	64	Hypertension artérielle/Diabète
5	330	M	43	Hypercholestérolémie/Obésité
6	423	M	62	Diabète
Moyenne : 63				
Volontaires sains				
Patient	Décompte plaquettaire	Sexe	Âge	Autres maladies connexes
1	255	F	33	
2	150	F	35	
3	294	M	43	
4	327	F	31	
5	424	M	28	
6	194	M	40	
7	293	F	43	
Moyenne: 36				

6.4.1 Effet de l'ASA sur l'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire en présence de tous les agonistes chez les patients sous ASA

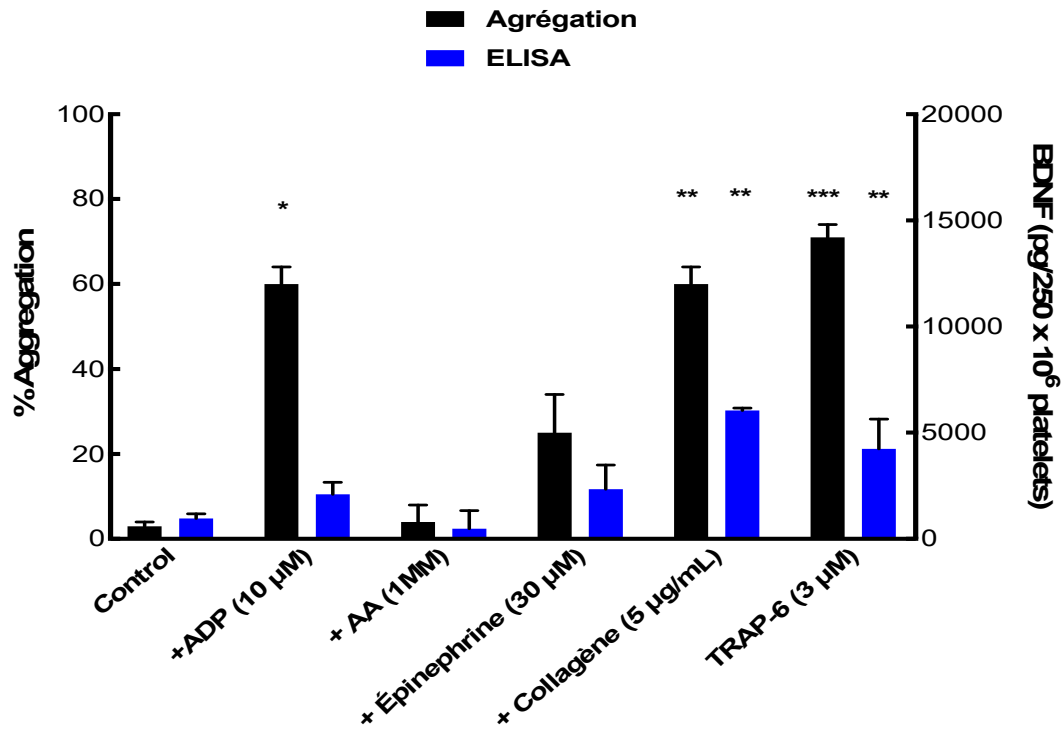


Figure 16: Dosage du BDNF en plasma de PRP par la méthode d'ELISA en présence des agonistes utilisés en fonction de l'agrégation plaquettaire chez les patients sous ASA. Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane \pm IQR, $n=7$ (test de Friedman, *** $p<0,0001$, ** $p<0,001$ & * $p<0,01$ vs Contrôle).

La figure 16 montre que l'ADP active les plaquettes des patients sous ASA et induit ainsi une agrégation forte (de l'ordre de 60%), accompagnée d'une faible libération du BDNF. Le collagène et le TRAP-6 induisent une agrégation significative et une libération plus importante de BDNF (6050 pg / 250 x 10⁶ plaquettes et 4237 pg / 250 x 10⁶ plaquettes) respectivement, en comparaison avec la condition contrôle (966 pg / 250 x 10⁶ plaquettes). L'épinephrine, en tant que sensibilisateur plaquettaire, induit une faible sécrétion non significative de BDNF. Comme ces patients étaient sous prise quotidienne et prolongée d'ASA, on s'attendait à ne pas avoir une activation des plaquettes suite à la stimulation avec l'AA. Les plaquettes semblent ne pas sécréter à leur tour le BDNF. Les patients sous

ASA relâchent moins de BDNF plaquettaire que les volontaires sains (Figure 15). Différentes variables peuvent expliquer cette faible sécrétion, à commencer par l'âge et le sexe ainsi que les maladies connexes des patients. On ne peut donc pas, au vu de ces résultats, conclure sur l'effet direct de ces variables, mais la prise de l'ASA est impliquée dans la diminution de la libération plaquettaire du BDNF.

6.4.2 Effet de la DAPT sur l'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire en présence de tous les agonistes chez les patients sous DAPT

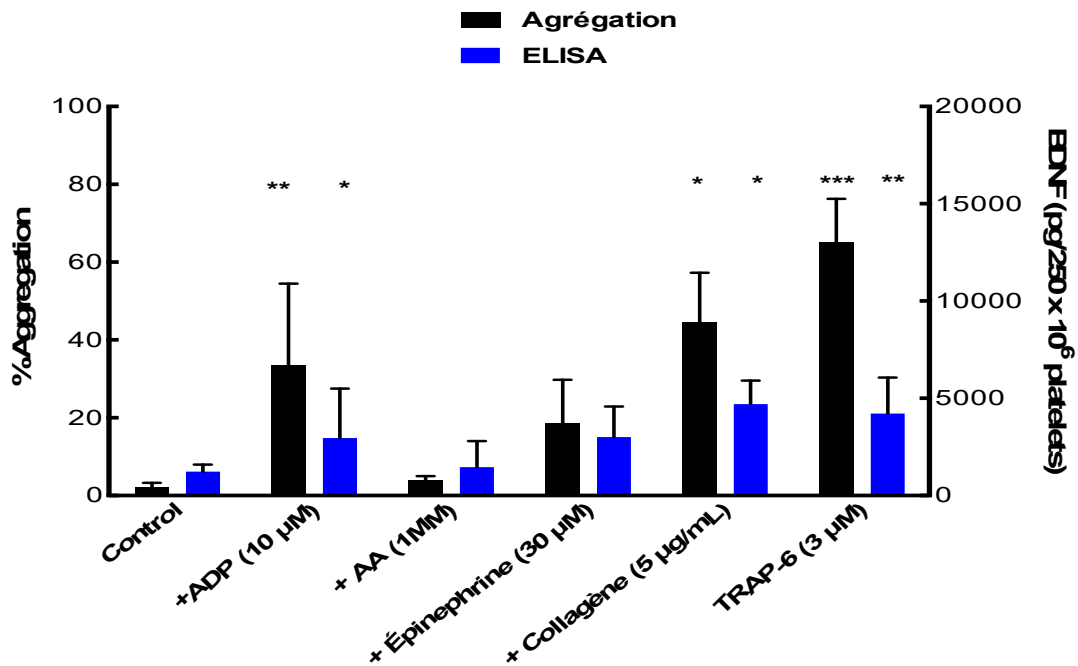


Figure 17: Dosage du BDNF en plasma de PRP par la méthode d'ELISA en présence des agonistes utilisés en fonction de l'agrégation plaquettaire chez les patients sous DAPT. Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane \pm IQR, n=6 (test de Friedman, ***p<0,0001, **p<0,001 & *p<0,01 vs Contrôle).

Chez les patients sous DAPT (Figure 17), la libération de BDNF est significativement augmentée seulement en réponse au collagène (4704 pg / 250 x 10⁶ plaquettes) et au TRAP-6 par rapport au contrôle (1239 pg / 250 x 10⁶ plaquettes) ce qui représente une concentration 4 fois plus importante que le niveau basal. À l'état basal (contrôle), le BDNF relâché reste faible et ceci est en accord avec l'agrégation qui est

faible. La stimulation des plaquettes avec l'AA et l'épinéphrine ne permet pas de constater une différence significative dans la sécrétion et l'agrégation. L'activation des récepteurs adrénergiques plaquettaires avec l'épinéphrine ne permet pas une augmentation de la quantité du BDNF libérée, et cela malgré la forte dose utilisée. La libération du BDNF chez les patients reste beaucoup plus faible que celle observée chez les volontaires sains dans la figure 15. Nous constatons que les résultats de la libération du BDNF chez les patients sous DAPT ressemblent au profil des patients sous ASA.

Finalement, on a utilisé le groupe des patients atteints de maladies valvulaires, sans traitements antiplaquettaires, comme un groupe contrôle pour la prise des antiplaquettaires par rapport à nos patients. Les mêmes expériences ont été reproduites chez ce groupe d'étude et les résultats sont présentés dans la figure 18.

6.4.3 L'agrégation et la libération du BDNF plaquettaire en présence de tous les agonistes chez les patients atteints de maladies valvulaires

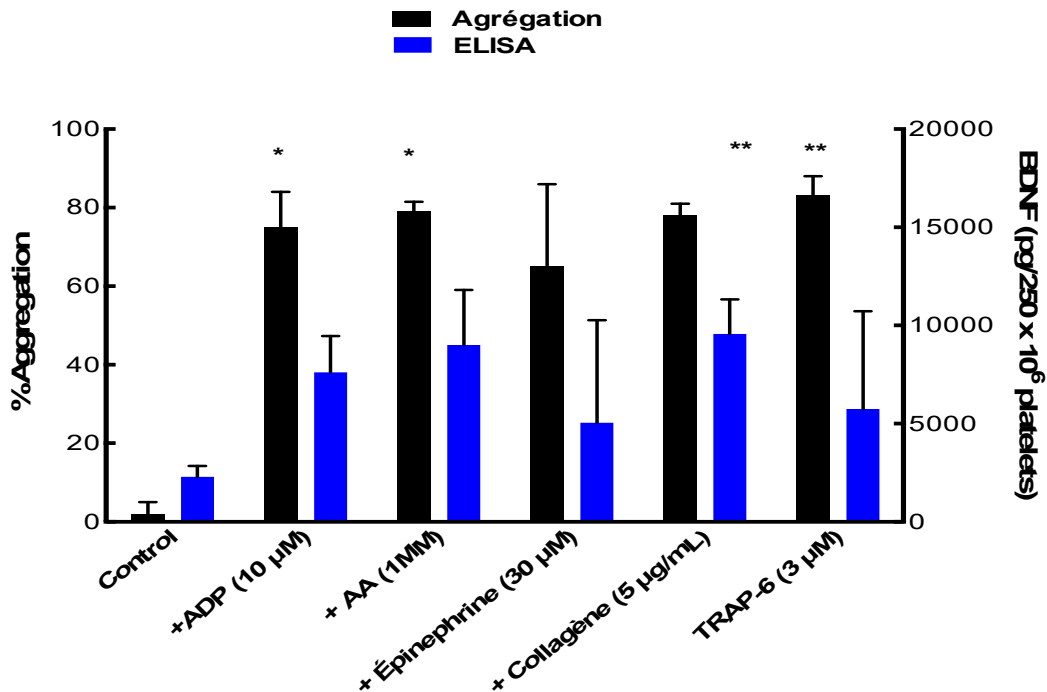


Figure 18: Dosage du BDNF en plasma de PRP par la méthode d'ELISA en présence des agonistes en fonction de l'agrégation plaquettaire chez les patients atteints de maladies valvulaires

Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane \pm IQR, n=5 (test de Friedman, ***p<0,0001, **p<0,001 & *p<0,01 vs Contrôle).

Chez les patients atteints de maladies valvulaires qui ne reçoivent pas un traitement antiplaquettaire (Figure 18), les agonistes utilisés ont tendance à augmenter la sécrétion du BDNF en comparaison avec la condition contrôle, mais ce résultat reste non significatif à l'exception du collagène (9565 pg / 250 x 10⁶ plaquettes). Les plaquettes de ces patients répondent normalement à tous les agonistes testés par une libération importante du BDNF, mais la non-significativité de l'augmentation observée est probablement due au nombre restreint des patients retenus après l'analyse des résultats (n=5). Le profil de la libération du BDNF est plus faible que celui des donneurs sains (Figure 15), mais reste plus élevé comparativement aux deux groupes de patients sous ASA (Figure 16) et DAPT (Figure 17).

La tendance de la libération du BDNF plaquettaire sous l'action des agonistes reste plus importante chez les volontaires sains que celle obtenue chez les patients avec des antiplaquettaires. Les résultats indiquent que les patients sous antiplaquettaires, que ce soit en monothérapie avec l'ASA ou en double thérapie, semblent moins sécréter le BDNF sous l'action des agonistes que chez les volontaires sains et les patients atteints de maladies valvulaires sans traitement antiplaquettaire tel que présenté dans les figures (14-18). Le niveau du BDNF à l'état basal (condition contrôle) chez les patients sous ASA (966 pg / 250×10^6 plaquettes) et sous DAPT (1239 pg / 250×10^6 plaquettes) représente environ deux fois moins la quantité du BDNF relâchée chez les volontaires sains (2627 pg / 250×10^6 plaquettes).

6.5 Les niveaux d'expression plaquettaire du BDNF chez les 4 groupes

Afin de vérifier l'objectif 3 de notre étude, qui est de comparer les niveaux d'expression du BDNF plaquettaire entre les volontaires sains et les patients atteints de maladies cardiovasculaires, nous avons procédé à l'analyse du BDNF exprimé dans les plaquettes non stimulées des patients et des volontaires sains par la technique de *western blot*. Lors d'une première étape, nous avons confirmé l'expression du BDNF dans les plaquettes de volontaires sains. Dans un deuxième temps, nous avons procédé à l'analyse de l'expression du BDNF au niveau des plaquettes des différents groupes. Ces résultats sont présentés dans la section ci-dessous.

6.5.1 L'expression du BDNF dans les plaquettes non stimulées des volontaires sains

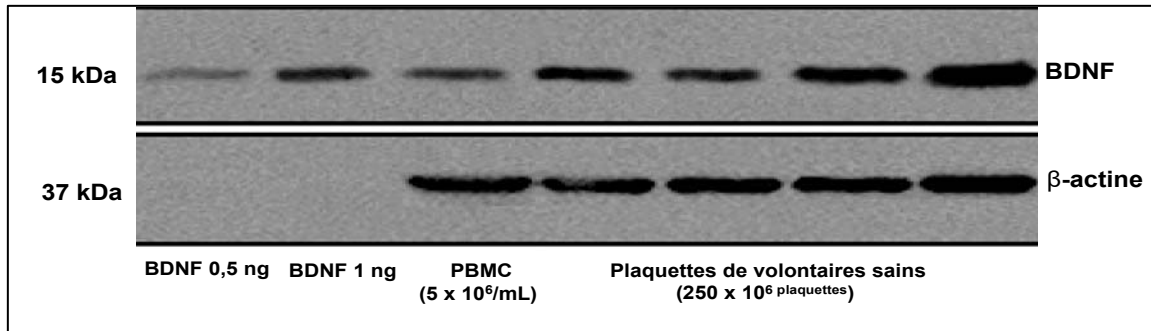


Figure 19: Gel représentatif de l'expression du BDNF au niveau des plaquettes lavées non stimulées provenant de quatre volontaires sains.

Le gel dans la figure 19 représente l'expression du BDNF dans les plaquettes ($250 \times 10^6/\text{mL}$) provenant de quatre donneurs sains en utilisant deux contrôles positifs, soit la protéine recombinante du BDNF commercialisée à deux concentrations (0,5 ng et 1 ng) et les PBMC à une concentration de $5 \times 10^6/\text{mL}$. La β -actine représente l'expression protéique totale. La bande d'intérêt du BDNF au niveau des PBMC était détectée au même niveau que les plaquettes lavées et la protéine recombinante. Ce résultat initial a permis de confirmer que le BDNF est présent dans les plaquettes¹¹ et que la bande d'intérêt correspond au poids moléculaire d'environ 15 kDa.

La partie suivante représente le niveau d'expression du BDNF dans les plaquettes des différents groupes d'étude.

6.5.1 L'expression du BDNF dans les plaquettes non stimulées des groupes étudiés

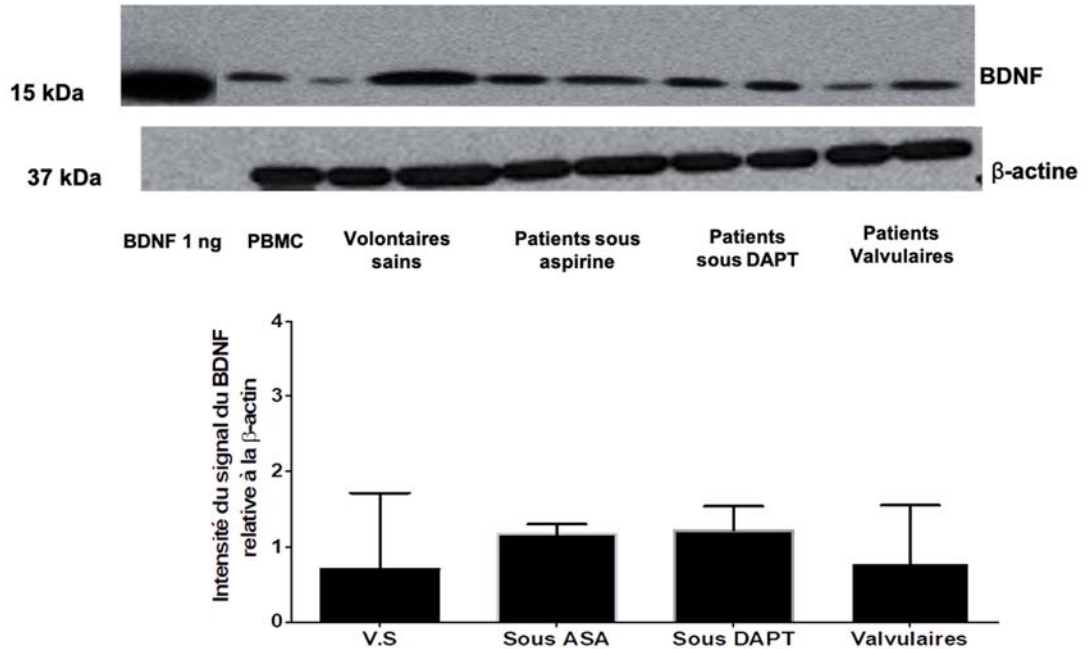


Figure 20: Expression du BDNF au niveau des plaquettes lavées chez les différents groupes expérimentaux.

(A) : Gel représentatif de l'expression du BDNF au niveau des plaquettes lavées chez les différents groupes expérimentaux. (B) : Quantification des niveaux d'expression du BDNF en présentant le rapport de l'intensité de la densité optique des bandes du BDNF en fonction de la β -actine.

Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane \pm IQR, test de Kruskal-Wallis/test de Dunn's, P : NS; volontaires sains n=7, ASA n=7, DAPT n= 6, valvulaires n=5.

Le gel de la figure 20 représente l'expression du BDNF dans les plaquettes ($250 \times 10^6/\text{mL}$) des volontaires sains et des patients cardiovasculaires en comparant avec deux contrôles positifs, soit la protéine recombinante du BDNF (1 ng) et les PBMC ($5 \times 10^6/\text{mL}$). Ce résultat montre que le BDNF est présent dans les plaquettes des patients sous thérapie antiplaquettaire et les patients atteints de maladies valvulaires avec une bande d'intérêt d'environ 15 kDa. Le niveau d'intensité des bandes étant différent entre les donneurs, nous avons vérifié s'il y avait une différence significative entre les niveaux d'expression intraplaquettaire de la protéine. L'histogramme représente la normalisation

de l'intensité des bandes du BDNF par rapport à celle de la β -actine pour tous les gels et pour chaque groupe. Aucune différence significative n'est observée entre les groupes; ce qui nous amène à suggérer que les traitements antiplaquettaires n'affectent pas le niveau d'expression du BDNF plaquettaire.

6.5.1 Étude de l'association entre le BDNF plasmatique et le décompte plaquettaire des différents groupes d'étude

Dans cette section nous nous sommes posé la question quant à l'origine du BDNF plasmatique en étudiant une possible association entre le décompte plaquettaire des volontaires et la quantité du BDNF à l'état basal (contrôle) quantifié par la technique de *western blot*. D'après les résultats présentés dans la figure 21, on a pu constater qu'il n'y a pas de relation entre les deux mesures, car l'association n'est pas présente. En considérant que les données ne sont pas significatives pour les quatre groupes, nous ne pouvons pas déduire que l'origine du BDNF est exclusivement plaquettaire.

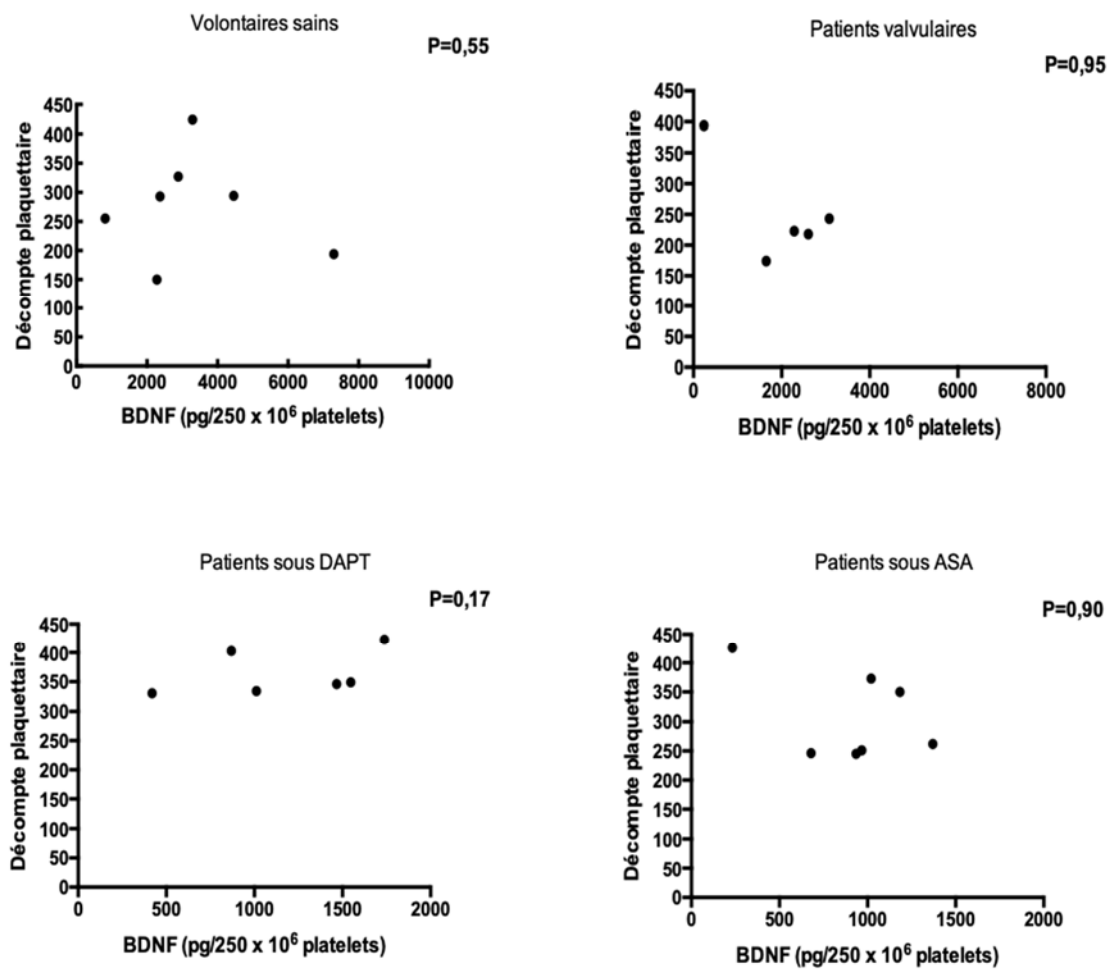


Figure 21: Corrélation entre le niveau plasmatique basal du et le décompte plaquettaire. Test de Spearman.

6.5.1.1. Association entre les niveaux du BDNF sous l'action du TRAP-6 et l'expression du BDNF dans les plaquettes des patients

Dans cette section, nous avons corrélé les niveaux intracellulaires de BDNF obtenus par *western blot* (une technique semi-quantitative) aux niveaux plasmatiques de BDNF à l'état stimulé au TRAP-6 (3 μ M) mesurés par ELISA (Figure 22). Nous observons que la quantité de BDNF relâchée n'est pas corrélée à la quantité de BDNF plaquettaire. L'analyse a été effectuée à une condition où la sécrétion a été induite par le TRAP-6, un puissant agoniste, où les niveaux de sécrétion semblent relativement maintenus chez les trois groupes (patients sous ASA, patients sous DAPT et patients atteints de maladies valvulaires), traitée ou non par les antiplaquettaires. Ce résultat ainsi que les deux résultats précédents supportent la conclusion que les antiplaquettaires altèrent la libération du BDNF et que son niveau d'expression initiale dans les plaquettes ne reflète pas forcément la quantité relâchée par celles-ci. Notons que l'association entre les niveaux de BDNF et son expression dans les plaquettes des patients a été étudiée avec tous les autres agonistes utilisés dans cette étude (résultats identiques à ceux du TRAP-6 et non inclus dans la thèse). Seulement les résultats sous l'action du TRAP-6 sont présentés ci-dessous.

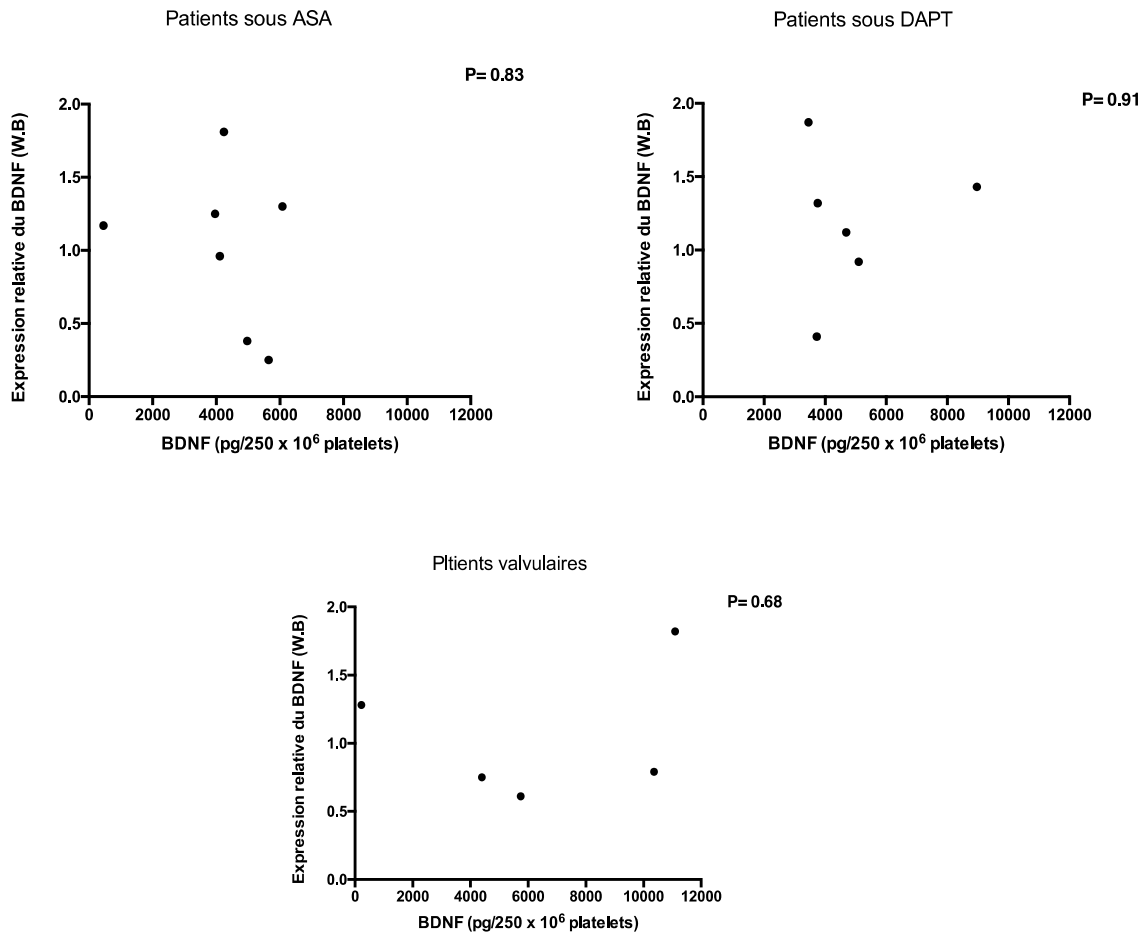


Figure 22: Corrélation entre les niveaux du BDNF relâchés sous l'action du TRAP-6 (3 μ M) et l'expression du BDNF au niveau des plaquettes isolées chez les patients. Test de Spearman.

Chapitre 7 : Effet du BDNF exogène sur les plaquettes

7.1 Le BDNF exogène n'a aucun effet sur l'agrégation plaquettaire chez les groupes étudiés

On se demande si le BDNF relâché physiologiquement au niveau vasculaire induit-il un effet en plasma et si c'est le cas quelle est la concentration du BDNF qui aurait un effet dans un modèle pathologique tel que la thrombose. D'après les résultats des tests d'agrégation en PRP de la figure 23, on a remarqué que le BDNF exogène à différentes doses (1 µg/mL, 3 µg/mL et 10 µg/mL) n'a aucun effet significatif sur l'agrégation en PRP des plaquettes des différents groupes.

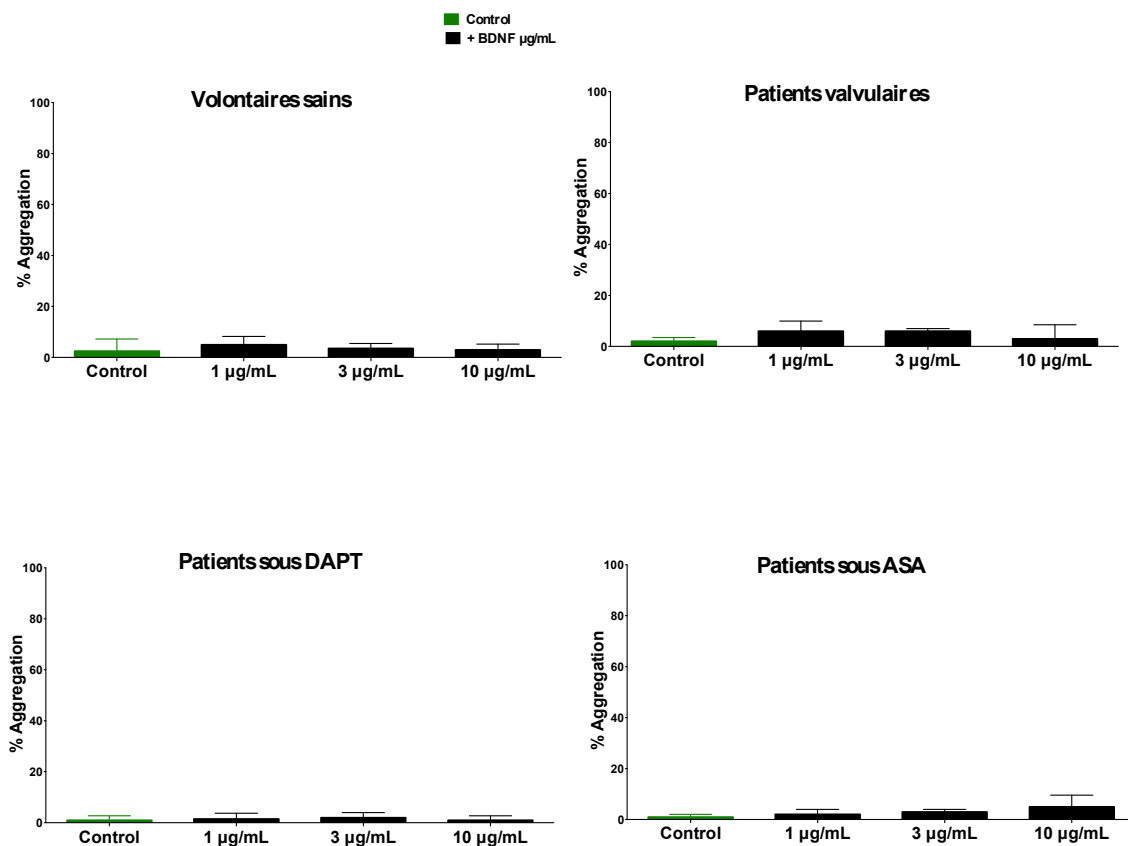


Figure 23: Agrégation optique en PRP chez les quatre groupes d'étude en présence du BDNF.

Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane ± IQR; volontaires sains et DAPT n=4, ASA et Valvulaire n= 5; test de Friedman, P: NS vs Control.

7.2 Le BDNF exogène n'a aucun effet sur l'agrégation plaquettaire chez les volontaires sains en synergie avec les différents agonistes

Lors de ces expériences, nous avons procédé par l'ajout du BDNF 5 minutes avant l'ajout de chaque agoniste sans agitation à température pièce. Nous avons choisi de vérifier cet effet en utilisant la dose intermédiaire du BDNF, car le résultat précédent (Figure 23) confirme que les trois doses de BDNF utilisées n'ont aucun effet au niveau du PRP. La figure 24 montre que la stimulation du PRP des volontaires sains en présence de la dose moyenne du BDNF exogène (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en combinaison avec les cinq agonistes plaquettaires à faible et à forte dose ne permet pas d'enregistrer une différence significative dans l'agrégation plaquettaire. Ce résultat indique que le BDNF n'a aucun effet synergique avec l'ADP (1 μM), l'épinéphrine (30 μM) et le TRAP-6 (3 μM), alors le collagène (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et l'AA (0.5 mM) nous ne pouvons pas confirmer ce résultat puisque l'agrégation est déjà maximale avec les faibles doses de ces agonistes chez les volontaires sains, mais pas chez les patients dans les sections suivantes.

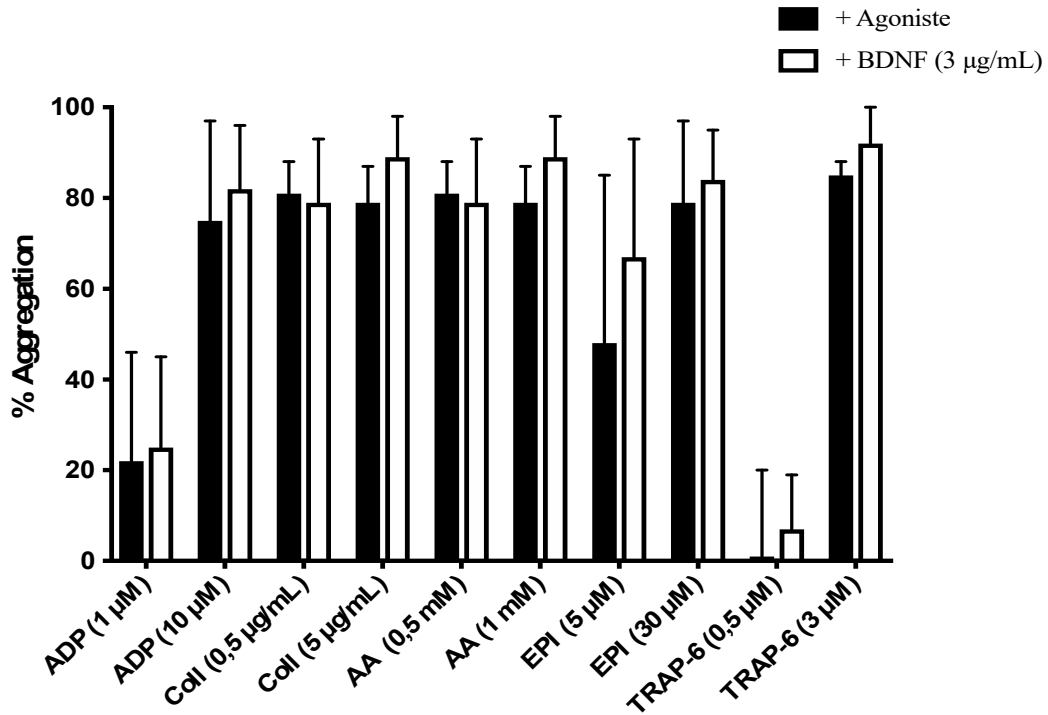


Figure 24: Agrégation optique en PRP en réponse au BDNF chez les volontaires sains en présence de différents agonistes.

Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane n=5, Two-way-ANOVA, P : NS).

La prochaine section vérifie l'effet du BDNF chez les patients sous Aspirine et les patients sous DAPT.

7.3 Le BDNF exogène n'a aucun effet sur l'agrégation plaquettaire chez les patients sous DAPT en synergie avec les différents agonistes

La figure 25 montre que la stimulation du PRP en présence du BDNF exogène ne permet pas d'enregistrer une différence significative dans l'agrégation plaquettaire, ce qui confirme le résultat précédent chez les volontaires sains (Figure 24).

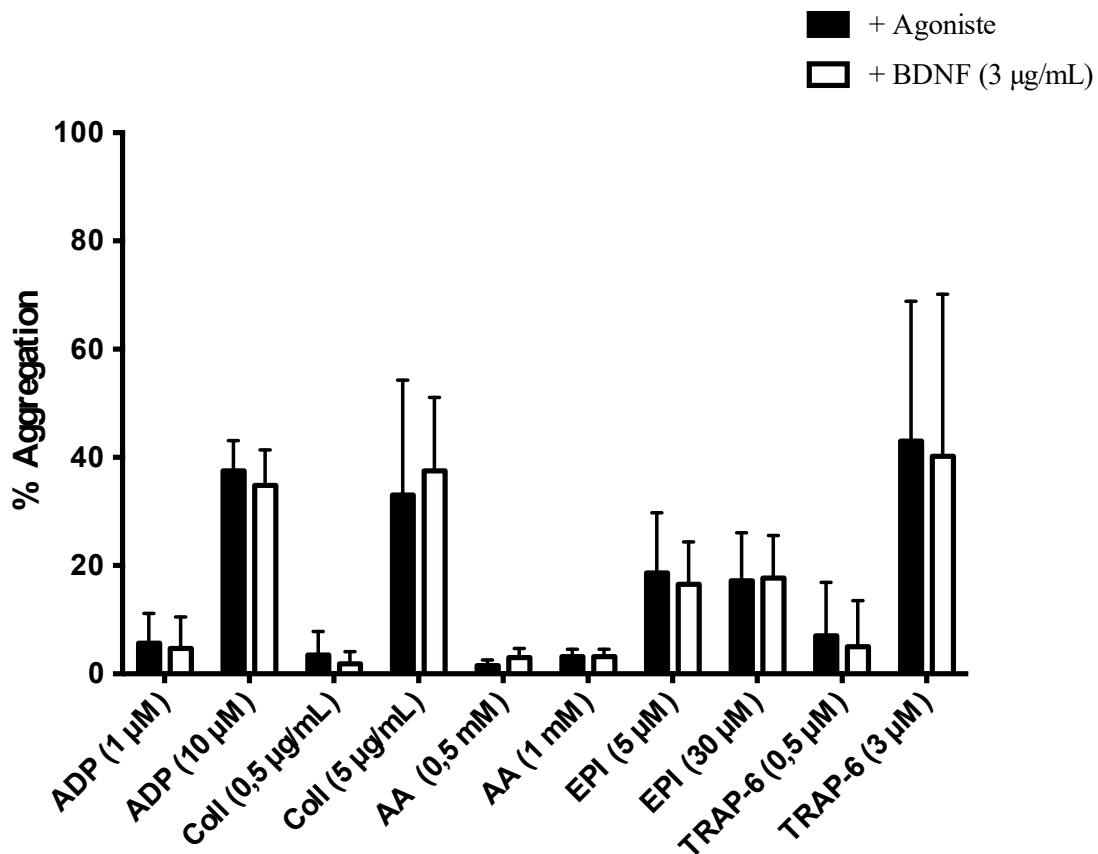


Figure 25: Agrégation optique en PRP en réponse au BDNF chez les patients sous DAPT en présence de différents agonistes.

Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane n=6, Two-way-ANOVA, P : NS).

7.4 Le BDNF exogène n'a aucun effet sur l'agrégation plaquettaire chez les patients sous aspirine en synergie avec les différents agonistes

La figure 26 montre que la stimulation du PRP en présence du BDNF seul ou en combinaison avec les agonistes ne permet pas d'enregistrer une différence significative dans l'agrégation plaquettaire chez les patients sous ASA. Sachant que la concentration utilisée est de l'ordre de 1000 fois supérieures à celle retrouvée en plasma, le BDNF exogène n'a aucun effet seul ou en combinaison avec les cinq agonistes utilisés à faible et à forte dose sur l'agrégation des plaquettes en PRP.

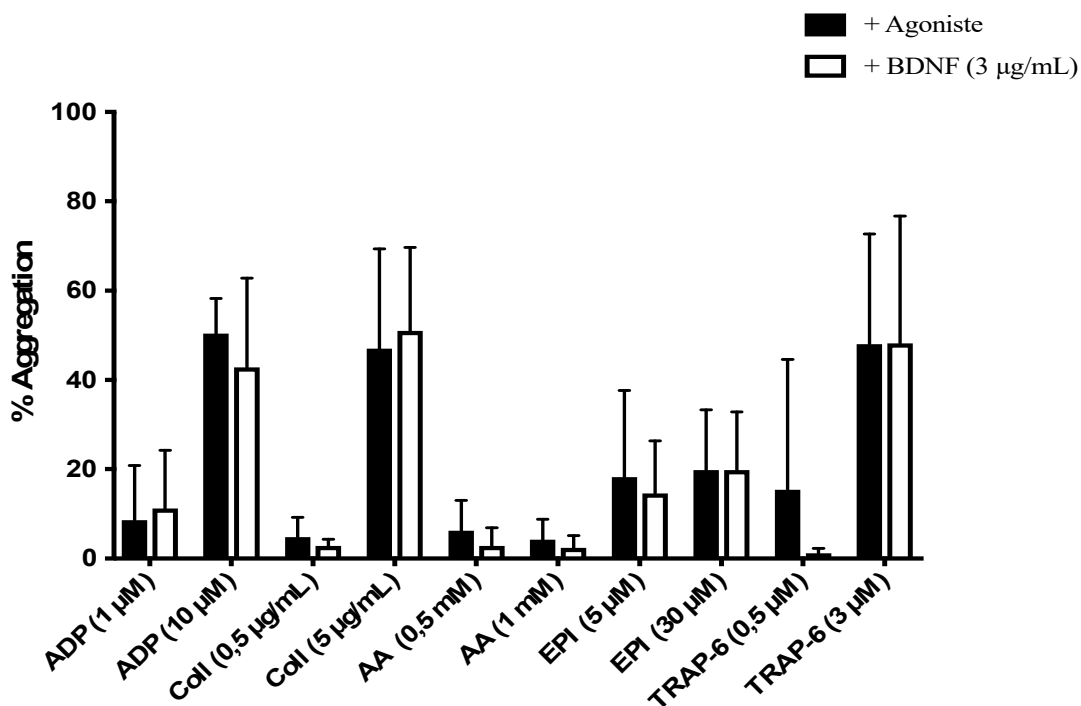


Figure 26: Agrégation optique en PRP en réponse au BDNF chez les patients sous aspirine en présence de différents agonistes.

Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane n=5, Two-way-ANOVA, P : NS).

Afin d'exclure l'interférence possible d'autres médiateurs plasmatiques avec le BDNF, nous avons voulu dans la prochaine section vérifier l'effet du BDNF exogène sur

les plaquettes isolées et lavées afin de vérifier si le même effet du BDNF enregistré dans le PRP se reproduirait ou non.

7.5 Le BDNF exogène active les plaquettes lavées chez les volontaires sains

Les plaquettes des volontaires sains ont été isolées et concentrées suivant un décompte de $250 \times 10^6/\text{mL}$ puis stimulées avec trois doses du BDNF recombinant (1 g/mL, 3 g/mL et 10 g/mL) ainsi que la condition basale (0 ou contrôle) où le BDNF n'a pas été ajouté. Les enregistrements des tests d'agrégation plaquettaire sont présentés dans la figure 27. D'après ce résultat, une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ était nécessaire pour induire une agrégation. On a remarqué que la présence de la forte dose du BDNF (10 g/mL) enregistre une agrégation significative de plus de 80% par rapport à la condition contrôle, ce qui montre que le BDNF active les plaquettes lavées de volontaires sains. L'effet du BDNF est caractérisé par trois phases : la première est la phase de latence prolongée (≈ 5 min, phase 1). Par la suite, il y a eu un changement de la forme et de la taille des plaquettes qui correspondent à la phase d'activation où les plaquettes s'activent et commencent à relâcher les médiateurs vasoactifs (phase 2). La troisième et dernière phase marque la phase d'agrégation irréversible où les plaquettes s'agrègent de façon ferme. Il s'agit d'une agrégation biphasique et irréversible qui nécessite une forte concentration de BDNF pour activer le récepteur par lequel la signalisation est déclenchée - ce qui suggère que le récepteur par lequel se transmet la signalisation du BDNF pourrait être exprimé au niveau des plaquettes. Le récepteur en question pourrait être le TrkB (la forme complète et/ou tronquée) ou encore un autre récepteur plaquettaire par lequel le BDNF signale au niveau des plaquettes. Nous ne pouvons pas nous prononcer quant au mécanisme d'action du BDNF à cette étape du projet de recherche.

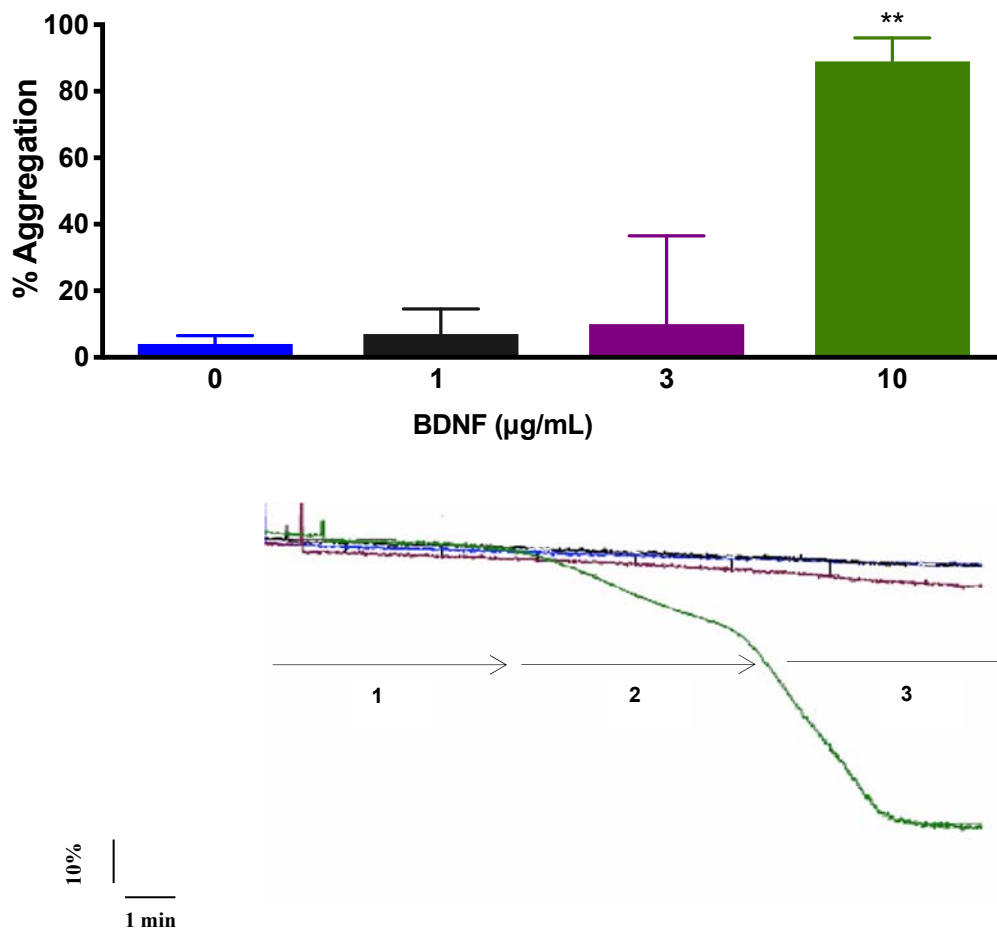


Figure 27: Agrégation optique en plaquettes lavées de volontaires sains.

La représentation du profil d'agrégation en présence du BDNF pendant 12 minutes. 1 : phase de latence, 2 : phase d'activation et 3 : phase d'agrégation. Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane \pm IQR, $n=5$, test de Friedman, $**p<0.001$ vs condition 0, 1 et 3).

Nous avons voulu par la suite vérifier si cet effet du BDNF sur l'agrégation des plaquettes lavées serait affecté par la présence des antiplaquettaires. La section suivante analysera cet effet.

7.5.1 Les antiplaquettaires renversent l'effet du BDNF exogène sur l'agrégation des plaquettes humaines lavées

En utilisant des antiplaquettaires en présence du BDNF au niveau des plaquettes lavées de volontaires sains isolées et préparées à une concentration de $250 \times 10^6/\text{mL}$, nous avons enregistré les données présentées ci-dessous.

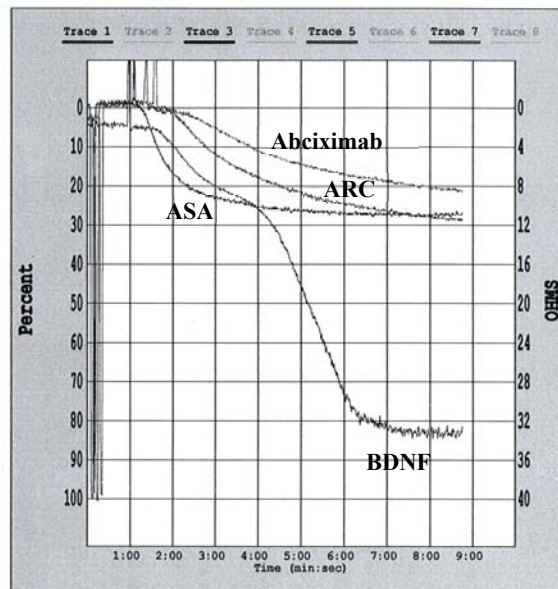
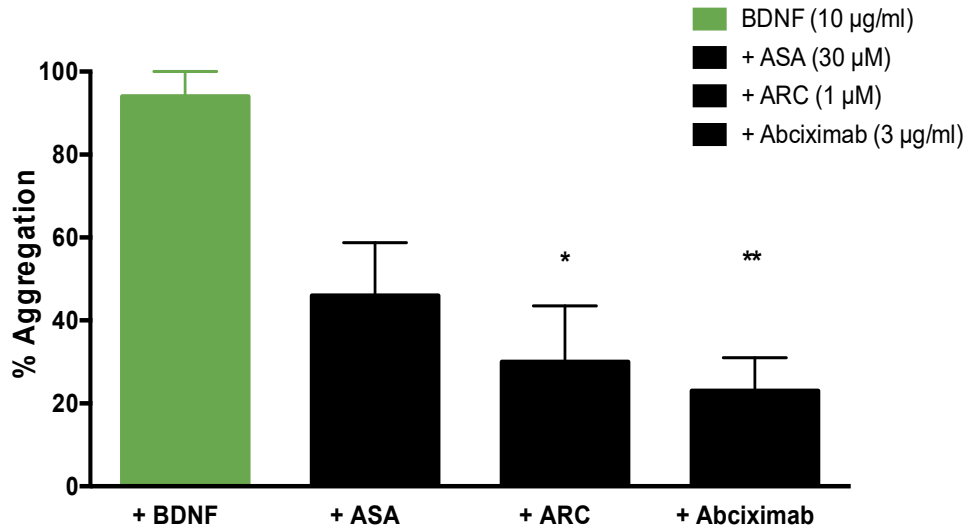


Figure 28: Agrégation optique des plaquettes lavées de volontaires sains en présence du BDNF et des antiplaquettaires.

Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane \pm IQR, $n \geq 4$, test de Krudkal-Wallis, $**p < 0.001$ & $*p < 0.01$ vs BDNF.

Comme le décrit la figure 28, le BDNF seul continu à induire une forte agrégation de l'ordre de 90% et cette dernière se trouve réduite significativement à 20-30% en présence de l'AR-C et de l'Abciximab. L'ASA à son tour diminue de 50% l'agrégation plaquettaire, mais ce résultat reste non significatif.

Dans la prochaine section, nous avons vérifié si le récepteur du BDNF, le TrKB, est présent au niveau des plaquettes humaines.

7.6 L'expression de la forme tronquée du récepteur TrKB au niveau des plaquettes des volontaires sains

La section suivante mettra en évidence le dernier objectif de ce projet de recherche qui vise à l'identification du récepteur TrKB au niveau des plaquettes isolées. Nous avons utilisé les protéines plaquettaires de 15 donneurs différents (5 donneurs/gel) afin de vérifier si les deux formes du récepteur TrKB (la forme tronquée et la forme complète) sont présentes au niveau des plaquettes. Si c'est le cas, nous devons trouver deux bandes de poids moléculaire d'environ 95 kDa et 145 kDa pour la forme tronquée et la forme complète, respectivement. Plusieurs essais ont été faits avant de mettre le protocole au point et les résultats des gels de *western blot* sont présentés dans la figure 29. Nous avons utilisé des lysats de PBMC de volontaires sains et de parenchyme de souris, comme contrôles positifs.

La figure 29 montre la présence des bandes à un niveau très proche des contrôles positifs à une hauteur proche de 95 kDa chez les plaquettes de différents volontaires sains, ce qui suggère que les plaquettes pourraient exprimer la forme tronquée du récepteur TrKB. Le gel a été chargé avec 15 µg de lysat de parenchyme de souris, des PBMCs de volontaires sains (35 µl provenant de 7.5×10^6 PBMCs/mL) et des plaquettes lavées (35 µl provenant de 10^7 plaquettes/mL) de 5 volontaires sains.

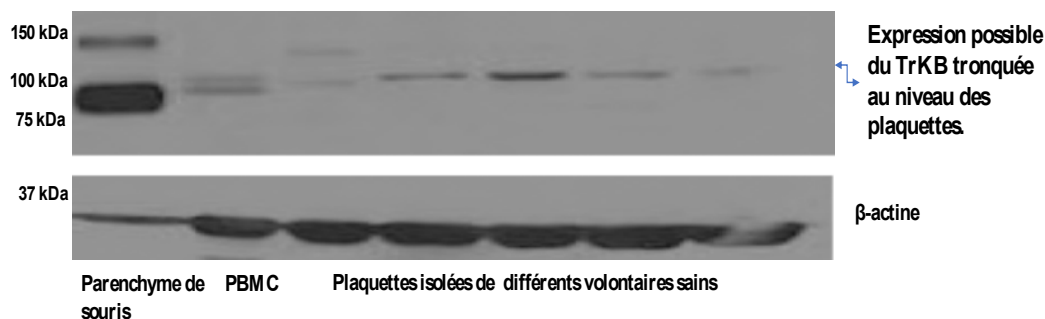


Figure 29: Gel représentatif suggérant l'expression du récepteur TrkB tronqué au niveau des plaquettes lavées de volontaires sains.

Notons que l'anticorps utilisé reconnaît les deux formes du récepteur TrkB, et que la séquence utilisée par la compagnie est une séquence 32-430, ce qui correspond à la partie extracellulaire du récepteur, accessible sur ce lien :

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q16620>

La question demeure sur la nature du récepteur plaquettaire du BDNF qui sera responsable de l'induction de l'agrégation au niveau des plaquettes lavées. La possibilité de l'expression de la forme complète du récepteur demeure possible. D'autres techniques telles que la microscopie confocale ou encore la cytométrie en flux seront très utiles pour vérifier l'expression des deux formes du récepteur TrkB. Les résultats présentés par Mme Imane Boukhatem, étudiante à la maîtrise au laboratoire de Dre Lordkipanidzé, en utilisant la technique de cytométrie en flux, montrent que la forme tronquée est exprimée au niveau des plaquettes ce qui renforce le résultat de la figure 29.

Nous avons voulu dans une dernière étape étudier l'effet des inhibiteurs pharmacologiques des récepteurs TrkB soient la cyclotraxine-B et le GNF 5837 sur l'activité plaquettaire en présence du BDNF. Cette partie sera présentée dans la section suivante.

7.6.1 Les kinases plaquettaires sont impliquées dans la signalisation du BDNF dans les plaquettes

Deux antagonistes ont été utilisés dans cette expérience au niveau des plaquettes lavées de volontaires sains et isolées à un décompte de $250 \times 10^6/\text{mL}$. La cyclotraxine-B est un modulateur allostérique des récepteurs TrkB; il s'agit d'antagoniste spécifique des

récepteurs TrkB par sa liaison aux sites qui ne sont pas critiques pour la liaison du BDNF. La cyclotraxine-B modifie la conformation du récepteur sans pour autant altérer la liaison du BDNF à son récepteur. Il a été rapporté que la concentration inhibitrice médiane de cette dernière est de 0,30 nM⁴⁰⁴. Le GNF 5837 est un puissant inhibiteur sélectif du récepteur TrkB qui agit par l'inhibition de l'activité des domaines kinases de celui-ci. La concentration inhibitrice médiane du GNF 5837 varie entre 8 et 9 nM⁴⁰⁵.

Le BDNF à 10 µg/mL agrège les plaquettes humaines de volontaires sains. Ce résultat appuie l'idée que la signalisation du BDNF au niveau des plaquettes puisse se réaliser *via* un récepteur spécifique au BDNF. Le résultat précédant (Figure 29) a montré une bande d'environ 95 kDa, compatible avec la présence d'une forme tronquée de TrkB dépourvue de son domaine tyrosine kinase. En parallèle à ce résultat, 1 µM de GNF-5837 et jusqu'à 5 µM de cyclotraxine-B n'ont eu aucun effet sur l'agrégation plaquettaire induite par le BDNF. Notons que les concentrations spécifiques de ces deux inhibiteurs n'ont aucun effet sur l'agrégation en réponse au BDNF (résultats non présentés). Notons qu'en continuité de ce projet au laboratoire (information tirée de la présentation de Mme Imane Boukhatem au centre de recherche de l'ICM), une concentration 10 fois plus élevée de cyclotraxine-B (50 µM) que celle utilisée dans ce projet a donné le même résultat présenté dans la figure 30.

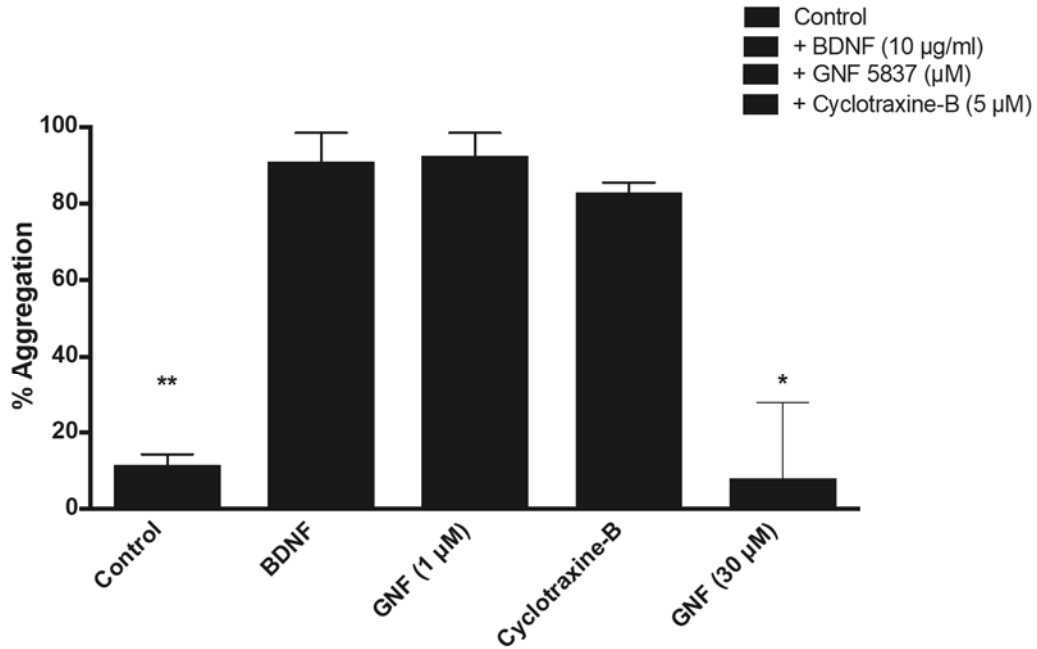


Figure 30: Agrégation optique des plaquettes lavées de volontaires sains en réponse au BDNF et en présence des inhibiteurs des récepteurs TrKB.

Les graphiques sont représentés en fonction de la médiane \pm IQR, test de Krudkal-Wallis, $n=6$, $**p<0.001$ vs BDNF et $*p<0.01$ vs BDNF).

L'agrégation induite par le BDNF a été abolie avec une concentration plus élevée de GNF-5837 (30 μ M) qui inhibe la plupart des kinases cellulaires. Comme la liaison des NTs aux domaines extracellulaires des récepteurs TrK au niveau du SNC provoque l'autophosphorylation de ces derniers au niveau de plusieurs sites de tyrosine et déclenche des signaux en aval impliquant les voies de transduction telle que la voie de PI3K et de PLC- γ (discuté dans le deuxième chapitre). Ceci suggère que des protéines kinases sont probablement impliquées dans la signalisation du BDNF au niveau des plaquettes et qui se trouvent inhibées en présence du GNF-5837. D'autres inhibiteurs pharmacologiques comme ceux des PKC ou encore de PLC seront utiles pour confirmer ce résultat. Cependant, le rôle physiologique du récepteur TrKB tronqué dans les plaquettes nécessite une étude plus approfondie.

Chapitre 8 : **Discussion**

L'effet bénéfique du BDNF au niveau du SNC a été validé depuis des années; mais des contradictions persistent sur son rôle au niveau périphérique. Le BDNF s'accumule à des concentrations beaucoup plus élevées dans les plaquettes en circulation que dans les neurones^{11, 346}. Cependant, l'origine du BDNF dans les plaquettes reste controversée. Récemment, il a été rapporté que l'origine du BDNF pourrait être les MK en raison de sa présence dans les MK dérivés de cellules souches humaines et dans les proplaquettes générées au laboratoire.¹² Ceci reste le seul résultat rapporté à l'heure actuelle et nécessite d'autres études afin de confirmer ou infirmer l'origine du BDNF circulant. Les plaquettes de souris sont dépourvues de BDNF de même que les MK, ce qui suggère une origine mégacaryocytaire³⁴⁷.

Les plaquettes activées libèrent le BDNF (Figures 14 et 15), ce qui le rend disponible dans le plasma et le sérum à des niveaux différents⁹. En réponse à certains stimulants comme la thrombine, et le collagène^{9 8} une libération significative du BDNF a été rapportée. Ceci est en accord avec les résultats présentés dans le chapitre 6, qui mettent en évidence la sécrétion importante du BDNF par les plaquettes en réponse à tous les agonistes plaquettaire utilisés chez les volontaires sains. Nous avons confirmé dans une première étape une forte abondance de BDNF dans les plaquettes de volontaires sains; comme cité plus haut, ce résultat est en accord avec la littérature publiée sur le sujet¹¹. D'après nos résultats d'ELISA, la quantité du BDNF libéré par les plaquettes stimulées représente 5 fois la quantité basale (condition en absence d'agoniste), ce qui confirme que l'activation est une étape nécessaire pour la libération du BDNF par les plaquettes. Cependant, notre étude n'a pas été planifiée pour déterminer la localisation du BDNF au niveau des plaquettes. En utilisant la microscopie électronique, l'équipe de Tamura et *al.*⁸ a confirmé la présence de BDNF dans les granules α , mais a également montré une distribution cytoplasmique. Après la stimulation des plaquettes, le BDNF stocké dans les granules α a été libéré, mais pas celui présent au niveau cytoplasmique. De plus, il a été rapporté que la libération maximale du BDNF est d'environ 30% à 40% après la stimulation des plaquettes et qu'une partie (environ 70%) est séquestrée au niveau du cytoplasme et n'est pas libérée⁹. Ainsi, il serait intéressant de vérifier par d'autres techniques si la totalité du BDNF a été libérée ou s'il est possible qu'une partie résiduelle soit restée prise au niveau

cytoplasmique. Dans le même ordre d'idée, les granules individuels qui se déplacent le long de microtubules de proplaquettes semblent être des vésicules avec un contenu hétérogène¹⁰³. En marquant les protéines au niveau des granules, il a été démontré que les protéines pro- et anti-angiogéniques sont séparées en sous-populations distinctes au niveau des granules α dans les plaquettes et les MK^{103 105}. Il pourrait y avoir des systèmes sélectifs inconnus dans les plaquettes qui livrent le BDNF exogène dans les granules ou le cytoplasme⁸.

L'impact des antiplaquettaires sur la libération du BDNF par les plaquettes n'a pas encore été identifié, malgré que les lignes directrices recommandent la prise quotidienne d'ASA chez tout sujet souffrant de maladie coronarienne stable⁴¹². D'autres indications s'imposent chez les patients avec un SCA qui sont à risque thrombotique élevé et où les lignes directrices recommandent l'ajout d'un antagoniste des récepteurs P2Y₁₂ pendant 12 mois^{413 414}. Sachant qu'il s'agit d'une quantité élevée du BDNF emmagasiné au niveau des plaquettes et qu'il possède un effet dans le système cardiovasculaire³⁴, il est intéressant de vérifier l'effet des antiplaquettaires sur la libération du contenu plaquettaire du BDNF.

La liaison du fibrinogène au domaine extracellulaire de l'intégrine α IIb β 3 activée stimule une augmentation rapide de l'activité des membres de la famille des kinases. Ces événements sont nécessaires au déclenchement de la signalisation et à l'agrégation irréversible⁴¹⁵. Cette signalisation varie selon le degré d'association des intégrines au niveau de la membrane et elle implique le recrutement et/ou l'activation de différentes protéines effectrices⁴¹⁶. D'après nos résultats, tous les antiplaquettaires utilisés inhibent la sécrétion du BDNF avec différents niveaux d'inhibition. L'Abciximab bloque de façon non compétitive son récepteur l'intégrine α IIb β 3, entraînant une modification de sa conformation et inhibe l'agrégation et la sécrétion plaquettaires chez les volontaires sains, et ce, de manière significative en réponse à tous les agonistes testés, à l'exception de l'AA où la sécrétion est environ 3 fois moins que la condition avec l'agoniste seul, mais ce résultat est non significatif. Cette signalisation *outside-in signaling* de l'intégrine α IIb β 3 s'avère importante dans la libération du BDNF, car l'ajout de l'Abciximab inhibe sa sécrétion telle que montrée dans la figure 15 du chapitre 6. Cependant, il a été suggéré que les plaquettes pourraient stocker le BDNF par internalisation. Bien qu'à ce jour aucun récepteur propre au BDNF ne soit identifié au niveau des plaquettes^{14, 417}, ce qui amène à

penser que d'autres récepteurs pourraient entrer en jeu. Ceci montre dans un premier temps que la sécrétion du BDNF pourrait dépendre d'un mécanisme de signalisation impliquant la signalisation du récepteur $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ou encore les mêmes voies de signalisation intracellulaires sous-jacentes.

Quand bien même que le niveau d'inhibition de la sécrétion en présence des antiplaquettaires était différent d'un agoniste à un autre (et cela au vu des diverses voies d'activations plaquettaires ciblées), les antiplaquettaires utilisés réduisaient la relâche du BDNF. Dès lors, on peut supposer que le BDNF soit localisé dans différents types de granules plaquettaires, dépendamment de la voie de signalisation responsable de sa libération; une telle localisation pourrait être identifiée par microscopie électronique. Tout bien pesé, ces dernières suggestions nous conduisent à émettre l'hypothèse suivante : la différence dans le niveau de sécrétion du BDNF suite à l'inhibition plaquettaire se traduirait par une localisation différentielle du BDNF au niveau des différents compartiments à l'intérieur des plaquettes.

Comme démontré dans la figure 15, la relâche de BDNF est inhibée par les agents antiplaquettaires. En reproduisant l'effet des antiplaquettaires *in vitro* chez les volontaires sains en réponse à l'ADP, on a remarqué une inhibition significative par l'AR-C en présence de l'ADP, l'AA, le collagène et l'épinéphrine. L'effet de l'ASA dans l'inhibition de la relâche de BDNF est significatif en réponse à l'épinéphrine et au TRAP-6. En ce qui concerne l'Abciximab, il réduit significativement à son tour la libération du BDNF en réponse à tous les agonistes utilisés à l'exception de l'AA. L'agrégation semble suivre la sécrétion du BDNF à des niveaux de signification proches. Tous les antiplaquettaires utilisés inhibent significativement la libération du BDNF. En résumé, les données obtenues chez les donneurs sains nous permettent de conclure que les antiplaquettaire inhibent la relâche du BDNF et que le niveau de cette inhibition dépend de la nature de l'antiplaquettaire ciblé ainsi que de la voie de signalisation impliquée. Or, il a été démontré que les antidépresseurs augmentent le niveau de BDNF⁴¹⁸, et ce contrairement aux effets des antiplaquettaires qui diminuent la relâche de ce dernier.

En ce qui concerne les patients, les figures présentées (6.4.1, 6.4.2 et 6.4.3) montrent aussi une sécrétion du BDNF par les plaquettes stimulées, mais avec un profil moins important que celui des patients sous antiplaquettaires ou chez les patients atteints de maladies valvulaires. D'après le tableau I rapportant les caractéristiques des participants, nous remarquons la présence des patients présentant des maladies connexes comme le diabète et l'hypertension artérielle. Dans ce contexte, certaines études ont montré une altération des niveaux de BDNF sous l'effet des médicaments antidiabétiques *in vitro*^{419, 420 421}. De plus, il a été rapporté que les niveaux de BDNF sérique étaient significativement plus faibles chez les patients atteints de diabète de type 2 avancé par rapport aux sujets sains. Concernant les niveaux du BDNF plasmatique, le même résultat était aussi remarqué. Il existe actuellement des données contradictoires sur l'association du BDNF et le métabolisme du glucose^{417, 422, 423}. Une étude rétrospective³⁶² sur 91 patients atteints de diabète de type 2 et sous antiplaquettaire (ASA à 75 mg/jour) pour la prévention primaire ou secondaire après IM, a montré que la concentration sérique modifiée du BDNF pouvait être au moins en partie liée à l'hyperréactivité plaquettaire et à l'inflammation chez ces patients. Différents facteurs peuvent influencer les taux du BDNF tels que l'âge, le sexe et les maladies connexes^{348, 362}. Les niveaux du BDNF libéré sont variables et peuvent donc dépendre de la nature de la maladie et de son avancement. Dans notre projet de recherche, les volontaires sains étaient plus jeunes (une moyenne de 36 ans) que les autres groupes (une moyenne de 65 ans). Notons que la taille d'échantillon ne nous permet pas de nous prononcer sur la relation entre l'âge et la relâche du BDNF, néanmoins nous pensons que l'âge devrait faire partie des variables à vérifier pour mieux comprendre la différence de la sécrétion du BDNF intraplaquettaire en plus de l'effet additif des antiplaquettaires. Comme il s'agit d'une étude pilote qui investiguera l'effet des antiplaquettaires sur la sécrétion du BDNF, nous pensons que d'autres études cliniques d'envergure seront cependant nécessaires afin d'évaluer l'impact de la prise des antiplaquettaires en continu sur les concentrations du BDNF en circulation.

De plus, le BDNF est libéré lors de la dégranulation plaquettaire, car une corrélation positive a été rapportée entre le BDNF et un marqueur granulaire, à savoir le *Transforming growth factor beta 1* ainsi que la P-sélectine soluble chez les patients avec un IM³⁵⁰. Dans

le même ordre d'idée, l'observation de l'équipe de Stoll³⁹² *et al.*, montre des concentrations réduites de BDNF dans le sérum de 24 volontaires après une dose de charge unique (600 mg) de Clopidogrel, mais pas après l'aspirine (500 mg). Ceci pourrait être expliqué par le fait que le Clopidogrel inhibe l'activation des plaquettes en agissant sur le récepteur P₂Y₁₂, qui est activé par l'ADP. Cependant, nos résultats sont en partie en accord avec ces observations, à savoir que les antiplaquettaires qui agissent au niveau du récepteur de l'ADP ont diminué la sécrétion du BDNF, ce qui a été contrevérifié par les résultats chez les volontaires sains où l'ajout de l'AR-C a diminué la sécrétion du BDNF. Concernant l'ASA, nos résultats montrent qu'il y a eu aussi une influence à la baisse de la quantité du BDNF relâché. Notons que parmi les limites de l'étude de Stoll³⁹² *et al.*, le choix du test utilisé qui est reconnu comme étant insensible aux effets de l'ASA et du Clopidogrel^{393, 394} ainsi que le faible nombre des patients inclus dans l'étude.

De plus, deux anti-inflammatoires non stéroïdiens (ibuprofène et indométacine) ont été utilisés avec ou sans calcium afin d'étudier la libération du BDNF par les plaquettes chez le rat. Il a été conclu que seul l'ibuprofène avait affecté la libération du BDNF, mais uniquement lorsque le calcium était présent. L'influence des anti-inflammatoires sur la libération du BDNF diffère selon le type de médicament, la dose et même la période d'incubation³⁸⁹. Il a été proposé que l'ibuprofène réduit la libération du BDNF par les granules de manière calcium-dépendante en inhibant la COX. Ceci est en accord avec nos résultats montrant que l'ASA influence la quantité du BDNF libérée par les plaquettes. Ceci confirme que la nature, la dose ainsi que la méthode utilisée influencent la quantité du BDNF relâchée par les plaquettes.

Les niveaux sériques du BDNF sont faibles chez les patients avec un SCA, ce qui pourrait expliquer la variation de sa quantité lors de ce type de pathologie. Or, l'équipe d'Ejiri *et al.*³⁸¹ a signalé une expression élevée du BDNF au niveau des plaques athérosclérotiques. Bien que les causalités et les mécanismes restent méconnus actuellement, il est possible que la dynamique de la libération du BDNF soit dérégulée chez les patients avec un SCA, ce qui modifie ainsi les taux sériques. Les patients avec des vaisseaux sains et une faible prédisposition thrombotique peuvent avoir tendance à conserver le BDNF stocké dans leurs plaquettes, augmentant ainsi le taux sérique du BDNF. Nos résultats montrent que les plaquettes stimulées des patients sous traitement

antiplaquettaires relâchent moins de BDNF que les plaquettes des volontaires sains et des patients atteints de maladies valvulaires. Les volontaires sains et les patients atteints de maladies valvulaires relâchent environ (≈ 12604 pg / 250×10^6 plaquettes, ≈ 9565 pg / 250×10^6 plaquettes) respectivement, de BDNF alors que chez les patients sous ASA (≈ 6050 pg / 250×10^6 plaquettes) et chez les patients sous DAPT (≈ 4704 pg / 250×10^6 plaquettes) les taux de BDNF relâchés sont plus faibles (Figures 14-18). Puisque le BDNF est retenu par les plaquettes plutôt que libéré dans les artères, il sera mal exprimé dans les parois des vaisseaux et ne pourra pas agir contre la progression de la maladie. Cependant, si un patient présente des plaquettes hyperréactives ou des lésions étendues des vaisseaux, le BDNF aura tendance à s'échapper des plaquettes, soit par adhésion plaquettaire chronique, mais faible, soit par des événements thrombotiques répétés autour du site de la lésion. En conséquence, les taux plasmatiques du BDNF chuteraient, tandis que les taux du BDNF dans et autour de la plaque augmenteraient, accroissant ainsi l'activité des MMPs et favorisant la progression et la vulnérabilité de la plaque. Cette interprétation pourrait expliquer la présence d'une quantité importante du BDNF au niveau des artères athérosclérotiques rapportée par les résultats de l'équipe d'Ejiri *et al.*³⁸¹, mais ne confirme pas un effet athérogène du BDNF.

Nos résultats ne montrent aucune association entre le décompte plaquettaire et l'expression du BDNF dans les plaquettes non stimulées, ni entre les quantités du BDNF relâché et son expression au niveau basal. D'un côté, à travers nos résultats d'associations nous avons remarqué que la différence entre l'expression du BDNF intraplaquettaire entre les groupes n'est pas significative, donc la quantité initiale du BDNF semble être la même chez les patients, laissant suggérer que les antiplaquettaires aient un effet sur la relâche et non sur l'expression intraplaquettaire d'après la figure 19. D'un autre côté, la corrélation entre l'expression du BDNF à l'état basal et sa libération sous l'action du TRAP-6 ne permet non plus de conclure qu'il y a une relation entre l'expression initiale du BDNF et la quantité relâchée de celui-ci. Dans une autre étude, la concentration plasmatique de BDNF chez les volontaires sains était corrélée avec le nombre de plaquettes. Cependant, chez les patients avec une maladie coronarienne, une telle corrélation n'a pas été observée. Il a été conclu qu'une activation plaquettaire plus faible conduirait par conséquent à une libération moins importante de BDNF, probablement associée à un effet antiplaquettaire⁴²⁴.

Il serait pertinent de soulever que les différents kits ELISA qui sont disponibles en commerce pour mesurer le BDNF humain pourraient donner des valeurs différentes lorsque les mêmes échantillons sont testés⁴²⁵. Une étude récente⁴²⁶ mettant en évidence une faible corrélation entre le BDNF sérique et le décompte plaquettaire chez 259 volontaires sains montre que des cohortes relativement importantes (un groupe d'une quantité de 60 personnes est nécessaire pour détecter un changement de 20%) sont nécessaires pour identifier une différence significative de la puissance statistique. Le manque de la puissance statistique pourrait être dû au faible nombre de participants dans ce projet et pourrait expliquer nos résultats d'associations. Toutefois, il a été rapporté qu'il y avait une corrélation positive entre les taux plasmatiques du BDNF et le décompte plaquettaire chez les patients souffrant d'une angine de poitrine (avec un nombre de patients plus important que celui présenté dans notre projet)³⁵⁴, ce qui s'accorde avec une autre étude⁴²⁷ ayant rapporté que le décompte plaquettaire est un important prédicteur des concentrations plasmatiques du BDNF. Notons qu'il a été observé que les niveaux de BDNF dans le sérum étaient affectés par le temps de coagulation, tandis que les niveaux de BDNF plasmatiques étaient influencés par la méthodologie. Le BDNF sérique et plasmatique semble refléter deux pools différents de BDNF⁴²⁸. Il semble que plusieurs variables méthodologiques pourraient influencer les résultats d'analyse et créer une grande variabilité inter-études³⁸⁹.

Pour induire leurs effets biologiques, les plaquettes peuvent compter sur la sécrétion granulaire, où leurs actions paracrines et autocrines pourraient être plus importantes. Dans un contexte pathologique telle la thrombose, les plaquettes pourraient libérer le BDNF qui peut agir sur les plaquettes voisines dans une boucle de renforcement positive, ou sur les cellules vasculaires qui expriment les récepteurs TrKB. La possibilité de générer des concentrations très élevées en circulation est possible. De plus, le BDNF se retrouve sous forme de monomère ou de dimère^{245, 246} et l'activité du BDNF sous forme de monomère est plus faible que la forme dimérique²⁴³, ce qui suggère qu'une biodisponibilité importante au niveau vasculaire permette au BDNF d'effectuer ses rôles de façon plus stable. Les concentrations utilisées dans ce projet (1, 3 et 10 µg/mL) sont amplement supérieures au BDNF sécrété et analysé par ELISA dans le chapitre 6. Elles sont bien supérieures à celles nécessaires à la survie neuronale *in vitro*³⁴¹, d'où la pertinence de tester une large concentration de BDNF exogène en PRP et en plaquettes lavées et isolées. Dans ce

contexte, nous avons voulu connaître la nature de cette NT une fois en circulation, et comprendre comment elle influence la fonction plaquettaire. La stimulation par le BDNF exogène n'avait aucun effet en PRP chez tous les participants.

Comme la demi-vie plasmatique du BDNF est de quelques minutes, ceci implique qu'un seuil de concentration devrait être atteint avant qu'une réaction cardiovasculaire puisse être déclenchée. Ceci nous rappelle le profil du fibrinogène plaquettaire qui est libéré dans la circulation par les plaquettes, et que les variations des concentrations de cette protéine ont une incidence sur l'agrégation plaquettaire. Or, sa libération n'implique pas obligatoirement l'activation de son récepteur, soit le $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et la formation d'un thrombus^{175 429}. Ceci montre un effet protecteur et que, dans un contexte pathologique, le BDNF serait plutôt thromboprotecteur. L'étude de *Framingham Heart Study* confirme que les taux sériques élevés du BDNF sont protecteurs, indiquant ainsi un rôle biologique important de celui-ci³⁸⁷. Les résultats actuels et antérieurs suggèrent un rôle protecteur du BDNF dans la pathogenèse de la maladie coronarienne⁴³⁰.

Compte tenu des rôles bénéfiques du BDNF cités dans le chapitre 2 de cette thèse, il est possible que sa présence au niveau des plaquettes avec des quantités importantes puisse avoir un effet protecteur une fois en circulation. Sa sécrétion chez les patients pourrait être modulée par les antiplaquettaires dans le but d'être plus efficace une fois libéré par les plaquettes. Une libération programmée du BDNF par les plaquettes lors d'une brèche vasculaire serait donc plus efficace. Notons qu'une attention particulière a été portée aux effets antioxydants et proangiogéniques du BDNF par les auteurs, car des preuves récentes suggèrent que le BDNF joue un rôle cardioprotecteur en favorisant l'activation des enzymes impliquées dans la protection contre l'hypoxie et le stress oxydatif comme cité au niveau du dernier chapitre de l'introduction. Actuellement, des données récentes soutiendraient l'utilisation potentielle du BDNF comme biomarqueur de la maladie cardiovasculaire, car il a été démontré que des faibles niveaux de BDNF conduirait à la formation d'un thrombus plus important *in vitro*³⁵⁸. Cette hypothèse doit être validée par d'autres études et fera donc l'objet de futures investigations afin de déterminer le rôle physiologique de tels niveaux de BDNF plaquettaire.

Nous avons étudié par la suite si le BDNF pouvait avoir un effet sur les plaquettes lavées et isolées de volontaires sains. Nous avons trouvé que le BDNF exogène avait induit

une agrégation complète, biphasique et irréversible des plaquettes suggérant la présence d'un récepteur spécifique à celui-ci au niveau des plaquettes.

D'après les résultats en PRP et en plaquettes lavées, il est raisonnable de penser que des protéines plasmatiques sont impliquées dans la réduction de la biodisponibilité du BDNF circulant. On pense que le BDNF serait séquestré par des protéines plasmatiques ce qui altère sa capacité à agir au niveau de son récepteur pour induire une agrégation. Il semble qu'il existe un système régulateur au niveau du plasma qui régulerait la biodisponibilité du BDNF pour interagir avec les plaquettes, assurant ainsi un mécanisme thromboprotecteur en cas d'activation plaquettaire inappropriée. Les facteurs qui influencent l'inhibition ou la séquestration du BDNF au niveau du plasma ne sont pas présents au niveau des plaquettes lavées, d'où l'effet prononcé du BDNF au niveau des plaquettes, car l'accès au récepteur du BDNF est beaucoup plus facile. Cette hypothèse reste tout de même à valider dans les études futures.

Pour nous assurer que les plaquettes étaient effectivement activées, nous avons testé l'influence de la thérapie antiplaquettaire sur l'agrégation plaquettaire induite par le BDNF. Nous avons confirmé que les plaquettes n'agglutinaient pas passivement, mais qu'elles étaient sensiblement activées et agrégées en présence de la forte dose du BDNF. En présence des antiplaquettaires, il y a eu une inhibition en réponse au BDNF. L'agrégation *via* le récepteur α IIb β 3 ainsi que le récepteur P2Y₁₂ était significativement réduite. L'inhibition des médiateurs secondaires avec les antiplaquettaires a entraîné une suppression de la vague d'agrégation secondaire (diminution des niveaux d'agrégation), mais les réponses primaires, c'est-à-dire le changement de forme et l'activation faible et réversible des plaquettes, ont été maintenues renforçant encore plus la probabilité de la présence du récepteur TrKB au niveau des plaquettes. Ce résultat original n'a jamais été testé ni démontré dans les études publiées à l'heure actuelle; il s'agit du premier résultat qui met en évidence que le BDNF active les plaquettes.

Pour exercer ses actions, le BDNF mature se lie principalement au récepteur TrKB, ce qui provoque sa dimérisation et son activation en aval⁴⁰⁹. L'autophosphorylation des résidus tyrosine active des voies en aval comprenant la voie MAPK et la voie PI3K, ce qui favorise la survie neuronale²⁹². Nous avons étudié la présence de ce récepteur au niveau des plaquettes. D'après nos résultats, nous avons identifié une nouvelle forme de récepteur

qui semble correspondre au poids moléculaire de la forme tronquée, soit ≈ 95 kDa. Ces résultats remettent en cause l'hypothèse déjà vérifiée par les auteurs qui suggèrent que les plaquettes n'exprimeraient pas les récepteurs TrKs, mais restent cohérentes avec l'idée que les plaquettes aient deux sortes de récepteurs de forte et de faible affinités capables de provoquer une signalisation intra-cellulaire⁹, ce qui pourrait donc présenter la forme tronquée et la forme complète de TrKB. Les MKs expriment la forme tronquée du TrKB; or, d'après les récentes hypothèses, le BDNF pourrait provenir des MK. Ainsi la forme tronquée du récepteur TrKB pourrait également être héritée lors de la maturation plaquettaire. Toutefois, il a été démontré que les plaquettes étaient dépourvues de récepteur TrKB^{15 431 8 12}. D'après les résultats présentés au niveau du chapitre 7, nous avons montré que le BDNF pourrait induire une agrégation plaquettaire complète et biphasique (présentée dans la figure 27) dans les plaquettes humaines lavées de volontaires sains. Le GNF5837 est un inhibiteur du domaine kinase du récepteur qui n'a aucun effet sur l'agrégation en réponse au BDNF à des concentrations élevées (les concentrations de l'ordre de nM n'ont aucun effet sur l'agrégation, ces résultats ne sont pas présentés). L'utilisation d'une concentration trop élevée (30 μ M), a significativement diminué l'agrégation plaquettaire induite par le BDNF. D'après ce résultat, il est raisonnable de penser que le BDNF pourrait induire l'agrégation plaquettaire *via* le récepteur TrKB dépourvu de son domaine tyrosine kinase. Cette signalisation pourrait impliquer des protéines kinases qui se trouvent inhibées suite à la forte dose de GNF (30 μ M). L'agrégation devrait être assistée en présence d'un puissant inhibiteur des PKCs⁴³² empêchant la phosphorylation des récepteurs TrKB, avant la stimulation avec le BDNF. Étant donné que la PKC joue un rôle régulateur important dans la signalisation plaquettaire⁴³³, ceci pourrait expliquer les voies de signalisation différentielle au niveau des plaquettes. D'autres inhibiteurs des voies de signalisation, comme les voies PI3K, seront de grande utilité pour vérifier la nature des protéines impliquées dans cette signalisation. D'autre part, il ne faut pas exclure la possibilité qu'un autre type de récepteur plaquettaire puisse servir de cofacteur pour induire une signalisation *via* la fixation du BDNF. Notons qu'il a été suggéré que les plaquettes internalisent le BDNF à travers des récepteurs plaquettaires possédant deux densités et affinités différentes soit 80 et 3450

sites/plaquettes⁹, ce qui pourrait correspondre à la forme tronquée et à la forme complète respectivement.

Nous postulons que d'autres mécanismes intracellulaires soient impliqués dans la relâche du BDNF plaquettaire, tels que la phosphorylation des protéines adaptatrices ou encore la voie de PI3AKT (comme au niveau du SNC) et/ou les PKCs, mais cela nécessite des investigations plus approfondies.

D'après les résultats de *western blot* et d'agrégation, en utilisant les inhibiteurs pharmacologiques, on pense que les plaquettes expriment la forme tronquée du récepteur TrKB et que l'activation des plaquettes par le BDNF responsable de l'agrégation pourrait se faire *via* la forme tronquée du récepteur, en faisant intervenir la signalisation des protéines kinases qui supporteraient l'agrégation plaquettaire. Au laboratoire, la présence de la forme tronquée a été validée par d'autres contrôles positifs comme le lysat du cortex humain et par l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques des protéines signalétiques.

La diminution dans la quantité du BDNF au niveau embryonnaire altère le développement des vaisseaux intramyocardiques et pourrait être liée à l'hypercontractilité cardiaque¹³. Dans le même contexte des rôles bénéfiques du BDNF, il a été rapporté qu'il agissait comme un régulateur au niveau de l'angiogenèse^{367 434 355}. Il est aussi capable d'améliorer le flux vasculaire, peut réguler la revascularisation des tissus ischémiques¹³ et améliore la fonction ventriculaire gauche dans le myocarde ischémique⁴³⁵. Cette découverte que les plaquettes sont activées par le BDNF et peuvent exprimer le TrKB pourrait également avoir un impact positif sur le développement de thérapies ciblant ce dernier dans les maladies cardiovasculaires. Ainsi, l'élucidation du rôle de TrKB *via* le BDNF dans les plaquettes pourrait fournir de nouvelles orientations dans la prévention et dans le traitement de la déficience vasculaire, peut-être même dans le rétablissement de cette dernière.

Nous avançons que les antiplaquettaires peuvent jouer le rôle de modulateurs des voies de signalisation qui contrôlent la sécrétion du BDNF par les plaquettes, en modifiant les quantités libérées. Les résultats de cette thèse exposent pour la première fois (un fait jamais rapporté au niveau des plaquettes) l'activation des plaquettes par le BDNF, ainsi que la possibilité de la présence de l'axe BDNF-TrKB tronqué. Lors d'une thérapie antiplaquettaire, les quantités de BDNF libérées peuvent être freinées, comme cela fut

décrit dans la partie expérimentale. Il ne sera peut-être pas relâché de façon non programmée, mais plutôt lors d'un processus inflammatoire faisant intervenir les interactions des plaquettes avec des plaquettes voisines ou avec d'autres types cellulaires. Il est donc essentiel de comprendre comment les plaquettes réguleront la libération de BDNF afin de bien cerner le rôle du BDNF plaquettaire dans l'homéostasie vasculaire. Or, la thérapie antiplaquettaire diminue cette sécrétion, ce qui renverse l'effet du BDNF au niveau de la plaque s'il s'avère délétère. Dans le même ordre d'idées, il serait intéressant d'examiner plus en profondeur le rôle potentiel des plaquettes dans la libération du BDNF *via* la dégranulation, mettant en perspectives la possibilité d'un traitement antiplaquettaire comme méthode de retardement de la rupture de la plaque. De plus, dans les conditions physiologiques, les plaquettes sont parmi les sources importantes du BDNF au niveau périphérique^{9, 11} avec des concentrations pouvant atteindre 100 à 1000 fois celles du SNC^{9, 12 436, 437}. Comme plusieurs données confirment largement le rôle neuroprotecteur du BDNF, ceci renforce l'hypothèse que le BDNF puisse avoir un rôle protecteur au niveau vasculaire une fois relâché par les plaquettes.

8.1 Les forces de l'étude

Les techniques employées dans cette étude sont des méthodologies étalons, et permettent ainsi une bonne distribution des données. Comme il existe peu de publications qui mettent en relation l'activité plaquettaire et la sécrétion de BDNF, surtout dans un contexte de traitements antiplaquettaires, cette étude a permis de comparer les niveaux intraplaquettaires de BDNF entre les volontaires sains et les patients souffrant de maladie cardiovasculaire et d'investiguer l'impact des médicaments antiplaquettaires sur la dynamique de la sécrétion de BDNF par les plaquettes. Par ailleurs, nous avons ciblé la possibilité de découvrir un nouveau type de récepteur exprimé au niveau des plaquettes humaines, ce qui sera d'intérêt pharmacologique dans le futur.

8.2 Les limites de l'étude

S'agissant d'une étude exploratrice, il ne nous est pas possible d'estimer la taille d'échantillon de façon précise. Le recrutement des patients atteints de maladies valvulaires ou de cardiomyopathies était très difficile et n'a pas pu être stratifié pour l'âge et pour le sexe. Nous étions obligés de réduire la taille de l'échantillon des participants par groupe. Le laboratoire étant à ses débuts, beaucoup de limites ont retardé l'avancement du projet convenablement.

8.3 Conclusions et perspectives

Outre son rôle neurologique, il est de plus en plus évident que le BDNF est également impliqué dans la physiologie et la pathologie cardiovasculaire. À travers cette thèse, on a exploré le volet plaquettaire du BDNF et son implication dans l'agrégation plaquettaire, élément essentiel dans la formation de thrombus dans les SCA et ses complications cardiovasculaires.

Nous avons investigué spécifiquement plusieurs voies d'activation plaquettaire et leurs inhibitions, ce qui permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires responsables de la régulation de la libération de BDNF dans le futur. Ceci pourrait potentiellement mener au développement de stratégies visant à améliorer la disponibilité de BDNF aux sites de lésions vasculaires.

Beaucoup d'informations sont actuellement absentes quant à l'origine du BDNF. D'autres études sont importantes afin de vérifier le profil d'expression de ce dernier au niveau des plaquettes, ainsi que l'origine de transcrite de l'ARNm qui serait transmis par les MKs ou intérioriser par d'autres types cellulaires. De plus, il n'est toujours pas clair s'il existe différentes isoformes du BDNF au niveau des plaquettes.

D'après nos résultats, il est évident que le BDNF est fortement libéré par les plaquettes stimulées et que cette sécrétion se trouve inhibée par les antiplaquettaires. Ceci dit, il serait utile de vérifier si la forme précurseur du BDNF serait aussi libérée sous l'effet des agonistes et si les antiplaquettaires inhiberaient cette sécrétion, le cas échéant.

Le BDNF active les plaquettes de manière significative en induisant une agrégation irréversible. Ce résultat exploré pour la première fois suggérerait que le pro-BDNF puisse aussi induire l'activation des plaquettes, compte tenu du fait que le Pro-BFN induit différentes signalisations au niveau d'autres types cellulaires tels que les neurones. Ceci reste à être confirmé à travers des études futures.

Nos résultats vont à l'encontre de l'hypothèse qui stipule que les plaquettes n'expriment pas ces récepteurs et suggèrent que le BDNF soit capable de transmettre une signalisation intracellulaire *via* son propre récepteur TrKB au niveau des plaquettes humaines.

Le BDNF *via* son récepteur cardiaque TrkB pourrait jouer un rôle protecteur en induisant une angiogenèse et en régulant de manière positive l'expression des facteurs de survie. Compte tenu du fait que les thérapies cellulaires sont devenues des alternatives potentielles à cet égard, ces cellules exprimant le BDNF et son récepteur TrkB seront donc capables de favoriser la régénération du myocarde endommagé, offrant ainsi de nouvelles options pour les mécanismes de réparation cardiaque endogène. Par conséquent, une étude plus approfondie est nécessaire pour élargir nos connaissances et pourrait conduire à la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces pour les maladies et les dysfonctions cardiovasculaires. Cependant, il sera intéressant de conduire des expériences par cytométrie en flux ou par microscopie confocale afin de préciser l'isoforme de TrkB présente dans les plaquettes.

Comme le BDNF active les plaquettes et induit ainsi leurs agrégations, l'action autocrine et/ou paracrine de celui-ci reste un champ important à explorer afin de mieux comprendre le rôle du BDNF dans un contexte pathologique, car cette action pourrait être peu souhaitable chez les patients. De ce fait, le freinage de la libération plaquettaire du BDNF sous l'action des antiplaquettaires lors de la maladie coronarienne pourrait s'avérer bénéfique dans certaines situations pathologiques chez les patients avec des comorbidités.

La différence entre l'action du BDNF sur les plaquettes lavées et dans le plasma nous laisse poser des questions physiologiques importantes en tenant compte du fait que les plaquettes sont le réservoir périphérique le plus important de BDNF et qu'elles en relâchent en grande quantité en circulation. Le plasma est riche de plusieurs protéines comme celles qui transportent d'autres protéines ou celles qui possèdent une activité inhibitrice. Il est donc raisonnable de penser que le BDNF pourrait se lier aux protéines plasmatiques et devient séquestré par celles-ci, ou encore subir une action inhibitrice ce qui altère sa biodisponibilité au niveau du plasma. De plus, les formes tronquées du récepteur TrkB peuvent agir comme des inhibiteurs négatifs dominants de la signalisation du BDNF en l'internalisant et en l'éliminant au niveau du SNC, rien n'empêcherait ce mécanisme de se produire au niveau périphérique. Cette différence pourrait s'expliquer par la présence d'un système thromboprotecteur dans le plasma. Afin de mieux comprendre ces mécanismes impliqués dans la relâche du BDNF, il est important d'identifier les molécules

essentielles à la signalisation intracellulaire de ce dernier, tout en délimitant leurs rôles, en particulier chez les patients cardiovasculaires.

Des recherches futures sont donc nécessaires pour les cliniciens qui souhaitent intervenir dans le processus de la thrombose, tout en minimisant le risque de saignement.

Au regard des différentes questions se posant sur la forme précurseur du BDNF (le pro-BDNF), nous nous demandons si les deux protéines sont localisées au niveau du même compartiment plaquettaire et en quoi consiste leur rôle au niveau vasculaire.

Bibliographie

1. Lu B, Pang PT and Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nature reviews Neuroscience*. 2005;6:603-14.
2. Butenschon J, Zimmermann T, Schmarowski N, Nitsch R, Fackelmeier B, Friedemann K, Radyushkin K, Baumgart J, Lutz B and Leschik J. PSA-NCAM positive neural progenitors stably expressing BDNF promote functional recovery in a mouse model of spinal cord injury. *Stem cell research & therapy*. 2016;7:11.
3. Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF and Weinberger DR. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23:6690-4.
4. Sanchez MM, Das D, Taylor JL, Noda A, Yesavage JA and Salehi A. BDNF polymorphism predicts the rate of decline in skilled task performance and hippocampal volume in healthy individuals. *Transl Psychiatry*. 2011;1:e51.
5. Kleim JA, Chan S, Pringle E, Schallert K, Procaccio V, Jimenez R and Cramer SC. BDNF val66met polymorphism is associated with modified experience-dependent plasticity in human motor cortex. *Nat Neurosci*. 2006;9:735-7.
6. Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ and Wren P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14:401-16.
7. Greenberg ME, Xu B, Lu B and Hempstead BL. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29:12764-7.
8. Tamura S, Suzuki H, Hirowatari Y, Hatase M, Nagasawa A, Matsuno K, Kobayashi S and Moriyama T. Release reaction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through PAR1 activation and its two distinct pools in human platelets. *Thromb Res*. 2011;128:e55-61.
9. Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B and Tandon NN. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thrombosis and haemostasis*. 2002;87:728-34.
10. Pliego-Rivero FB, Bayatti N, Giannakoulopoulos X, Glover V, Bradford HF, Stern G and Sandler M. Brain-derived neurotrophic factor in human platelets. *Biochemical pharmacology*. 1997;54:207-9.
11. Yamamoto H and Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1990;10:3469-78.
12. Chacon-Fernandez P, Sauberli K, Colzani M, Moreau T, Ghevaert C and Barde YA. Brain-derived Neurotrophic Factor in Megakaryocytes. *J Biol Chem*. 2016;291:9872-81.
13. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, Wang S, Ibanez CF, Rafii S and Hempstead BL. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*. 2000;127:4531-40.

14. Tamura S, Nagasawa A, Masuda Y, Tsunematsu T, Hayasaka K, Matsuno K, Shimizu C, Ozaki Y and Moriyama T. BDNF, produced by a TPO-stimulated megakaryocytic cell line, regulates autocrine proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427:542-6.
15. Labouyrie E, Dubus P, Groppi A, Mahon FX, Ferrer J, Parrens M, Reiffers J, de Mascarel A and Merlio JP. Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *The American journal of pathology.* 1999;154:405-15.
16. Oppenheim RW, Yin QW, Prevet D and Yan Q. Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature.* 1992;360:755-7.
17. Wurzelmann M, Romeika J and Sun D. Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. *Neural regeneration research.* 2017;12:7-12.
18. Price RD, Milne SA, Sharkey J and Matsuoka N. Advances in small molecules promoting neurotrophic function. *Pharmacology & therapeutics.* 2007;115:292-306.
19. Pardridge WM, Kang YS and Buciak JL. Transport of human recombinant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through the rat blood-brain barrier in vivo using vector-mediated peptide drug delivery. *Pharmaceutical research.* 1994;11:738-46.
20. Karege F, Schwald M and Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neuroscience letters.* 2002;328:261-4.
21. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J and Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology.* 1998;37:1553-61.
22. Wu D. Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* 2005;2:120-8.
23. Klein AB, Williamson R, Santini MA, Clemmensen C, Ettrup A, Rios M, Knudsen GM and Aznar S. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011;14:347-53.
24. Zeiler M, Moser M and Mann M. Copy number analysis of the murine platelet proteome spanning the complete abundance range. *Molecular & cellular proteomics : MCP.* 2014;13:3435-45.
25. Barquera S, Pedroza-Tobias A, Medina C, Hernandez-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R and Moran AE. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Archives of medical research.* 2015;46:328-38.
26. Beiswenger AC, Jo A, Harth K, Kumins NH, Shishehbor MH and Kashyap VS. A systematic review of the efficacy of aspirin monotherapy versus other antiplatelet therapy regimens in peripheral arterial disease. *Journal of Vascular Surgery.* 2018;67:1922-1932.e6.
27. Nusdeo G, Terrosu P and Parodi G. Optimal antiplatelet therapy after an acute coronary syndrome in the elderly: An old issue. *Int J Cardiol.* 2018;259:49-50.
28. Paravattil B and Elewa H. Strategies to Optimize Dual Antiplatelet Therapy After Coronary Artery Stenting in Acute Coronary Syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2017;22:347-355.

29. Morel-Kopp MC, McLean L, Chen Q, Tofler GH, Tennant C, Maddison V and Ward CM. The association of depression with platelet activation: evidence for a treatment effect. *J Thromb Haemost.* 2009;7:573-81.
30. Angiolillo DJ, Capodanno D and Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J.* 2010;31:17-28.
31. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, Bax JJ, Borger MA, Brotons C, Chew DP, Gencer B, Hasenfuss G, Kjeldsen K, Lancellotti P, Landmesser U, Mehilli J, Mukherjee D, Storey RF and Windecker S. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2016;37:267-315.
32. Bernd P, Miles K, Rozenberg I, Borghjid S and Kirby ML. Neurotrophin-3 and TrkC are expressed in the outflow tract of the developing chicken heart. *Dev Dyn.* 2004;230:767-72.
33. Scarisbrick IA, Jones EG and Isackson PJ. Coexpression of mRNAs for NGF, BDNF, and NT-3 in the cardiovascular system of the pre- and postnatal rat. *J Neurosci.* 1993;13:875-93.
34. Caporali A and Emanuelli C. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiol Rev.* 2009;89:279-308.
35. Ribatti D and Crivellato E. Giulio Bizzozzero and the discovery of platelets. *Leuk Res.* 2007;31:1339-41.
36. Kaushansky K. Thrombopoiesis. *Seminars in hematology.* 2015;52:4-11.
37. Kelemen E, Cserhati I and Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta haematologica.* 1958;20:350-5.
38. Kuter DJ and Begley CG. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood.* 2002;100:3457-69.
39. Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood.* 2008;111:981-6.
40. Schulze H and Stegner D. Imaging platelet biogenesis in vivo. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2:461-468.
41. Kosaki G. In vivo platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets? *International journal of hematology.* 2005;81:208-19.
42. Kosaki G. Platelet production by megakaryocytes: proplatelet theory justifies cytoplasmic fragmentation model. *International journal of hematology.* 2008;88:255-267.
43. Kosaki G and Kambayashi J. Thrombocytogenesis by megakaryocyte; Interpretation by proplatelet hypothesis. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences.* 2011;87:254-73.
44. Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta anatomica.* 1957;29:267-90.
45. Kaufman RM, Airo R, Pollack S and Crosby WH. Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung. *Blood.* 1965;26:720-31.
46. Sugimoto N and Eto K. Platelet production from induced pluripotent stem cells. *J Thromb Haemost.* 2017;15:1717-1727.
47. Reems JA, Pineault N and Sun S. In vitro megakaryocyte production and platelet biogenesis: state of the art. *Transfus Med Rev.* 2010;24:33-43.

48. Italiano JE, Jr. and Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1174-82.
49. Kowata S and Ishida Y. Megakaryopoiesis and Thrombopoiesis. In: Y. Ishida and Y. Tomiyama, eds. *Autoimmune Thrombocytopenia* Singapore: Springer Singapore; 2017: 9-19.
50. Michelson AD. *PLATELETS* Second Edition ed. Academic Press of Elsevier: Elsevier; 2002-2007.
51. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M and Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiological reviews.* 2013;93:327-58.
52. Blair P and Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 2009;23:177-89.
53. Duerschmied D, Bode C and Ahrens I. Immune functions of platelets. *Thromb Haemost.* 2014;112:678-91.
54. Fitch-Tewfik JL and Flaumenhaft R. Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Frontiers in endocrinology.* 2013;4:77.
55. Gremmel T, Frelinger AL, 3rd and Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42:191-204.
56. Jurk K and Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:381-92.
57. Mumford AD, Frelinger AL, 3rd, Gachet C, Gresele P, Noris P, Harrison P and Mezzano D. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost.* 2015;114:14-25.
58. Kaplan ZS and Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology American Society of Hematology Education Program.* 2011;2011:51-61.
59. Golebiewska EM and Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood reviews.* 2015;29:153-62.
60. Burnouf T, Strunk D, Koh MB and Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials.* 2016;76:371-87.
61. Semple JW, Italiano JE and Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology.* 2011;11:264.
62. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110:673-87.
63. Jarvis GE, Bihan D, Hamaia S, Pugh N, Ghevaert CJ, Pearce AC, Hughes CE, Watson SP, Ware J, Rudd CE and Farndale RW. A role for adhesion and degranulation-promoting adapter protein in collagen-induced platelet activation mediated via integrin alpha(2) beta(1). *J Thromb Haemost.* 2012;10:268-77.
64. Gachet C. [Molecular mechanisms of platelet activation]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine.* 2013;197:361-73.
65. Brass LF. More pieces of the platelet activation puzzle slide into place. *The Journal of clinical investigation.* 1999;104:1663-5.
66. Becker RC. Thrombosis and the role of the platelet. *Am J Cardiol.* 1999;83:3e-6e.
67. Estevez B and Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda, Md).* 2017;32:162-177.
68. van der Meijden PEJ and Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature reviews Cardiology.* 2018.

69. Lhermusier T, van Rottem J, Garcia C, Xuereb JM, Ragab A, Martin V, Gratacap MP, Sie P and Payrastre B. The Syk-kinase inhibitor R406 impairs platelet activation and monocyte tissue factor expression triggered by heparin-PF4 complex directed antibodies. *J Thromb Haemost.* 2011;9:2067-76.
70. Quek LS, Pasquet JM, Hers I, Cornall R, Knight G, Barnes M, Hibbs ML, Dunn AR, Lowell CA and Watson SP. Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway. *Blood.* 2000;96:4246-53.
71. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M and Watson SP. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS letters.* 1997;413:255-9.
72. Schmaier AA, Zou Z, Kazlauskas A, Emert-Sedlak L, Fong KP, Neeves KB, Maloney SF, Diamond SL, Kunapuli SP, Ware J, Brass LF, Smithgall TE, Saksela K and Kahn ML. Molecular priming of Lyn by GPVI enables an immune receptor to adopt a hemostatic role. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106:21167-72.
73. Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Bori-Sanz T, Inoue O, Jung SM, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC and Watson SP. Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277:21561-6.
74. Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL and Watson SP. The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *Embo J.* 1997;16:2333-41.
75. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Dean WL, Frampton J and Watson SP. Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2. *The Journal of cell biology.* 2003;160:769-80.
76. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ and Pearce AC. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1752-62.
77. Watson SP, Asazuma N, Atkinson B, Berlanga O, Best D, Bobe R, Jarvis G, Marshall S, Snell D, Stafford M, Tulasne D, Wilde J, Wonerow P and Frampton J. The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen. *Thromb Haemost.* 2001;86:276-88.
78. Quinton TM, Ozdener F, Dangelmaier C, Daniel JL and Kunapuli SP. Glycoprotein VI-mediated platelet fibrinogen receptor activation occurs through calcium-sensitive and PKC-sensitive pathways without a requirement for secreted ADP. *Blood.* 2002;99:3228-34.
79. Marjoram RJ, Li Z, He L, Tollefsen DM, Kunicki TJ, Dickeson SK, Santoro SA and Zutter MM. alpha2beta1 integrin, GPVI receptor, and common FcRgamma chain on mouse platelets mediate distinct responses to collagen in models of thrombosis. *PLoS One.* 2014;9:e114035.
80. Wei AH, Schoenwaelder SM, Andrews RK and Jackson SP. New insights into the haemostatic function of platelets. *British journal of haematology.* 2009;147:415-30.
81. Inoue O, Suzuki-Inoue K and Ozaki Y. Redundant mechanism of platelet adhesion to laminin and collagen under flow: involvement of von Willebrand factor and glycoprotein Ib-IX-V. *The Journal of biological chemistry.* 2008;283:16279-82.

82. Stalker TJ, Newman DK, Ma P, Wannemacher KM and Brass LF. Platelet signaling. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;59-85.
83. Brass LF, Wannemacher KM, Ma P and Stalker TJ. Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1:66-75.
84. Goggs R and Poole AW. Platelet signaling-a primer. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2012;22:5-29.
85. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation research*. 2006;99:1293-304.
86. Murugappa S and Kunapuli SP. The role of ADP receptors in platelet function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2006;11:1977-86.
87. Jin J and Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:8070-4.
88. Savi P, Beauverger P, Labouret C, Delfaud M, Salel V, Kaghad M and Herbert JM. Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS letters*. 1998;422:291-5.
89. Damman P, Woudstra P, Kuijt WJ, de Winter RJ and James SK. P2Y12 platelet inhibition in clinical practice. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2012;33:143-53.
90. Reiss AB, Grossfeld D, Kasselman LJ, Renna HA, Vernice NA, Drewes W, Konig J, Carsons SE and DeLeon J. Adenosine and the Cardiovascular System. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. 2019.
91. Erb L and Weisman GA. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley interdisciplinary reviews Membrane transport and signaling*. 2012;1:789-803.
92. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA and Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:2341-9.
93. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Nunez L and Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. 2009;94:700-11.
94. Yang J, Wu J, Kowalska MA, Dalvi A, Prevost N, O'Brien PJ, Manning D, Poncz M, Lucki I, Blendy JA and Brass LF. Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:9984-9.
95. Fabre JE, Nguyen M, Athirakul K, Coggins K, McNeish JD, Austin S, Parise LK, FitzGerald GA, Coffman TM and Koller BH. Activation of the murine EP3 receptor for PGE2 inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107:603-10.
96. Clapham DE and Neer EJ. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:167-203.
97. Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D and Brass LF. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:46035-42.
98. Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G and Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nature structural & molecular biology*. 2009;16:961-6.

99. Harrison P and Goodall AH. "Message in the platelet"--more than just vestigial mRNA! *Platelets*. 2008;19:395-404.
100. Weyrich AS. Platelets: more than a sack of glue. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2014;2014:400-3.
101. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW and Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*. 2009;7:241-6.
102. McFadyen JD and Kaplan ZS. Platelets are not just for clots. *Transfus Med Rev*. 2015;29:110-9.
103. Italiano JE, Jr., Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J and Klement GL. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 2008;111:1227-33.
104. Ma L, Perini R, McKnight W, Dicay M, Klein A, Hollenberg MD and Wallace JL. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:216-20.
105. Sehgal S and Storrie B. Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release. *J Thromb Haemost*. 2007;5:2009-16.
106. White GC, 2nd and Rompietti R. Platelet secretion: indiscriminately spewed forth or highly orchestrated? *J Thromb Haemost*. 2007;5:2006-8.
107. Whiteheart SW. Platelet granules: surprise packages. *Blood*. 2011;118:1190-1.
108. van Nispen tot Pannerden H, de Haas F, Geerts W, Posthuma G, van Dijk S and Heijnen HF. The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood*. 2010;116:1147-56.
109. Kamykowski J, Carlton P, Sehgal S and Storrie B. Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet alpha-granules. *Blood*. 2011;118:1370-3.
110. Banerjee M and Whiteheart SW. The ins and outs of endocytic trafficking in platelet functions. *Curr Opin Hematol*. 2017;24:467-474.
111. Graham GJ, Ren Q, Dilks JR, Blair P, Whiteheart SW and Flaumenhaft R. Endobrevin/VAMP-8-dependent dense granule release mediates thrombus formation in vivo. *Blood*. 2009;114:1083-90.
112. Koseoglu S, Dilks JR, Peters CG, Fitch-Tewfik JL, Fadel NA, Jasuja R, Italiano JE, Jr., Haynes CL and Flaumenhaft R. Dynamin-related protein-1 controls fusion pore dynamics during platelet granule exocytosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:481-8.
113. Chen D, Lemons PP, Schraw T and Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood*. 2000;96:1782-8.
114. Ginsberg MH, Taylor L and Painter RG. The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion. *Blood*. 1980;55:661-8.
115. Yadav S and Storrie B. The cellular basis of platelet secretion: Emerging structure/function relationships. *Platelets*. 2017;28:108-118.
116. Peters CG, Michelson AD and Flaumenhaft R. Granule exocytosis is required for platelet spreading: differential sorting of alpha-granules expressing VAMP-7. *Blood*. 2012;120:199-206.

117. Woronowicz K, Dilks JR, Rozenvayn N, Dowal L, Blair PS, Peters CG, Woronowicz L and Flaumenhaft R. The platelet actin cytoskeleton associates with SNAREs and participates in alpha-granule secretion. *Biochemistry*. 2010;49:4533-42.
118. Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23:1152-60.
119. Ren Q, Ye S and Whiteheart SW. The platelet release reaction: just when you thought platelet secretion was simple. *Current opinion in hematology*. 2008;15:537-41.
120. Feng D, Crane K, Rozenvayn N, Dvorak AM and Flaumenhaft R. Subcellular distribution of 3 functional platelet SNARE proteins: human cellubrevin, SNAP-23, and syntaxin 2. *Blood*. 2002;99:4006-14.
121. Chen D, Bernstein AM, Lemons PP and Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release. *Blood*. 2000;95:921-9.
122. Ren Q, Barber HK, Crawford GL, Karim ZA, Zhao C, Choi W, Wang CC, Hong W and Whiteheart SW. Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction. *Mol Biol Cell*. 2007;18:24-33.
123. Golebiewska EM and Poole AW. Secrets of platelet exocytosis - what do we really know about platelet secretion mechanisms? *British journal of haematology*. 2013.
124. Hutagalung AH and Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews*. 2011;91:119-49.
125. Tolmachova T, Abrink M, Futter CE, Authi KS and Seabra MC. Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104:5872-7.
126. Shirakawa R, Higashi T, Tabuchi A, Yoshioka A, Nishioka H, Fukuda M, Kita T and Horiuchi H. Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:10730-7.
127. Huang Y, Joshi S, Xiang B, Kanaho Y, Li Z, Bouchard BA, Moncman CL and Whiteheart SW. Arf6 controls platelet spreading and clot retraction via integrin alphaIIb beta3 trafficking. *Blood*. 2016;127:1459-67.
128. Ambrosio AL and Di Pietro SM. Storage pool diseases illuminate platelet dense granule biogenesis. *Platelets*. 2017;28:138-146.
129. Houg A, Polgar J and Reed GL. Munc18-syntaxin complexes and exocytosis in human platelets. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:19627-33.
130. Schraw TD, Lemons PP, Dean WL and Whiteheart SW. A role for Sec1/Munc18 proteins in platelet exocytosis. *The Biochemical journal*. 2003;374:207-17.
131. Flaumenhaft R, Croce K, Chen E, Furie B and Furie BC. Proteins of the exocytotic core complex mediate platelet alpha-granule secretion. Roles of vesicle-associated membrane protein, SNAP-23, and syntaxin 4. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:2492-501.
132. Barclay JW, Craig TJ, Fisher RJ, Ciuffo LF, Evans GJ, Morgan A and Burgoyne RD. Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:10538-45.
133. Fujita Y, Sasaki T, Fukui K, Kotani H, Kimura T, Hata Y, Sudhof TC, Scheller RH and Takai Y. Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:7265-8.

134. Polgar J, Lane WS, Chung SH, Houg AK and Reed GL. Phosphorylation of SNAP-23 in activated human platelets. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:44369-76.
135. Reed GL, Houg AK and Fitzgerald ML. Human platelets contain SNARE proteins and a Sec1p homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation: implications for platelet secretion. *Blood*. 1999;93:2617-26.
136. Reed GL, Fitzgerald ML and Polgar J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood*. 2000;96:3334-42.
137. Furie B, Furie BC and Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost*. 2001;86:214-21.
138. Chung SH, Polgar J and Reed GL. Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:25286-91.
139. Konopatskaya O, Gilio K, Harper MT, Zhao Y, Cosemans JM, Karim ZA, Whiteheart SW, Molkentin JD, Verkade P, Watson SP, Heemskerk JW and Poole AW. PKC α regulates platelet granule secretion and thrombus formation in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:399-407.
140. Harper MT and Poole AW. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2010;8:454-62.
141. Scharf RE. Drugs that affect platelet function. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38:865-83.
142. Yousuf O and Bhatt DL. The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Nature reviews Cardiology*. 2011;8:547-59.
143. Abuqayyas S, Raju S, Bartholomew JR, Abu Hweij R and Mehta AC. Management of antithrombotic agents in patients undergoing flexible bronchoscopy. *Eur Respir Rev*. 2017;26.
144. Patrono C and Rocca B. Aspirin and Other COX-1 Inhibitors. In: P. Gresele, G. V. R. Born, C. Patrono and C. P. Page, eds. *Antiplatelet Agents* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012: 137-164.
145. Loll PJ, Picot D and Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nature structural biology*. 1995;2:637-43.
146. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ (Clinical research ed)*. 2002;324:71-86.
147. Berger JS, Brown DL and Becker RC. Low-dose aspirin in patients with stable cardiovascular disease: a meta-analysis. *The American journal of medicine*. 2008;121:43-9.
148. Berger JS, Brown DL, Burke GL, Oberman A, Kostis JB, Langer RD, Wong ND and Wassertheil-Smoller S. Aspirin use, dose, and clinical outcomes in postmenopausal women with stable cardiovascular disease: the Women's Health Initiative Observational Study. *Circulation Cardiovascular quality and outcomes*. 2009;2:78-87.
149. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second

- International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet (London, England)*. 1988;2:349-60.
150. Baigent C, Collins R, Appleby P, Parish S, Sleight P and Peto R. ISIS-2: 10 year survival among patients with suspected acute myocardial infarction in randomised comparison of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither. The ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *BMJ (Clinical research ed)*. 1998;316:1337-43.
151. Bartolucci AA, Tendera M and Howard G. Meta-analysis of multiple primary prevention trials of cardiovascular events using aspirin. *The American journal of cardiology*. 2011;107:1796-801.
152. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG and Huisman MV. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Archives of internal medicine*. 2007;167:1593-9.
153. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS and Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2008;336:195-8.
154. Tantry US, Bliden KP and Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46:1705-9.
155. Hechler B and Gachet C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic signalling*. 2011;7:293-303.
156. Cattaneo M, Canciani MT, Lecchi A, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Mannucci PM and Mustard JF. Released adenosine diphosphate stabilizes thrombin-induced human platelet aggregates. *Blood*. 1990;75:1081-6.
157. Eckly A, Gendrault JL, Hechler B, Cazenave JP and Gachet C. Differential involvement of the P2Y1 and P2YT receptors in the morphological changes of platelet aggregation. *Thrombosis and haemostasis*. 2001;85:694-701.
158. Scrutinio D, Cimminiello C, Marubini E, Pitzalis MV, Di Biase M and Rizzon P. Ticlopidine versus aspirin after myocardial infarction (STAMI) trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;37:1259-65.
159. Savi P, Labouret C, Delesque N, Guette F, Lupker J and Herbert JM. P2y(12), a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;283:379-83.
160. Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost*. 2008;99:466-72.
161. Kam PC and Nethery CM. The thienopyridine derivatives (platelet adenosine diphosphate receptor antagonists), pharmacology and clinical developments. *Anaesthesia*. 2003;58:28-35.
162. Wallentin L. P2Y(12) inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur Heart J*. 2009;30:1964-77.
163. Kauffenstein G, Bergmeier W, Eckly A, Ohlmann P, Leon C, Cazenave JP, Nieswandt B and Gachet C. The P2Y(12) receptor induces platelet aggregation through weak activation of the alpha(IIB)beta(3) integrin--a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett*. 2001;505:281-90.

164. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, Collins R and Liu LS. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2005;366:1607-21.
165. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G and Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *The New England journal of medicine*. 2001;345:494-502.
166. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, Gensini GF, Santini A, Panizza R, Moschi G, Gori AM, Abbate R and Antoniucci D. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49:2312-7.
167. Gurbel PA, Bliden KP, Samara W, Yoho JA, Hayes K, Fissaha MZ and Tantry US. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46:1827-32.
168. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Beinart R, Goldenberg I, Novikov I, Pres H, Savion N, Varon D and Hod H. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109:3171-5.
169. Sibbing D, Braun S, Morath T, Mehilli J, Vogt W, Schomig A, Kastrati A and von Beckerath N. Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53:849-56.
170. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA, Freij A and Thorsen M. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine*. 2009;361:1045-57.
171. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann FJ, Ardissino D, De Servi S, Murphy SA, Riesmeyer J, Weerakkody G, Gibson CM and Antman EM. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine*. 2007;357:2001-15.
172. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Walker JR, Simon T, Antman EM, Braunwald E and Sabatine MS. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet (London, England)*. 2010;376:1312-9.
173. Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J, Husted S, Katus H, Steg PG, Shah SH and Becker RC. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet (London, England)*. 2010;376:1320-8.
174. Shattil SJ, Kim C and Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:288-300.
175. Durrant TN, van den Bosch MT and Hers I. Integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling. *Blood*. 2017;130:1607-1619.
176. Collier BS and Shattil SJ. The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIb beta3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood*. 2008;112:3011-25.

177. Gratacap MP, Guillermet-Guibert J, Martin V, Chicanne G, Tronchere H, Gaits-Iacovoni F and Payrastre B. Regulation and roles of PI3Kbeta, a major actor in platelet signaling and functions. *Advances in enzyme regulation*. 2011;51:106-16.
178. Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA and Shattil SJ. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *The Journal of cell biology*. 2002;157:265-75.
179. Fong KP, Zhu H, Span LM, Moore DT, Yoon K, Tamura R, Yin H, DeGrado WF and Bennett JS. Directly Activating the Integrin alphaIIb beta3 Initiates Outside-In Signaling by Causing alphaIIb beta3 Clustering. *J Biol Chem*. 2016;291:11706-16.
180. Schror K and Weber AA. Comparative pharmacology of GP IIb/IIIa antagonists. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2003;15:71-80.
181. Topol EJ, Byzova TV and Plow EF. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet (London, England)*. 1999;353:227-31.
182. Gremmel T, Michelson AD, Frelinger AL, III and Bhatt DL. Novel aspects of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*. 2018;2:439-449.
183. Lippi G, Montagnana M, Danese E, Favalaro EJ and Franchini M. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: an update on the mechanism of action and use of functional testing methods to assess antiplatelet efficacy. *Biomark Med*. 2011;5:63-70.
184. Collier BS, Scudder LE, Beer J, Gold HK, Folts JD, Cavagnaro J, Jordan R, Wagner C, Iulucci J, Knight D and et al. Monoclonal antibodies to platelet glycoprotein IIb/IIIa as antithrombotic agents. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991;614:193-213.
185. Quinn M, Deering A, Stewart M, Cox D, Foley B and Fitzgerald D. Quantifying GPIIb/IIIa receptor binding using 2 monoclonal antibodies: discriminating abciximab and small molecular weight antagonists. *Circulation*. 1999;99:2231-8.
186. Tanguay JF, Bell AD, Ackman ML, Bauer RD, Cartier R, Chan WS, Douketis J, Roussin A, Schnell G, Verma S, Wong G and Mehta SR. Focused 2012 update of the Canadian Cardiovascular Society guidelines for the use of antiplatelet therapy. *The Canadian journal of cardiology*. 2013;29:1334-45.
187. Franchi F and Angiolillo DJ. Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12:30-47.
188. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nature medicine*. 2011;17:1423-36.
189. Gibon J and Barker PA. Neurotrophins and Proneurotrophins: Focus on Synaptic Activity and Plasticity in the Brain. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2017;23:587-604.
190. Park H and Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14:7-23.
191. Bothwell M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Research*. 2016;5.
192. Roux PP and Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in neurobiology*. 2002;67:203-33.
193. Gentry JJ, Barker PA and Carter BD. The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. *Progress in brain research*. 2004;146:25-39.

194. Bandtlow C and Dechant G. From cell death to neuronal regeneration, effects of the p75 neurotrophin receptor depend on interactions with partner subunits. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2004;2004:pe24.
195. Barker PA. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron*. 2004;42:529-33.
196. Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell T, Cate RL, McCoy JM and Pepinsky RB. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*. 2004;7:221-8.
197. Stucky CL and Koltzenburg M. The low-affinity neurotrophin receptor p75 regulates the function but not the selective survival of specific subpopulations of sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17:4398-405.
198. Lee KF, Davies AM and Jaenisch R. p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development (Cambridge, England)*. 1994;120:1027-33.
199. Hennigan A, O'Callaghan RM and Kelly AM. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochemical Society transactions*. 2007;35:424-7.
200. Dawbarn D and Allen SJ. Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2003;29:211-30.
201. Lamballe F, Klein R and Barbacid M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*. 1991;66:967-79.
202. Lee FS, Kim AH, Khursigara G and Chao MV. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Current opinion in neurobiology*. 2001;11:281-6.
203. Barde YA, Edgar D and Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal*. 1982;1:549-53.
204. Barde YA, Edgar D and Thoenen H. New neurotrophic factors. *Annual review of physiology*. 1983;45:601-12.
205. Barde YA. Neurotrophic factors: an evolutionary perspective. *Journal of neurobiology*. 1994;25:1329-33.
206. Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ and Luskin MB. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Molecular and cellular neurosciences*. 1998;11:234-45.
207. Lindholm D, Carroll P, Tzimagiorgis G and 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;8:1452-60.
208. Alderson RF, Alterman AL, Barde YA and Lindsay RM. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron*. 1990;5:297-306.
209. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ and Luskin MB. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21:6706-17.
210. Ghosh A, Carnahan J and Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*. 1994;263:1618-23.

211. Luikart BW, Nef S, Virmani T, Lush ME, Liu Y, Kavalali ET and Parada LF. TrkB has a cell-autonomous role in the establishment of hippocampal Schaffer collateral synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25:3774-86.
212. Kawamura K, Kawamura N, Fukuda J, Kumagai J, Hsueh AJ and Tanaka T. Regulation of preimplantation embryo development by brain-derived neurotrophic factor. *Developmental biology*. 2007;311:147-58.
213. Matsutani S and Yamamoto N. Brain-derived neurotrophic factor induces rapid morphological changes in dendritic spines of olfactory bulb granule cells in cultured slices through the modulation of glutamatergic signaling. *Neuroscience*. 2004;123:695-702.
214. Ji Y, Pang PT, Feng L and Lu B. Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat Neurosci*. 2005;8:164-72.
215. Berghuis P, Agerman K, Dobszay MB, Minichiello L, Harkany T and Ernfors P. Brain-derived neurotrophic factor selectively regulates dendritogenesis of parvalbumin-containing interneurons in the main olfactory bulb through the PLCgamma pathway. *Journal of neurobiology*. 2006;66:1437-51.
216. Murphy DD, Cole NB and Segal M. Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:11412-7.
217. Tongiorgi E. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neuroscience research*. 2008;61:335-46.
218. Pattwell SS, Bath KG, Perez-Castro R, Lee FS, Chao MV and Ninan I. The BDNF Val66Met polymorphism impairs synaptic transmission and plasticity in the infralimbic medial prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32:2410-21.
219. Peters J, Dieppa-Perea LM, Melendez LM and Quirk GJ. Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science (New York, NY)*. 2010;328:1288-90.
220. Miranda M, Kent BA, Morici JF, Gallo F, Saksida LM, Bussey TJ, Weisstaub N and Bekinschtein P. NMDA receptors and BDNF are necessary for discrimination of overlapping spatial and non-spatial memories in perirhinal cortex and hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*. 2018;155:337-343.
221. Cunha C, Brambilla R and Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*. 2010;3:1.
222. Brigadski T, Hartmann M and Lessmann V. Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25:7601-14.
223. Prakash YS and Martin RJ. Brain-derived neurotrophic factor in the airways. *Pharmacol Ther*. 2014;143:74-86.
224. Marosi K and Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2014;25:89-98.
225. Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10:850-60.

226. Kovalchuk Y, Hanse E, Kafitz KW and Konnerth A. Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation. *Science (New York, NY)*. 2002;295:1729-34.
227. Ninan I. Synaptic regulation of affective behaviors; role of BDNF. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt C:684-95.
228. Ikegaya Y, Ishizaka Y and Matsuki N. BDNF attenuates hippocampal LTD via activation of phospholipase C: implications for a vertical shift in the frequency-response curve of synaptic plasticity. *The European journal of neuroscience*. 2002;16:145-8.
229. Huber KM, Sawtell NB and Bear MF. Brain-derived neurotrophic factor alters the synaptic modification threshold in visual cortex. *Neuropharmacology*. 1998;37:571-9.
230. Schabitz WR, Schwab S, Spranger M and Hacke W. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:500-6.
231. Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Dore JJ and Corbett D. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke*. 2009;40:1490-5.
232. Berretta A, Tzeng YC and Clarkson AN. Post-stroke recovery: the role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor. *Expert review of neurotherapeutics*. 2014;14:1335-44.
233. Cattaneo A, Cattane N, Begni V, Pariante CM and Riva MA. The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Translational psychiatry*. 2016;6:e958.
234. Lorgis L, Amoureux S, Vergely C, Zeller M, Cottin Y and Rochette L. [Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): role of this neurotrophin in cardiovascular physiopathology]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2009;58:99-103.
235. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K and Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*. 2007;90:397-406.
236. Aoyama M, Asai K, Shishikura T, Kawamoto T, Miyachi T, Yokoi T, Togari H, Wada Y, Kato T and Nakagawara A. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett*. 2001;164:51-60.
237. Liu QR, Walther D, Drgon T, Polesskaya O, Lesnick TG, Strain KJ, de Andrade M, Bower JH, Maraganore DM and Uhl GR. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;134B:93-103.
238. Hayes VY, Towner MD and Isackson PJ. Organization, sequence and functional analysis of a mouse BDNF promoter. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;45:189-98.
239. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K and Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res*. 2007;85:525-35.
240. Metsis M, Timmusk T, Arenas E and Persson H. Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:8802-6.
241. Heinrich G and Pagtakhan CJ. Both 5' and 3' flanks regulate Zebrafish brain-derived neurotrophic factor gene expression. *BMC neuroscience*. 2004;5:19.

242. Bathina S and Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci.* 2015;11:1164-78.
243. Kolbeck R, Jungbluth S and Barde YA. Characterisation of neurotrophin dimers and monomers. *Eur J Biochem.* 1994;225:995-1003.
244. Heymach JV, Jr. and Shooter EM. The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells. *The Journal of biological chemistry.* 1995;270:12297-304.
245. Radziejewski C, Robinson RC, DiStefano PS and Taylor JW. Dimeric structure and conformational stability of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Biochemistry.* 1992;31:4431-6.
246. Arakawa T, Haniu M, Narhi LO, Miller JA, Talvenheimo J, Philo JS, Chute HT, Matheson C, Carnahan J, Louis JC and et al. Formation of heterodimers from three neurotrophins, nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of biological chemistry.* 1994;269:27833-9.
247. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B and Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell.* 2003;112:257-69.
248. Lessmann V and Brigadski T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neuroscience research.* 2009;65:11-22.
249. Chiaruttini C, Vicario A, Li Z, Baj G, Braiuca P, Wu Y, Lee FS, Gardossi L, Baraban JM and Tongiorgi E. Dendritic trafficking of BDNF mRNA is mediated by translin and blocked by the G196A (Val66Met) mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106:16481-6.
250. Schmidt-Kastner R, Wetmore C and Olson L. Comparative study of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level suggests multiple roles in hippocampus, striatum and cortex. *Neuroscience.* 1996;74:161-83.
251. Ernfors P, Wetmore C, Olson L and Persson H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron.* 1990;5:511-26.
252. Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J and Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 1990;9:2459-64.
253. Dugich-Djordjevic MM, Peterson C, Isono F, Ohsawa F, Widmer HR, Denton TL, Bennett GL and Hefti F. Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Eur J Neurosci.* 1995;7:1831-9.
254. Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L and Welcher AA. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience.* 1997;78:431-48.
255. Danzer SC and McNamara JO. Localization of brain-derived neurotrophic factor to distinct terminals of mossy fiber axons implies regulation of both excitation and feedforward inhibition of CA3 pyramidal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2004;24:11346-55.
256. Haubensak W, Narz F, Heumann R and Lessmann V. BDNF-GFP containing secretory granules are localized in the vicinity of synaptic junctions of cultured cortical neurons. *J Cell Sci.* 1998;111 (Pt 11):1483-93.

257. Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M and Barde YA. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *The Journal of cell biology*. 2012;196:775-88.
258. Goodman LJ, Valverde J, Lim F, Geschwind MD, Federoff HJ, Geller AI and Hefti F. Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*. 1996;7:222-38.
259. Matsuda N, Lu H, Fukata Y, Noritake J, Gao H, Mukherjee S, Nemoto T, Fukata M and Poo MM. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29:14185-98.
260. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG and Murphy RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:12660-6.
261. Lewin GR and Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annual review of neuroscience*. 1996;19:289-317.
262. Lou H, Kim SK, Zaitsev E, Snell CR, Lu B and Loh YP. Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. *Neuron*. 2005;45:245-55.
263. Wetsel WC, Rodriguiz RM, Guillemot J, Rousset E, Essalmani R, Kim IH, Bryant JC, Marcinkiewicz J, Desjardins R, Day R, Constam DB, Prat A and Seidah NG. Disruption of the expression of the proprotein convertase PC7 reduces BDNF production and affects learning and memory in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:17362-7.
264. Lessmann V, Gottmann K and Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in neurobiology*. 2003;69:341-74.
265. Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H and Lindholm D. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *The EMBO journal*. 1990;9:3545-50.
266. da Penha Berzaghi M, Cooper J, Castren E, Zafra F, Sofroniew M, Thoenen H and Lindholm D. Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1993;13:3818-26.
267. Lindfors N, Ballarin M, Ernfors P, Falkenberg T and Persson H. Stimulation of glutamate receptors increases expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1992;648:296-9.
268. Kuppens E and Beyer C. Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells. *Neuroreport*. 2001;12:1175-9.
269. Mamounas LA, Blue ME, Siuciak JA and Altar CA. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15:7929-39.
270. Zafra F, Castren E, Thoenen H and Lindholm D. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88:10037-41.
271. Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M and Barde YA. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci*. 2008;11:131-3.
272. Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, Lu B and Hempstead BL. Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci*. 2009;12:113-5.
273. Hendry IA, Stockel K, Thoenen H and Iversen LL. The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Res*. 1974;68:103-21.
274. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM and Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci*. 1997;17:2295-313.
275. von Bartheld CS, Wang X and Butowt R. Anterograde axonal transport, transcytosis, and recycling of neurotrophic factors: the concept of trophic currencies in neural networks. *Molecular neurobiology*. 2001;24:1-28.
276. Altar CA and DiStefano PS. Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends in neurosciences*. 1998;21:433-7.
277. Zhong LY, Cayabyab FS, Tang CK, Zheng XL, Peng TH and Lv YC. Sortilin: A novel regulator in lipid metabolism and atherogenesis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016;460:11-7.
278. Chen ZY, Ieraci A, Teng H, Dall H, Meng CX, Herrera DG, Nykjaer A, Hempstead BL and Lee FS. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci*. 2005;25:6156-66.
279. Mazella J. Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal*. 2001;13:1-6.
280. Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T and Barbacid M. Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Molecular and cellular biology*. 1989;9:24-33.
281. Stoilov P, Castren E and 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;290:1054-65.
282. Klein R, Martin-Zanca D, Barbacid M and Parada LF. Expression of the tyrosine kinase receptor gene trkB is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development (Cambridge, England)*. 1990;109:845-50.
283. Luberg K, Wong J, Weickert CS and Timmusk T. Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *Journal of neurochemistry*. 2010;113:952-64.
284. Okada S, Yokoyama M, Toko H, Tateno K, Moriya J, Shimizu I, Nojima A, Ito T, Yoshida Y, Kobayashi Y, Katagiri H, Minamino T and Komuro I. Brain-derived neurotrophic factor protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction via a central nervous system-mediated pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32:1902-9.
285. Klein R, Parada LF, Coulier F and Barbacid M. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *The EMBO journal*. 1989;8:3701-9.

286. Klein R, Conway D, Parada LF and Barbacid M. The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell*. 1990;61:647-56.
287. Haapasalo A, Koponen E, Hoppe E, Wong G and Castren E. Truncated trkB.T1 is dominant negative inhibitor of trkB.TK+-mediated cell survival. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280:1352-8.
288. Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY and 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;16:3123-9.
289. Baxter GT, Radeke MJ, Kuo RC, Makrides V, Hinkle B, Hoang R, Medina-Selby A, Coit D, Valenzuela P and Feinstein SC. Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17:2683-90.
290. Biffo S, Offenhauser N, Carter BD and Barde YA. Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development (Cambridge, England)*. 1995;121:2461-70.
291. Deinhardt K and Chao MV. Trk receptors. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;220:103-19.
292. Foltran RB and Diaz SL. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *Journal of neurochemistry*. 2016;138:204-21.
293. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2006;361:1545-64.
294. Qian X, Riccio A, Zhang Y and Ginty DD. Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron*. 1998;21:1017-29.
295. Panja D, Kenney JW, D'Andrea L, Zalfa F, Vedeler A, Wibrand K, Fukunaga R, Bagni C, Proud CG and Bramham CR. Two-stage translational control of dentate gyrus LTP consolidation is mediated by sustained BDNF-TrkB signaling to MNK. *Cell reports*. 2014;9:1430-45.
296. Harrington AW, Kim JY and Yoon SO. Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22:156-66.
297. Palmada M, Kanwal S, Rutkoski NJ, Gustafson-Brown C, Johnson RS, Wisdom R and Carter BD. c-jun is essential for sympathetic neuronal death induced by NGF withdrawal but not by p75 activation. *The Journal of cell biology*. 2002;158:453-61.
298. Makkerh JP, Ceni C, Auld DS, Vaillancourt F, Dorval G and Barker PA. p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO reports*. 2005;6:936-41.
299. Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR and Hempstead BL. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:32687-95.
300. Bejot Y, Prigent-Tessier A, Cachia C, Giroud M, Mossiat C, Bertrand N, Garnier P and Marie C. Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochem Int*. 2011;58:102-11.

301. Zemel'ko VI, Kozhukharova IV, Kovaleva ZV, Domnina AP, Pugovkina NA, Fridlianskaia, II, Puzanov MV, Anisimov SV, Grinchuk TM and Nikol'skii NN. [BDNF secretion in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, endometrium and adipose tissue]. *Tsitologiya*. 2014;56:204-11.
302. Razavi S, Razavi MR, Zarkesh Esfahani H, Kazemi M and Mostafavi FS. Comparing brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor secretion of induced neurotrophic factor secreting cells from human adipose and bone marrow-derived stem cells. *Dev Growth Differ*. 2013;55:648-55.
303. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR and Gan WB. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*. 2013;155:1596-609.
304. Miwa T, Furukawa S, Nakajima K, Furukawa Y and Kohsaka S. Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *Journal of neuroscience research*. 1997;50:1023-9.
305. Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Beley A, Marie C and Garnier P. Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS One*. 2009;4:e8101.
306. Juric DM, Miklic S and Carman-Krzan M. Monoaminergic neuronal activity up-regulates BDNF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Brain Res*. 2006;1108:54-62.
307. Miklic S, Juric DM and Carman-Krzan M. Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Int J Dev Neurosci*. 2004;22:119-30.
308. Bierlein De la Rosa M, Sharma AD, Mallapragada SK and Sakaguchi DS. Transdifferentiation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-secreting mesenchymal stem cells significantly enhance BDNF secretion and Schwann cell marker proteins. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2017;124:572-582.
309. Wilkins A, Kemp K, Ginty M, Hares K, Mallam E and Scolding N. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem cell research*. 2009;3:63-70.
310. Huang SL, Wang J, He XJ, Li ZF, Pu JN and Shi W. Secretion of BDNF and GDNF from free and encapsulated choroid plexus epithelial cells. *Neurosci Lett*. 2014;566:42-5.
311. Schulte-Herbruggen O, Nassenstein C, Lommatzsch M, Quarcoo D, Renz H and Braun A. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *J Neuroimmunol*. 2005;160:204-9.
312. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H and Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *The Journal of experimental medicine*. 1999;189:865-70.
313. Fauchais AL, Lalloue F, Lise MC, Boumediene A, Preud'homme JL, Vidal E and Jauberteau MO. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol*. 2008;181:3027-38.

314. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN and Sun B. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS letters*. 2000;470:113-7.
315. Vohra PK, Thompson MA, Sathish V, Kiel A, Jerde C, Pabelick CM, Singh BB and Prakash YS. TRPC3 regulates release of brain-derived neurotrophic factor from human airway smooth muscle. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833:2953-2960.
316. Noga O, Englmann C, Hanf G, Grutzkau A, Seybold J and Kunkel G. The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:649-54.
317. Helan M, Aravamudan B, Hartman WR, Thompson MA, Johnson BD, Pabelick CM and Prakash YS. BDNF secretion by human pulmonary artery endothelial cells in response to hypoxia. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;68:89-97.
318. Ricci A, Greco S, Amenta F, Bronzetti E, Felici L, Rossodivita I, Sabbatini M and Mariotta S. Neurotrophins and neurotrophin receptors in human pulmonary arteries. *J Vasc Res*. 2000;37:355-63.
319. Ricci A, Felici L, Mariotta S, Mannino F, Schmid G, Terzano C, Cardillo G, Amenta F and Bronzetti E. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30:12-9.
320. Hiltunen JO, Arumae U, Moshnyakov M and Saarma M. Expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors in developing rat heart. *Circ Res*. 1996;79:930-9.
321. Timmusk T, Belluardo N, Metsis M and Persson H. Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *The European journal of neuroscience*. 1993;5:605-13.
322. Abbasi M, Gupta V, Chitranshi N, You Y, Dheer Y, Mirzaei M and Graham SL. Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Growth Factor Signaling Pathways by Tyrosine Phosphatase Shp2 in the Retina: A Brief Review. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:85.
323. Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*. 2007;12:54-61.
324. Sakane T and Pardridge WM. Carboxyl-directed pegylation of brain-derived neurotrophic factor markedly reduces systemic clearance with minimal loss of biologic activity. *Pharm Res*. 1997;14:1085-91.
325. Wu D and Pardridge WM. Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:254-9.
326. Zhang Y and Pardridge WM. Conjugation of brain-derived neurotrophic factor to a blood-brain barrier drug targeting system enables neuroprotection in regional brain ischemia following intravenous injection of the neurotrophin. *Brain Res*. 2001;889:49-56.
327. Black EAE, Smith PM, McIsaac W and Ferguson AV. Brain-derived neurotrophic factor acts at neurons of the subfornical organ to influence cardiovascular function. *Physiol Rep*. 2018;6:e13704.
328. Ferguson AV and Bains JS. Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24:96-101.
329. Hindmarch C, Fry M, Yao ST, Smith PM, Murphy D and Ferguson AV. Microarray analysis of the transcriptome of the subfornical organ in the rat: regulation by

- fluid and food deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R1914-20.
330. Tang SW, Chu E, Hui T, Helmeste D and Law C. Influence of exercise on serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in healthy human subjects. *Neuroscience letters*. 2008;431:62-5.
331. Currie J, Ramsbottom R, Ludlow H, Nevill A and Gilder M. Cardio-respiratory fitness, habitual physical activity and serum brain derived neurotrophic factor (BDNF) in men and women. *Neuroscience letters*. 2009;451:152-5.
332. Ferris LT, Williams JS and Shen CL. The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function. *Medicine and science in sports and exercise*. 2007;39:728-34.
333. Yu T, Chang Y, Gao XL, Li H and Zhao P. Dynamic Expression and the Role of BDNF in Exercise-induced Skeletal Muscle Regeneration. *International journal of sports medicine*. 2017;38:959-966.
334. Chen MJ and Russo-Neustadt AA. Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Brain research Molecular brain research*. 2005;135:181-93.
335. Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK and Pilegaard H. Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol*. 2009;94:1062-9.
336. De Assis GG, Gasanov EV, de Sousa MBC, Kozacz A and Murawska-Cialowicz E. Brain derived neurotrophic factor, a link of aerobic metabolism to neuroplasticity. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2018;69.
337. Matthews VB, Astrom MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerstrom T, Yfanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK and Febbraio MA. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*. 2009;52:1409-18.
338. Knaepen K, Goekint M, Heyman EM and Meeusen R. Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects. *Sports Med*. 2010;40:765-801.
339. Griffin EW, Mullally S, Foley C, Warmington SA, O'Mara SM and Kelly AM. Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males. *Physiol Behav*. 2011;104:934-41.
340. Szuhany KL, Bugatti M and Otto MW. A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. *J Psychiatr Res*. 2015;60:56-64.
341. Kajiya M, Shiba H, Fujita T, Takeda K, Uchida Y, Kawaguchi H, Kitagawa M, Takata T and Kurihara H. Brain-derived neurotrophic factor protects cementoblasts from serum starvation-induced cell death. *Journal of cellular physiology*. 2009;221:696-706.
342. Makar TK, Bever CT, Singh IS, Royal W, Sahu SN, Sura TP, Sultana S, Sura KT, Patel N, Dhib-Jalbut S and Trisler D. Brain-derived neurotrophic factor gene delivery in an animal model of multiple sclerosis using bone marrow stem cells as a vehicle. *J Neuroimmunol*. 2009;210:40-51.

343. Jiang Y, Wei N, Lu T, Zhu J, Xu G and Liu X. Intranasal brain-derived neurotrophic factor protects brain from ischemic insult via modulating local inflammation in rats. *Neuroscience*. 2011;172:398-405.
344. Rahman F, Himali JJ, Yin X, Beiser AS, Ellinor PT, Lubitz SA, Vasani RS, Magnani JW, McManus DD, Seshadri S and Benjamin EJ. Serum brain-derived neurotrophic factor and risk of atrial fibrillation. *Am Heart J*. 2017;183:69-73.
345. Pius-Sadowska E and Machalinski B. BDNF - A key player in cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;110:54-60.
346. Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, Talvenheimo J, Radka SF, Bennett L, Miller JA and Welcher AA. Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. *Protein Expr Purif*. 1995;6:465-71.
347. Radka SF, Holst PA, Fritsche M and 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 Res*. 1996;709:122-301.
348. Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P and Virchow JC. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiology of aging*. 2005;26:115-23.
349. Manni L, Nikolova V, Vyagova D, Chaldakov GN and Aloe L. Reduced plasma levels of NGF and BDNF in patients with acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 2005;102:169-71.
350. Lorgis L, Amoureux S, de Maistre E, Sicard P, Bejot Y, Zeller M, Vergely C, Sequeira-Le Grand A, Lagrost AC, Berchoud J, Cottin Y and Rochette L. Serum brain-derived neurotrophic factor and platelet activation evaluated by soluble P-selectin and soluble CD-40-ligand in patients with acute myocardial infarction. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010;24:525-30.
351. Golden E, Emiliano A, Maudsley S, Windham BG, Carlson OD, Egan JM, Driscoll I, Ferrucci L, Martin B and Mattson MP. Circulating brain-derived neurotrophic factor and indices of metabolic and cardiovascular health: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *PLoS One*. 2010;5:e10099.
352. Taşçi I, Kutsi Kabul H and Aydoğdu A. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) in cardiometabolic physiology and diseases. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2012;684-688.
353. Ejiri J, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Otsui K, Honjo T, Takahashi M, Ohashi Y, Ichikawa S, Terashima M, Mori T, Awano K, Shinke T, Shite J, Hirata K-i, Yokozaki H, Kawashima S and Yokoyama M. Possible Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Pathogenesis of Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2005;2114-2120.
354. Jiang H, Liu Y, Zhang Y and Chen ZY. Association of plasma brain-derived neurotrophic factor and cardiovascular risk factors and prognosis in angina pectoris. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;415:99-103.
355. Emanuelli C, Meloni M, Hasan W and Habecker BA. The biology of neurotrophins: cardiovascular function. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;220:309-28.
356. Krabbe KS, Mortensen EL, Avlund K, Pedersen AN, Pedersen BK, Jorgensen T and Bruunsgaard H. Brain-derived neurotrophic factor predicts mortality risk in older women. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2009;57:1447-52.

357. Hang P, Zhao J, Cai B, Tian S, Huang W, Guo J, Sun C, Li Y and Du Z. Brain-derived neurotrophic factor regulates TRPC3/6 channels and protects against myocardial infarction in rodents. *International journal of biological sciences*. 2015;11:536-45.
358. Amadio P, Porro B, Sandrini L, Fiorelli S, Bonomi A, Cavalca V, Brambilla M, Camera M, Veglia F, Tremoli E and Barbieri SS. Patho- physiological role of BDNF in fibrin clotting. *Sci Rep*. 2019;9:389.
359. Kaess BM, Preis SR, Lieb W, Beiser AS, Yang Q, Chen TC, Hengstenberg C, Erdmann J, Schunkert H, Seshadri S, Vasani RS, CardioGram, Assimes TL, Deloukas P, Holm H, Kathiresan S, König IR, McPherson R, Reilly MP, Roberts R, Samani NJ and Stewart AF. Circulating brain-derived neurotrophic factor concentrations and the risk of cardiovascular disease in the community. *J Am Heart Assoc*. 2015;4:e001544.
360. Pikula A, Beiser AS, Chen TC, Preis SR, Vargias D, DeCarli C, Au R, Kelly-Hayes M, Kase CS, Wolf PA, Vasani RS and Seshadri S. Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke*. 2013;44:2768-75.
361. Kaess BM, Preis SR, Lieb W, Beiser AS, Yang Q, Chen TC, Hengstenberg C, Erdmann J, Schunkert H, Seshadri S and Vasani RS. Circulating Brain-Derived Neurotrophic Factor Concentrations and the Risk of Cardiovascular Disease in the Community. *J Am Heart Assoc*. 2015;4:1-10.
362. Eyileten C, Zaremba M, Janicki PK, Rosiak M, Cudna A, Kaplon-Cieslicka A, Opolski G, Filipiak KJ, Kosior DA, Mirowska-Guzel D and Postula M. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor is Related to Platelet Reactivity but not to Genetic Polymorphisms within BDNF Encoding Gene in Patients with Type 2 Diabetes. *Med Sci Monit*. 2016;22:69-76.
363. Cai D, Holm JM, Duignan IJ, Zheng J, Xaymardan M, Chin A, Ballard VL, Bella JN and Edelberg JM. BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart. *Physiol Genomics*. 2006;24:191-7.
364. Tasci I, Kabul HK and Aydogdu A. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) in cardiometabolic physiology and diseases. *Anadolu kardiyoloji dergisi : AKD = the Anatolian journal of cardiology*. 2012;12:684-8.
365. Kermani P and Hempstead B. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine*. 2007;17:140-3.
366. Duda DG and Jain RK. Pleiotropy of tissue-specific growth factors: from neurons to vessels via the bone marrow. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:596-8.
367. Kermani P, Rafii D, Jin DK, Whitlock P, Schaffer W, Chiang A, Vincent L, Friedrich M, Shido K, Hackett NR, Crystal RG, Rafii S and Hempstead BL. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB⁺ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:653-63.
368. Mori A, Nishioka Y, Yamada M, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Honma N, Moriyama T and Ishizu A. Brain-derived neurotrophic factor induces angiogenin secretion and nuclear translocation in human umbilical vein endothelial cells. *Pathology, research and practice*. 2018;214:521-526.
369. Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L and Hempstead BL. Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat Genet*. 1996;14:210-3.

370. Fulgenzi G, Tomassoni-Ardori F, Babini L, Becker J, Barrick C, Puverel S and Tessarollo L. BDNF modulates heart contraction force and long-term homeostasis through truncated TrkB.T1 receptor activation. *J Cell Biol.* 2015;210:1003-12.
371. Hiltunen JO, Laurikainen A, Vakeva A, Meri S and Saarma M. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion. *J Pathol.* 2001;194:247-53.
372. Sandhya VK, Raju R, Verma R, Advani J, Sharma R, Radhakrishnan A, Nanjappa V, Narayana J, Somani BL, Mukherjee KK, Pandey A, Christopher R and Prasad TS. A network map of BDNF/TRKB and BDNF/p75NTR signaling system. *J Cell Commun Signal.* 2013;7:301-7.
373. Halade GV, Ma Y, Ramirez TA, Zhang J, Dai Q, Hensler JG, Lopez EF, Ghasemi O, Jin YF and Lindsey ML. Reduced BDNF attenuates inflammation and angiogenesis to improve survival and cardiac function following myocardial infarction in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2013;305:H1830-42.
374. Anastasia A, Deinhardt K, Wang S, Martin L, Nichol D, Irmady K, Trinh J, Parada L, Raffi S, Hempstead BL and Kermani P. Trkb signaling in pericytes is required for cardiac microvessel stabilization. *PLoS One.* 2014;9:e87406.
375. Feng N, Huke S, Zhu G, Tocchetti CG, Shi S, Aiba T, Kaludercic N, Hoover DB, Beck SE, Mankowski JL, Tomaselli GF, Bers DM, Kass DA and Paolocci N. Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:1880-5.
376. Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, Sharif S, Kaplan DR, Tsoulfas P, Parada L and et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *The American journal of pathology.* 1995;147:309-24.
377. Kuzniewska B, Rejmak E, Malik AR, Jaworski J, Kaczmarek L and Kalita K. Brain-derived neurotrophic factor induces matrix metalloproteinase 9 expression in neurons via the serum response factor/c-Fos pathway. *Molecular and cellular biology.* 2013;33:2149-62.
378. Liu P, Sun M and Sader S. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol.* 2006;22 Suppl B:25B-30B.
379. Inoue N, Takeshita S, Gao D, Ishida T, Kawashima S, Akita H, Tawa R, Sakurai H and Yokoyama M. Lysophosphatidylcholine increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH/NADPH oxidase in cultured aortic endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2001;155:45-52.
380. Kim SH, Won SJ, Sohn S, Kwon HJ, Lee JY, Park JH and Gwag BJ. Brain-derived neurotrophic factor can act as a pronecrotic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *J Cell Biol.* 2002;159:821-31.
381. Young JL, Libby P and Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2002;88:554-67.
382. Palomo I, Toro C and Alarcon M. The role of platelets in the pathophysiology of atherosclerosis (Review). *Mol Med Rep.* 2008;1:179-84.
383. Kraemer R, Baker PJ, Kent KC, Ye Y, Han JJ, Tejada R, Silane M, Upmacis R, Deeb R, Chen Y, Levine DM and Hempstead B. Decreased neurotrophin TrkB receptor expression reduces lesion size in the apolipoprotein E-null mutant mouse. *Circulation.* 2005;112:3644-53.

384. Ejiri J, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Otsui K, Honjo T, Takahashi M, Ohashi Y, Ichikawa S, Terashima M, Mori T, Awano K, Shinke T, Shite J, Hirata K, Yokozaki H, Kawashima S and Yokoyama M. Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;112:2114-20.
385. Kraemer R, Baker PJ, Kent CK, Ye Y, Han JJ, Tejada R, Silane M, Upmacis R, Deeb R, Chen Y, Levine DM and Hempstead B. Decreased Neurotrophin TrkB Receptor Expression Reduces Lesion Size in the Apolipoprotein E-Null Mutant Mouse. *Circulation*. 2005:3644-3653.
386. Turck P and Frizzo ME. Riluzole stimulates BDNF release from human platelets. *BioMed research international*. 2015;2015:189307.
387. Weinstein G, Beiser AS, Choi SH, Preis SR, Chen TC, Vorgas D, Au R, Pikula A, Wolf PA, DeStefano AL, Vasan RS and Seshadri S. Serum brain-derived neurotrophic factor and the risk for dementia: the Framingham Heart Study. *JAMA Neurol*. 2014;71:55-61.
388. Leenen FH and Tuana BS. Cardioprotective brain mechanisms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32:1749-50.
389. Hochstrasser T, Ehrlich D, Sperner-Unterweger B and Humpel C. Antidepressants and anti-inflammatory drugs differentially reduce the release of NGF and BDNF from rat platelets. *Pharmacopsychiatry*. 2013;46:29-34.
390. Watanabe K, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Yoshinaga T, Ono T, Tateno M, Watanabe I, Shirasaka T, Saito S and Saito T. Effect of antidepressants on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release from platelets in the rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34:1450-4.
391. Mammadova-Bach E, Mauler M, Braun A and Duerschmied D. Autocrine and paracrine regulatory functions of platelet serotonin. *Platelets*. 2018;29:541-548.
392. Stoll P, Plessow A, Bratke K, Virchow JC and Lommatzsch M. Differential effect of clopidogrel and aspirin on the release of BDNF from platelets. *J Neuroimmunol*. 2011;238:104-6.
393. Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA and Diodati JG. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2007;28:1702-8.
394. Lordkipanidze M, Pharand C, Nguyen TA, Schampaert E, Palisaitis DA and Diodati JG. Comparison of four tests to assess inhibition of platelet function by clopidogrel in stable coronary artery disease patients. *Eur Heart J*. 2008;29:2877-85.
395. Jiang H, Wang R, Liu Y, Zhang Y and Chen ZY. BDNF Val66Met polymorphism is associated with unstable angina. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2009;400:3-7.
396. Stahelova A, Petrakova J, Motakova N, Taborsky M, Mrazek F and Petrek M. The BDNF Val66Met polymorphism is not associated with myocardial infarction in Czech patients. *Cytokine*. 2011;53:13-4.
397. Amadio P, Colombo GI, Tarantino E, Gianellini S, Ieraci A, Brioschi M, Banfi C, Werba JP, Parolari A, Lee FS, Tremoli E and Barbieri SS. BDNFVal66met polymorphism: a potential bridge between depression and thrombosis. *European heart journal*. 2017;38:1426-1435.

398. Yacoub D, Theoret JF, Villeneuve L, Abou-Saleh H, Mourad W, Allen BG and Merhi Y. Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release. *J Biol Chem.* 2006;281:30024-35.
399. Lordkipanidze M, Lowe GC, Kirkby NS, Chan MV, Lundberg MH, Morgan NV, Bem D, Nisar SP, Leo VC, Jones ML, Mundell SJ, Daly ME, Mumford AD, Warner TD and Watson SP. Characterization of multiple platelet activation pathways in patients with bleeding as a high-throughput screening option: use of 96-well Optimul assay. *Blood.* 2014;123:e11-22.
400. Lordkipanidze M. Platelet Function Tests. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 2016;42:258-67.
401. Gross L, Aradi D and Sibbing D. Platelet Function Testing in Patients on Antiplatelet Medications. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 2016;42:306-20.
402. Blair TA, Moore SF and Hers I. Circulating primers enhance platelet function and induce resistance to antiplatelet therapy. *J Thromb Haemost.* 2015;13:1479-93.
403. Usta C, Turgut NT and Bedel A. How abciximab might be clinically useful. *International journal of cardiology.* 2016;222:1074-1078.
404. Cazorla M, Jouvenceau A, Rose C, Guilloux JP, Pilon C, Dranovsky A and Premont J. Cyclotraxin-B, the first highly potent and selective TrkB inhibitor, has anxiolytic properties in mice. *PloS one.* 2010;5:e9777.
405. Alexander SP, Fabbro D, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C and Davies JA. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Catalytic receptors. *British journal of pharmacology.* 2017;174 Suppl 1:S225-s271.
406. Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K and Markesbery WR. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1995;65:1740-51.
407. Hachem A, Yacoub D, Zaid Y, Mourad W and Merhi Y. Involvement of nuclear factor kappaB in platelet CD40 signaling. *Biochemical and biophysical research communications.* 2012;425:58-63.
408. Kim H, Li Q, Hempstead BL and 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;279:33538-46.
409. Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K and Parada LF. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell.* 1991;65:895-903.
410. Tajbakhsh A, Mokhtari-Zaer A, Rezaee M, Afzaljavan F, Rivandi M, Hassanian SM, Ferns GA, Pasdar A and Avan A. Therapeutic Potentials of BDNF/TrkB in Breast Cancer; Current Status and Perspectives. *Journal of cellular biochemistry.* 2017;118:2502-2515.
411. Hertzog MA. Considerations in determining sample size for pilot studies. *Res Nurs Health.* 2008;31:180-91.
412. Fraker TD, Jr., Fihn SD, Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K, Daley J, Deedwania PC, Douglas JS, Ferguson TB, Jr., Fihn SD, Fraker TD, Jr., Gardin JM, O'Rourke RA, Williams SV, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Buller

CE, Creager MA, Ettinger SM, Halperin JL, Hunt SA, Krumholz HM, Kushner FG, Lytle BW, Nishimura R, Page RL, Riegel B, Tarkington LG and Yancy CW. 2007 chronic angina focused update of the ACC/AHA 2002 Guidelines for the management of patients with chronic stable angina: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Writing Group to develop the focused update of the 2002 Guidelines for the management of patients with chronic stable angina. *Circulation*. 2007;116:2762-72.

413. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, Jr., Chavey WE, 2nd, Fesmire FM, Hochman JS, Levin TN, Lincoff AM, Peterson ED, Theroux P, Wenger NK, Wright RS, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Halperin JL, Hunt SA, Krumholz HM, Kushner FG, Lytle BW, Nishimura R, Ornato JP, Page RL and Riegel B. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non ST-Elevation Myocardial Infarction): developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons: endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *Circulation*. 2007;116:e148-304.

414. Smith SC, Jr., Feldman TE, Hirshfeld JW, Jr., Jacobs AK, Kern MJ, King SB, 3rd, Morrison DA, O'Neil WW, Schaff HV, Whitlow PL, Williams DO, Antman EM, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL and Riegel B. ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *Circulation*. 2006;113:e166-286.

415. Brass LF, Zhu L and Stalker TJ. Minding the gaps to promote thrombus growth and stability. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:3385-92.

416. Shen B, Delaney MK and Du X. Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24:600-6.

417. Fujinami A, Ohta K, Obayashi H, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Kozai H, Imai S and Ohta M. Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship to glucose metabolism and biomarkers of insulin resistance. *Clin Biochem*. 2008;41:812-7.

418. Chen B, Dowlathshahi D, MacQueen GM, Wang JF and Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*. 2001;50:260-5.

419. Eyiletten C, Kaplon-Cieslicka A, Mirowska-Guzel D, Malek L and Postula M. Antidiabetic Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Association with Inflammation in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2017;2017:2823671.

420. Hristova MG. Metabolic syndrome and neurotrophins: effects of metformin and non-steroidal antiinflammatory drug treatment. *Eurasian J Med*. 2011;43:141-5.

421. Allard JS, Perez EJ, Fukui K, Carpenter P, Ingram DK and de Cabo R. Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 2016;301:1-9.
422. Boyuk B, Degirmencioglu S, Atalay H, Guzel S, Acar A, Celebi A, Ekizoglu I and Simsek C. Relationship between levels of brain-derived neurotrophic factor and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res.* 2014;2014:978143.
423. Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Rasmussen P, Erikstrup C, Fischer CP, Lindegaard B, Petersen AM, Taudorf S, Secher NH, Pilegaard H, Bruunsgaard H and Pedersen BK. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2007;50:431-8.
424. Sustar A, Perkovic MN, Erjavec GN, Strac DS and Pivac N. Association between reduced brain-derived neurotrophic factor concentration & coronary heart disease. *Indian J Med Res.* 2019;150:43-49.
425. Polacchini A, Metelli G, Francavilla R, Baj G, Florean M, Mascaretti LG and Tongiorgi E. A method for reproducible measurements of serum BDNF: comparison of the performance of six commercial assays. *Sci Rep.* 2015;5:17989.
426. Naegelin Y, Dingsdale H, Sauberli K, Schadelin S, Kappos L and Barde YA. Measuring and Validating the Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Human Serum. *eNeuro.* 2018;5.
427. Iughetti L, Casarosa E, Predieri B, Patianna V and Luisi S. Plasma brain-derived neurotrophic factor concentrations in children and adolescents. *Neuropeptides.* 2011;45:205-11.
428. Gejl AK, Enevold C, Bugge A, Andersen MS, Nielsen CH and Andersen LB. Associations between serum and plasma brain-derived neurotrophic factor and influence of storage time and centrifugation strategy. *Sci Rep.* 2019;9:9655.
429. Landolfi R, De Cristofaro R, De Candia E, Rocca B and Bizzi B. Effect of fibrinogen concentration on the velocity of platelet aggregation. *Blood.* 1991;78:377-81.
430. Kaess BM, Preis SR, Lieb W, Beiser AS, Yang Q, Chen TC, Hengstenberg C, Erdmann J, Schunkert H, Seshadri S, Vasani RS, Assimes TL, Deloukas P, Holm H, Kathiresan S, König IR, McPherson R, Reilly MP, Roberts R, Samani NJ and Stewart AF. Circulating brain-derived neurotrophic factor concentrations and the risk of cardiovascular disease in the community. *J Am Heart Assoc.* 2015;4:e001544.
431. Burnouf T, Kuo YP, Blum D, Burnouf S and Su CY. Human platelet concentrates: a source of solvent/detergent-treated highly enriched brain-derived neurotrophic factor. *Transfusion.* 2012;52:1721-8.
432. Ruiz-Leon Y and Pascual A. Brain-derived neurotrophic factor stimulates beta-amyloid gene promoter activity by a Ras-dependent/AP-1-independent mechanism in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry.* 2001;79:278-85.
433. Harper MT and Poole AW. PKC inhibition markedly enhances Ca²⁺ signaling and phosphatidylserine exposure downstream of protease-activated receptor-1 but not protease-activated receptor-4 in human platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2011;9:1599-607.
434. Laszlo A, Lenart L, Illesy L, Fekete A and Nemcsik J. The role of neurotrophins in psychopathology and cardiovascular diseases: psychosomatic connections. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996).* 2019;126:265-278.

435. Liu Y, Sun L, Huan Y, Zhao H and Deng J. Application of bFGF and BDNF to improve angiogenesis and cardiac function. *The Journal of surgical research*. 2006;136:85-91.
436. Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ, Buitelaar JK, Kenis G, Prickaerts J, Elzinga BM and Voshaar RC. Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36:228-39.
437. Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM and Bertschy G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biological psychiatry*. 2005;57:1068-72.