

Université de Montréal

**Implication des protéines kinases C
dans l'activation et la fonction plaquettaire**

par

Daniel Yacoub

Département de Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître
en Sciences biomédicales

Juillet, 2005

© Daniel Yacoub, 2005



W

4

U58

2005

V. 183

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulée :

Implication des protéines kinases C
dans l'activation et la fonction plaquettaire

présentée par :
Daniel Yacoub

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Éric Thorin, président-rapporteur
Dr. Yahye Merhi, directeur de recherche
Dr. Janos G. Filep, membre du jury



Résumé

Introduction – Les protéines kinases C (PKC) constituent une famille ubiquitaire de kinases sérine/thréonine qui joue un rôle primordial dans le contrôle et la régulation de divers mécanismes cellulaires. Dans les plaquettes, plusieurs isoformes de PKCs sont exprimées, mais leur implication spécifique dans la régulation de la fonction plaquettaire demeure inconnue.

Résultats- En utilisant des plaquettes humaines fraîchement isolées à partir de sujets sains, nous démontrons que la nouvelle isoforme PKC δ est essentielle à l'agrégation et l'activation de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ plaquettaire induites au collagène, tandis que ces fonctions plaquettaires à la thrombine requièrent la présence de plusieurs isoformes de PKCs. Néanmoins, la PKC δ semble être impliquée de manière différentielle dans la signalisation plaquettaire à la thrombine, où elle joue un rôle important dans l'agrégation plaquettaire à PAR-1 mais non à PAR-4. L'étude de l'activité enzymatique de la PKC δ , telle que mesurée par sa phosphorylation et sa translocation vers la membrane plasmique suite à l'activation au collagène et à la thrombine, nous indique que cette isoforme est positivement régulée par l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$. De plus, la PKC δ déclenche l'activation de la voie signalétique de la MEK/ERK, essentielle à l'activation et l'agrégation plaquettaire au collagène.

Conclusion- Cette étude caractérise le rôle de la PKC δ dans la signalisation plaquettaire, en soulignant son importance dans l'activation et l'agrégation plaquettaire au collagène et à PAR-1. De plus, nous identifions la présence d'un mécanisme de régulation entre la PKC δ et l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$, jamais décrit auparavant.

Mots clés : PKC, Plaquettes, agrégation, P-sélectine, $\alpha_{11b}\beta_3$

Abstract

In platelets many PKC isoforms are expressed but their relative contribution to platelet function is still unknown. Using isolated human platelets, we report that the novel PKC δ isoform is an essential mediator involved in collagen-induced platelet aggregation and cell activation of integrin α IIb β 3, while thrombin utilizes multiple PKC isoforms to achieve these functions. Interestingly, PKC δ plays differential roles in thrombin-mediated signaling, where it appears to be involved in PAR1- but not PAR4-induced platelet aggregation. Analysis of enzymatic activity, as measured by protein phosphorylation and translocation to the cell membrane upon activation by both thrombin and collagen, indicate that PKC δ is positively regulated by integrin α IIb β 3. In addition, PKC δ triggers activation of the MEK/ERK signaling pathway essential for collagen-induced platelet activation and aggregation. This study adds new insights into the role of PKC δ in platelet signaling and function, and reveals its importance in collagen- and PAR-1, but not PAR-4-induced platelet activation and aggregation. In addition, this study reveals the existence of a new regulatory mechanism in platelets where integrin α IIb β 3 signaling is required to sustain the activity of PKC δ .

Key words: PKC, platelet, aggregation, P-selectin, α IIb β 3

Table des matières

Résumé		iii
Abstract		iv
Table des matières		v
Liste des tableaux		vii
Liste des figures		viii
Liste des abréviations		x
Remerciements		xiv
Introduction		1
Chapitre 1 : Les plaquettes		4
1.1	Composition et fonction du sang	4
1.2	Origine et structure des plaquettes	6
1.3	Molécules d'adhésion plaquettaire	10
	1.3.1 La GPVI	11
	1.3.2 L'intégrine $\alpha_2\beta_1$	13
	1.3.3 La GPIb/IX/V	14
	1.3.4 L'intégrine $\alpha_2\beta_3$	16
	1.3.5 La P-sélectine	18
1.4	Fonction plaquettaire	20
	1.4.1 Adhésion plaquettaire à l'endothélium	21
	1.4.2 Activation plaquettaire	23
	1.4.3 Sécrétion plaquettaire	25
	1.4.4 Agrégation plaquettaire	28
1.5	Signalisation plaquettaire	31
	1.5.1 La GPVI	32
	1.5.2 L'intégrine $\alpha_2\beta_1$	34
	1.5.3 La GPIb/IX/X	35
	1.5.4 Les PARs	38
	1.5.5 L'intégrine $\alpha_2\beta_3$	42

Chapitre 2:	Les Protéines kinases C	46	
2.1	Structure et fonction des Protéines kinases C	46	
2.2	Activation et régulation des Protéines kinases C	53	
2.3	Voies de signalisations dépendantes des Protéines kinases C	62	
2.4	Rôle des Protéines kinases C dans la fonction plaquettaire	67	
	2.4.1	Activation	68
	2.4.2	Sécrétion	69
	2.4.3	Agrégation	72
	Problématique et hypothèse	74	
	Contribution originale	75	
	Discussion et conclusion	105	
	Directives futures	112	
	Bibliographie	113	

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Constituants et fonction du sang

Tableau 1.2 : Principaux constituants des granules plaquettaires

Tableau 2.1 : Distribution tissulaire et facteurs d'activation requis pour les PKCs

Tableau 2.2 : Protéines d'interaction des PKCs récemment identifiées

Liste des figures

- Figure 1 : Les trois modèles proposés pour la production des plaquettes à partir des mégacaryocytes
- Figure 2 : Structure du cytosquelette plaquettaire
- Figure 3 : Structure de la GPVI
- Figure 4 : Structure du complexe GPIb/IX/V
- Figure 5 : Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$
- Figure 6 : La famille des sélectines
- Figure 7 : Molécules d'adhésion impliquées dans l'adhésion, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire
- Figure 8 : Schématisation des principales étapes et des molécules d'adhésion impliquées dans l'adhésion plaquettaire.
- Figure 9 : Mécanismes moléculaires de la sécrétion plaquettaire
- Figure 10 : Rôle de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaire
- Figure 11 : Modèle des mécanismes de signalisation déclenchés par l'activation de GPVI
- Figure 12 : Modèle des mécanismes signalétiques déclenchés par le complexe GPIb/IX/V suite à la liaison du VWF
- Figure 13 : Cascade signalétique intracellulaire via les PARs
- Figure 14 : Rôle de PAR1 et PAR4 dans la signalisation plaquettaire à la thrombine
- Figure 15 : Mécanismes de la signalisation plaquettaire outside-in de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$
- Figure 16 : Structure des domaines régulateurs et catalytiques des PKCs
- Figure 17 : Mécanismes d'action des protéines interagissant avec les PKCs
- Figure 18 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires de l'activation des PKCs

Figure 19 : Mécanismes signalétiques découlant de l'activation des PKCs

Figure 20 : Schématisation du rôle de la PKC δ dans l'activation plaquettaire à l'alloaggrégine

Liste des abréviations

5-HT:	Sérotonine
ADP :	Adénosine diphosphate
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1:	Protéine activatrice -1
ATP :	Adénosine triphosphate
Btk:	Tyrosine kinase de Bruton
CHO :	Ovaire d'hamster chinois
DAG :	Diacylglycérol
EGF:	Facteur de croissance épidermal
ERK1/2 :	Kinase extracellulaire régulatrice du signal
FAK :	Kinase d'adhésion focale
GEF :	Facteur échangeur nucléotidique guanilique
I κ B:	Inhibiteur de κ B
IKKs:	Kinases I κ B
IP ₃ :	Inositol 1,4,5-trisphosphate
ITAM :	Motifs activateur des immunorécepteurs à base de tyrosine
JNK:	Protéine kinase N-terminale C-Jun
MARCKS:	Substrat des kinases C riche en alanine myristoylé
MAPK :	Protéine kinase activatrice mitogène
MEK1/2 :	Protéine kinase kinase activatrice mitogène
NF- κ B:	Facteur nucléaire - κ B

Liste des abréviations (suite)

NSF :	Facteur sensitif au N-éthylmaléimide
NO :	Oxide nitrique
PAF :	Facteur d'activation plaquettaire
PAR-1,-4 :	Récepteurs-1,4 activateurs des proteases
PC :	Phosphatidylcholine
PGI ₂ :	Prostacycline
PI :	Phosphatidylinositol
PIP ₂ :	Bisphosphate-4,5 phosphatidylinositol
PIP ₃ :	Trisphosphate-4,5 phosphatidylinositol
PKC :	Protéine kinase C
PLA ₂ :	Phospholipase A ₂
PLC :	Phospholipase C
PLD :	Phospholipase D
PMA :	Méristate phorbol acétate
PS :	Phosphatidylsérine
PSGL-1 :	Ligand-1 glycoprotéique de la P-sélectine
PSI :	Plexines, sémaphorines, et intégrines
RACKs :	Récepteurs activateurs des kinases C
SNAP :	Protéine soluble associée au NSF
SNARE :	Récepteurs de SNAP
STICKs :	Substrats qui interagissent avec les kinases C
TXA ₂ :	Thromboxane A ₂



VWF: Facteur Von Willebrand



*À ma mère qui a toujours su m'encourager
et m'inspirer au fil des années,
merci beaucoup et je t'aime.*

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier sincèrement mon directeur de recherche Dr. Yayhe Merhi pour m'avoir consacré temps et attention tout au long de ce projet de maîtrise.

Je désire également exprimer ma gratitude envers mes collègues de travail, Jean-François Théorêt et Haissam Abou-Saleh, pour leur assistance et leur contribution à la réalisation des multiples expériences entourant ce projet.

Merci aussi à notre technicienne de laboratoire, Nathalie Jacob, pour son excellent soutien technique.

À vous tous,

Merci

Introduction

Les plaquettes contribuent au maintien de l'hémostase vasculaire et sont activement impliquées dans plusieurs complications pathologiques, telles que la thrombose, la resténose et l'inflammation. Les réactions plaquettaires sont gouvernées par une série de molécules d'adhésion spécifiques qui induisent des interactions homo- et hétérotypiques avec d'autres plaquettes, les leucocytes, les cellules endothéliales et la matrice sous-endothéliale.¹⁻⁵

L'adhésion plaquettaire aux surfaces vasculaires endommagées représente la première étape de la thrombogénèse. Ce contact initial est médié par des interactions entre le complexe plaquettaire GPIIb/IX/V et le facteur de von Willebrand (vWF)⁶ (hautes forces de cisaillements) et par l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ et le collagène⁷ (faibles forces de cisaillements). Par la suite, ces interactions déclenchent la signalisation et l'activation plaquettaire, ce qui mène ultimement à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et à la formation d'un agrégat plaquettaire.⁸

La signalisation plaquettaire peut être induite par le processus de l'adhésion lui-même, mais aussi par une variété d'agonistes plaquettaire.⁹⁻¹¹ La thrombine et le collagène représentent les agonistes physiologiques les plus puissants qui déclenchent l'activation cellulaire via leurs récepteurs membranaires spécifiques, les PARs (proteinase-activated receptors) et la GPVI respectivement.¹² Dans les plaquettes humaines, la stimulation de PAR-1 et PAR-4 induit l'activation des protéines G et de la phospholipase C β (PLC β), tandis que la stimulation au collagène provoque l'activation des tyrosines kinases Src et Syk, et de la PLC γ via GPVI.^{13,14} La PLC, par l'hydrolyse de la phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), génère les seconds messagers diacylglycérol

(DAG) et inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). À son tour, l'IP₃ provoque le relargage du calcium intracellulaire, tandis que le DAG est responsable de l'activation des PKCs. L'activation de ces deux voies signalétiques résulte en une phosphorylation des résidus sérine/thréonine de la chaîne légère de la myosine par une protéine kinase dépendante du Ca²⁺ et de la calmoduline, et en une phosphorylation de la plekstrine par les PKCs.

Les protéines kinases C (PKC) constituent une famille ubiquitaire de kinases sérine/thréonine qui joue un rôle primordial dans le contrôle et la régulation de divers mécanismes cellulaires. Cette famille comprend 12 isoformes classées en trois sous-groupes structurellement et fonctionnellement distincts.¹⁵⁻¹⁸ Les isoformes conventionnelles (PKC α , PKC β I, PKC β II et PKC γ) sont régulées par le Ca²⁺ et le DAG, les isoformes de la classe nouvelle (PKC δ , PKC ϵ , PKC θ et PKC η) sont insensibles au Ca²⁺ et les isoformes atypiques (PKC ζ et PKC ι/λ) sont insensibles au Ca²⁺ et au DAG.¹⁹ Bien que les PKCs partagent un fort degré d'homologie, on considère que chacune de ces isoformes occupe une fonction particulière dans les différents tissus de l'organisme.

Dans les plaquettes, quelques études pointent vers l'importance des PKCs dans la sécrétion granulaire et l'agrégation plaquettaire. Tout récemment, il a été démontré que la PKC α est impliqué dans l'agrégation plaquettaire induite au calcium.²⁰ Par ailleurs, il semble que la PKC θ et la PKC δ puissent interagir avec les tyrosines kinases Btk et Fyn respectivement, afin de réguler l'activité kinase de chacune d'elles.^{21,22} La PKC δ semble aussi être impliquée dans la sécrétion des granules denses suite à l'activation plaquettaire.²³ Nous avons récemment démontré que l'expression de la P-sélectine est dépendante des PKCs et que leur inhibition abolit totalement la liaison des plaquettes aux neutrophiles, en plus d'empêcher l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et l'agrégation

plaquettaire à la thrombine.²⁴ L'activation de la P-sélectine à la thrombine serait dépendante des nouvelles isoformes ϵ, η , et ζ , et non des isoformes conventionnelles α et β .²⁴ En dépit de ces études, le rôle spécifique des différentes isoformes de PKCs dans la fonction plaquettaire est mal élucidé. Par exemple, il est bien établi que l'activation et l'agrégation plaquettaire au collagène, via GPVI, dépendent des tyrosines kinases Syk et de la PLC γ_2 ,^{25,26} mais la contribution spécifique des isoformes de PKCs ainsi que leurs effecteurs en aval dans ce phénomène sont mal caractérisés.

Cette étude vise à étudier le rôle des PKCs, en particulier la PKC δ , dans l'activation et l'agrégation plaquettaire. En utilisant le collagène et la thrombine comme les deux plus puissants agonistes physiologiques plaquettaires, nous démontrons que la PKC δ est essentielle à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et à l'agrégation plaquettaire au collagène, tandis qu'à la thrombine, ces mécanismes sont régulés par plus d'une isoforme de PKC. De plus, nous identifions ici la présence d'un mécanisme d'inter-régulation entre l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et la PKC δ , observé dans la signalisation au collagène et à la thrombine.

Chapitre II

Les Plaquettes

1.1 Composition et fonction du sang

Le sang est un tissu conjonctif complet qui contribue au maintien de l'homéostasie et sert de véhicule pour le transport de tout matériel essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. Il représente 8% du poids total du corps humain et comprend un volume d'environ 5 litres chez la femme et 5.5 litres chez l'homme. Le sang est principalement constitué de trois types d'éléments cellulaires spécialisés, soit les érythrocytes (globules rouges), les leucocytes (globules blancs), et les plaquettes (thrombocytes), suspendus dans un milieu liquide nommé le plasma.

Le plasma représente environ 55% du volume sanguin total et est principalement constitué de substances organiques et inorganiques qui exercent un effet osmotique important à la distribution et aux échanges entre les fluides du milieu extracellulaire et ceux du milieu interstitiel. Le plasma contient principalement trois importantes protéines plasmatiques, soit l'albumine, la globuline et le fibrinogène. Le sang assure trois fonctions principales essentielles au bon maintien de l'organisme²⁷ :

- Le transport : constitue un véhicule pour le transport de nutriments, des gaz et de déchets métaboliques
- La régulation : système de tampon qui assure l'équilibre du pH et régulation de la température corporelle du corps humain
- La protection : par le biais de ses éléments cellulaires, le sang assure la défense de l'organisme contre toute infection (leucocytes) et minimise la perte de sang et l'hémorragie suite à un endommagement vasculaire.

Le tableau 1.1 résume les principaux constituants du sang ainsi que leurs fonctions premières.

Tableau 1.1: Constituants et fonctions du sang

Constituants	Fonctions
PLASMA (55 %)	
Eau	Milieu de transport pour les matériaux
Électrolytes	Excitabilité membranaire, distribution osmotique des fluides entre les membranes, tampon pour les variations de pH
Protéines plasmatiques	
Albumines	Transport de substances, contribue au maintien de la pression osmotique
Globulines	Transport de substance, facteurs de coagulation, anticorps
Fibrinogène	Coagulation
ÉLÉMENTS CELLULAIRE (45%)	
Érythrocytes	Transport de l'oxygène
Leucocytes	
Neutrophiles	Phagocytose, cellules inflammatoires
Éosinophiles	Allergies, défense contre les parasites
Basophiles	Allergies, relâche l'histamine et l'héparine
Monocytes	Se différencie en macrophage (phagocytose)
Lymphocytes	
B	Réponse immunitaire humorale (anticorps)
T	Réponse immunitaire cellulaire
Plaquettes	Hémostase

Le sang circule à l'intérieur d'un réseau de conduits hautement spécialisé, nommé les vaisseaux sanguins. Il existe trois types de vaisseaux sanguins, soit les artères, les veines, et les capillaires. Les artères amènent le sang oxygéné (à l'exception des artères pulmonaires) du cœur au différents tissus de l'organisme, tandis que les veines ramènent le sang des tissus au cœur. Les capillaires, quant eux, assurent la connexion entre les

artères et les veines et représentent le site d'échange de matériels entre le sang et les tissus. La paroi des vaisseaux sanguins est composée de trois couches : la tunique interne ou intima, la tunique moyenne ou média et la tunique externe ou adventice.

L'intima est la couche la plus interne et est constituée d'une monocouche de cellules épithéliales lisses, l'endothélium. L'endothélium est le seul élément cellulaire de l'organisme à être en contact avec le sang et constitue un élément régulateur crucial du système vasculaire (contrôle de la pression sanguine, relâche de l'oxyde nitrique (NO) et de la prostacycline (PGI₂), etc.). Sous l'endothélium, repose une matrice extracellulaire qui contient plusieurs protéines adhésives essentielles à l'adhésion des plaquettes suite à un accident vasculaire.^{28,29}

La média est principalement composée d'une couche de cellules musculaires lisses, de tissus fibreux et de fibroblastes. Cette couche joue un rôle important dans la régulation de la pression sanguine.³⁰

L'adventice, composé de tissu conjonctif, contient des fibres de collagènes qui permettent au vaisseau de se dilater et de reprendre sa forme initiale. En outre, la tunique externe des gros vaisseaux comporte des neurofibres et de minuscules vaisseaux sanguins.³¹

1.2 Origine et structure des plaquettes

Les plaquettes furent découvertes en 1882 par le chercheur italien Giulio Bizzozero.^{32,33} Il fut le premier à les identifier anatomiquement en plus de leur attribuer un rôle dans l'hémostase et la thrombose vasculaire.³⁴ Bizzozero fut aussi le premier à identifier les mégacaryocytes issus de la moelle osseuse, tout en ignorant que ces

dernières étaient les cellules précurseurs des plaquettes.³⁵ À l'heure actuelle, les plaquettes occupent une place primordiale dans l'hémostase physiologiques mais aussi dans plusieurs conditions pathologiques, comme la thrombose vasculaire, l'athérosclérose, l'inflammation, l'immunité, l'oncologie, les maladies coronariennes (première cause de décès dans les pays développés), les accidents cérébraux vasculaires, le diabète, la glomérulonéphrite rénale, les maladies psychiatriques, et autres.

Les plaquettes sont des cellules anucléés (dépourvues de noyau) issues de cellules hautement spécialisées, nommées les mégacaryocytes, qui se développent à partir d'une cellule souche pluripotente, selon le modèle hématopoïétique suivant :^{36,37}

CFU-GEMM → BFU-Meg → CFU-Meg → Promégacaryoblaste →
Mégacaryoblaste → Promégacaryocytes → Mégacaryocytes → Plaquettes

CFU-GEMM: *colony-forming unit-granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte*

BFU-Meg: *burst-forming unit megakaryocyte*

CFU-Meg: *colony-forming unit megakaryocyte*

Les mécanismes par lesquels les mégacaryocytes donnent naissance aux plaquettes ont longtemps fasciné chercheurs et hématologistes à travers le monde. À ce jour, trois modèles ont été proposés : le modèle de la défragmentation cytoplasmique, celui du bourgeonnement membranaire et celui de la formation pro-plaquettaire (Figure 1). Au cours de la défragmentation cytoplasmique, des plaquettes matures seraient pré-assemblées dans le cytoplasme de la cellule mégacaryocytaire. Les plaquettes seraient, par la suite, relâchées dans le milieu extracellulaire suite à une défragmentation cytoplasmique.^{38,39} Dans le modèle du bourgeonnement membranaire, les plaquettes seraient attachées à la membrane des mégacaryocytes, puis, par la suite, clivées de la périphérie et relâchées dans la circulation.^{40,41} Finalement, les données expérimentales

acquises au cours des années pointent vers le modèle de la formation pro-plaquettaire, où les mégacaryocytes formeraient de longues extensions cytoplasmiques, au bout desquelles reposeraient des pseudo-plaquettes en forme de perles.^{42,43}

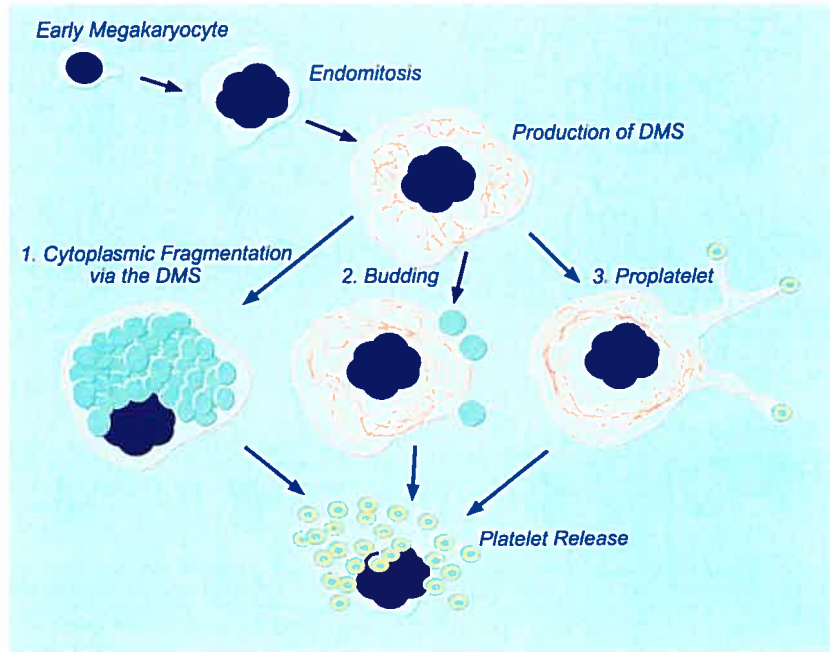


Figure 1: Les trois modèles proposés pour la production de plaquettes à partir des mégacaryocytes. (Alan D. Michelson. *Platelets*. 2002.)

Les plaquettes circulent dans le sang sous forme discoïde ayant une dimension de $3 \times 0.5 \mu\text{m}$. La demi-vie des plaquettes est d'environ 7 jours et leur élimination s'effectue au niveau du foie et de la rate, et parfois même par le système réticulo-endothélial.⁴⁴ Les plaquettes sont dépourvues de noyau et leur contenu cytoplasmique se limite principalement à un nombre important de granules spécifiques, ainsi qu'à des organelles cellulaires typiques, telles que des mitochondries, des lysosomes et des membranes résiduelles du réticulum endoplasmique.⁴⁵ La structure des plaquettes peut être divisée en trois composantes essentielles soit, la membrane, le cytosquelette et les granules de sécrétion.

La membrane plasmique des plaquettes est lisse et ne présente que quelques invaginations membranaires formant ce qu'on appelle le système caniculaire ouvert (Open canicular system). Ces invaginations représentent un système de conduit élaboré permettant l'entrée de petites molécules à l'intérieur de la cellule. Au cours de l'activation plaquettaire, le système caniculaire ouvert sert de conduit membranaire par lequel les granules cytoplasmiques s'y fusionnent et déverse leur contenu dans le milieu extracellulaire. Comme pour toute autre cellule, la membrane plasmique des plaquettes constitue aussi un lieu d'ancrage pour une variété de récepteurs et de molécules d'adhésion essentiels au fonctionnement de la cellule.⁴⁶

Le cytosquelette plaquettaire est une composante intégrale de la cellule, puisqu'il confère aux plaquettes leur forme, leur permet de résister aux forces de cisaillement générées par le débit sanguin, permet l'ancrage de différentes glycoprotéines membranaires et représente le siège d'une multitude de réactions biochimiques impliquées dans l'activation plaquettaire.⁴⁷ Le cytosquelette des plaquettes est formé de trois couches : le cytosquelette membranaire à base de spectrine, le cytosquelette cytoplasmique formé d'un réseau de filament d'actine et d'une couche unique de microtubule enroulé sous la membrane plasmique (Figure 2).⁴⁸⁻⁵⁰ Au cours de l'activation plaquettaire, on peut observer une réorganisation du cytosquelette, ce qui engendre un changement de forme des plaquettes; d'une forme discoïde à une forme sphérique dotée de filopodes.^{51,52}

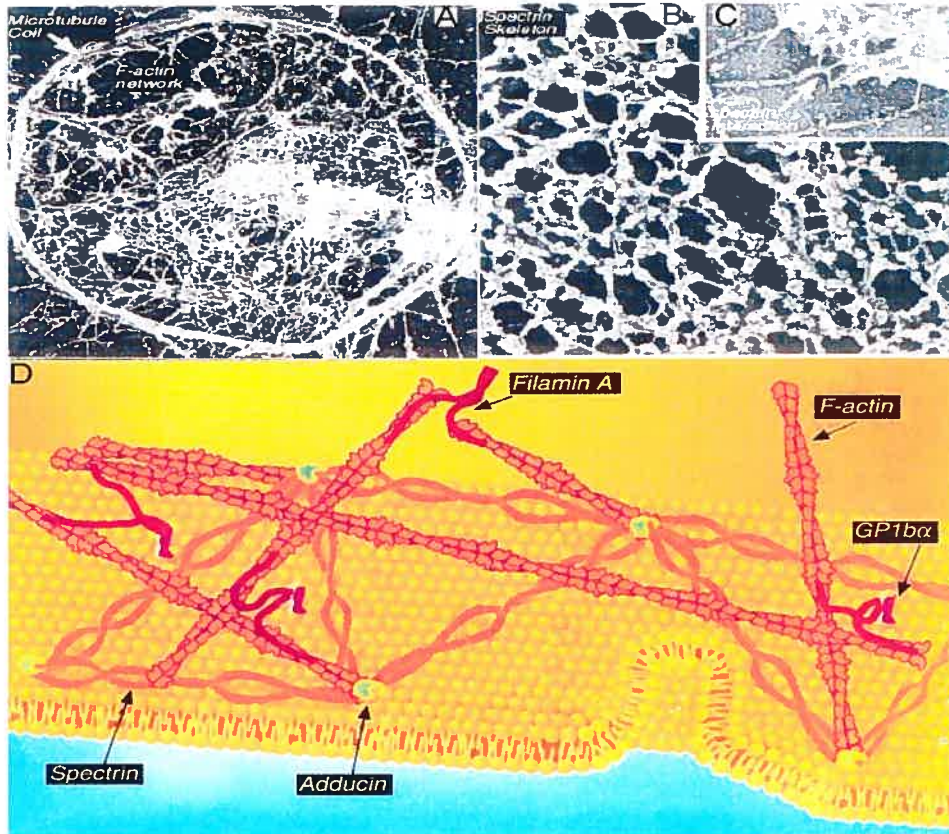


Figure 2: Structure du cytosquelette plaquettaire. A) Le cytosquelette cytoplasmique, formé par les filaments d'actine, est entouré par une monocouche mirotubulaire retrouvé sous la membrane plasmique. B) Structure du cytosquelette membranaire à base de spectrine. C) Interaction entre la spectrine du cytosquelette membranaire et les filaments d'actine. D) Schématisation du cytosquelette cytoplasmique et membranaire des plaquettes avec leurs composants principaux. (Alan D. Michelson. *Platelets*. 2002.)

Le cytoplasme des plaquettes est majoritairement occupé par un nombre important de granules de sécrétion (voir section 1.4.3 du chapitre 1). Il existe trois types de granules plaquettaires; les granules alpha, les granules denses et les lysosomes. Ces granules renferment une multitude de substances indispensables au processus de l'activation, de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire.

1.3 Molécules d'adhésion plaquettaire

Puisque la fonction première des plaquettes est l'hémostase, il n'est pas surprenant que ces cellules soient dotées d'une multitude de récepteurs adhésifs (molécules

d'adhésion), leur permettant d'adhérer à l'endothélium, à la matrice sous-endothéliale et avec d'autres plaquettes afin de former un clou hémostatique. L'analyse des différentes molécules d'adhésion plaquettaire a permis une compréhension plus approfondie du rôle et des mécanismes exacts par lesquelles les plaquettes participent à l'hémostase physiologique, mais aussi à la thrombose pathologique.⁵³

Les molécules d'adhésion plaquettaire peuvent être classées en quatre grandes catégories : 1) les intégrines, 2) les immunoglobulines, 3) les sélectines et 4) les sialomucines. La famille des intégrines comprend l'intégrine $\alpha_{1b}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (récepteur de la vitronectine), l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (récepteur à la fibronectine) et l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ (récepteur à la laminine). Parmi les immunoglobulines, on retrouve la glycoprotéine VI (GPVI), les récepteurs Fc (FcγRIIA et FcεRI), ICAM-2 (intercellular adhesion molecule 2) et PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule 1). Parmi la famille des sélectines, seule la P-sélectine est retrouvée dans les plaquettes. Finalement, le complexe GPIb-IX-V est le seul récepteur adhésif faisant partie de la famille des sialomucines. Seules les molécules d'adhésion les plus importantes seront discutées dans cette section.

1.3..1 La GPVI

La GPVI est l'une des plus importantes molécules d'adhésion plaquettaire et constitue, avec l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, un des deux récepteurs majeurs au collagène. La découverte de ce récepteur vint à la suite d'étude effectuée auprès de patients montrant une absence totale de réactivité plaquettaire suite à une stimulation au collagène.⁵⁴⁻⁵⁶ Des analyses auprès du sérum de ces patients ont révélé la présence d'anticorps dirigés contre

une protéine de poids moléculaire de 60 kDa, clonée quelques années plus tard comme le récepteur GPVI.⁵⁷ GPVI est un récepteur faisant partie de la famille des immunoglobulines et forme un complexe membranaire avec la chaîne Fc γ , cette dernière étant cruciale pour l'activation et la signalisation enclenchée par ce récepteur.^{58,59} La portion extracellulaire du récepteur comprend deux boucles C2 contenant les domaines d'interaction au collagène (figure 3).

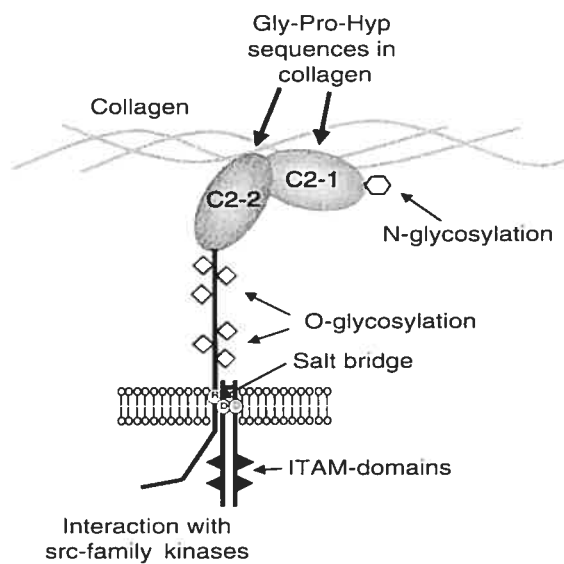


Figure 3: Structure de la GPVI. (Alan D. Michelson. *Platelets*. 2002.)

Les sites d'interaction exacts avec le collagène n'ont pas encore été clairement identifiés, mais il semble que la boucle C2-1 y soit majoritairement impliquée.^{60,61} Les deux boucles C2 reposent sur une structure fortement glycosylée, ce qui permet aux deux domaines de reconnaissance de s'étendre loin de la membrane afin d'augmenter l'accessibilité au collagène. La région cytoplasmique de GPVI comprend deux domaines ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activatory motifs) qui, suite à l'activation du récepteur, se retrouve phosphorylé par la famille des tyrosine kinases src (les mécanismes de

signalisation induite par le récepteur GPVI seront étudiées en détail dans la section 1.5.4 de ce chapitre).⁶²

Il est clair que la GPVI constitue un récepteur majeur pour le collagène, mais son implication physiologique exacte dans la fonction plaquettaire est encore débattue. Il a été démontré que la formation du thrombus plaquettaire, *in vivo*, est largement dépendante du récepteur GPVI.⁶³⁻⁶⁵ De plus, il semble que GPVI soit partiellement impliqué dans l'adhésion des plaquettes sur des surfaces de collagène; l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ étant l'autre récepteur jouant un rôle important dans ce phénomène.^{63,66} Cependant, la GPVI occupe une place encore plus importante dans le processus de l'agrégation plaquettaire induite par le collagène où elle remplit une fonction indispensable.⁵⁴⁻⁵⁶

1.3.2 L'intégrine $\alpha_2\beta_1$

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa) est le deuxième récepteur au collagène et constitue la deuxième plus importante intégrine à la surface des plaquettes, après l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. On retrouve entre 2000 et 4000 copies de cette molécule sur les plaquettes et son rôle principal se limite à l'adhésion des plaquettes sur des surfaces endommagées exprimant le collagène.⁶⁷⁻⁶⁹ À ce jour, deux sites de reconnaissance pour le collagène ont été identifiés sur l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, soit le domaine I de la sous-unité α_2 et le domaine I apparenté de la sous-unité β_1 .^{70,71} Le domaine I de la sous-unité α_2 possède aussi un site de reconnaissance pour des ions magnésium (Mg^{2+}) et cette interaction semble être requise pour l'adhésion du collagène au récepteur.⁷²

Il est bien établi que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est essentielle à l'adhésion des plaquettes aux surfaces endommagées. Par contre, il semblerait que sous conditions de hautes forces de

cisaillement, l'adhésion plaquettaire dépendrait de l'interaction GPIb/collagène, par l'intermédiaire du vWF (facteur von Willebrand).⁶ De plus, même si l'agrégation plaquettaire au collagène est fortement médiée par la GPVI, certaines études indiquent que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ participe à l'initiation du processus de l'agrégation plaquettaire.⁷³

1.3.3 La GPIb/IX/V

La GPIb/IX/V est un récepteur adhésif faisant partie de la famille des sialomucines et représente le deuxième plus abondant (environ 60 000 copies) récepteur à la surface des plaquettes, après l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.⁷⁴⁻⁷⁶ Cette molécule d'adhésion est retrouvée sous forme d'un complexe membranaire composé de quatre sous-unités distinctes : deux molécules de GPIb α (CD42b) et GPIb β (CD42c), la GPIX (CD42a), et la GPV (CD42d) (figure 4).

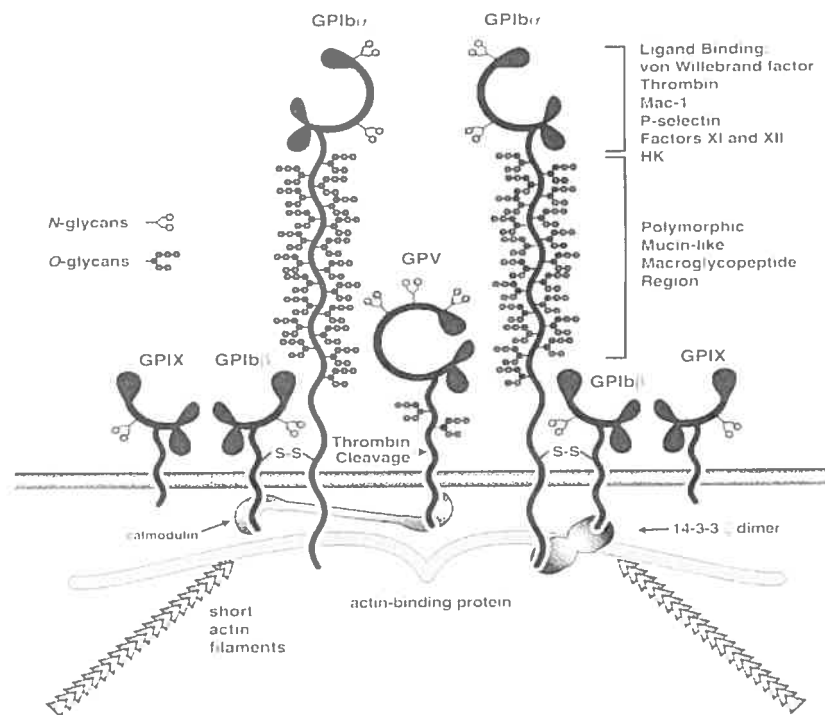


Figure 4: Structure du complexe GPIb/IX/V. (Alan D. Michelson. *Platelets*. 2002.)

Ces sous-unités sont exprimées au niveau de la membrane plasmique selon la stoechiométrie suivante; 2 :2 :2 :1, respectivement.⁷⁷ Au niveau cytoplasmique, le complexe GPIb/IX/V s'associe avec plusieurs protéines, dont le dimère 14-3-3 ζ , la calmoduline et la filamine A (actin-binding protein).⁷⁸⁻⁸⁰ La région globulaire du GPIb α est responsable de la presque totalité de la capacité du complexe GPIb/IX/V à interagir avec d'autres protéines. Effectivement, cette région peut lier le vWF, la thrombine, l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18) des leucocytes, la P-sélectine, les facteurs de coagulation XI et XII, et le facteur HMWK (high molecular weight kininogen).

En réponse à des forces de cisaillement élevées, l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale est sous la dépendance de l'interaction du complexe GPIb/IX/V au vWF. Le vWF circule dans le sang sous une forme inactive, incapable de lier le complexe GPIb/IX/V. Suite à une lésion endothéliale, le vWF se lie au collagène de la matrice sous-endothéliale, pour ensuite interagir avec le complexe GPIb/IX/V, ce qui permet l'adhésion (et ensuite l'agrégation) des plaquettes. La GPIb α possède aussi un site de haute affinité pour la thrombine et il semblerait que ce complexe soit impliqué dans l'activation plaquettaire à la thrombine (voir section 1.5.3 du chapitre 1).⁸¹⁻⁸³ Cependant, ce phénomène est encore débattu, faute de la complexité et du manque de documentation à ce sujet. De plus, le complexe GPIb/IX/V semble être impliqué dans l'adhésion des leucocytes aux plaquettes déjà adhérentes, via l'interaction GPIb α et l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ des leucocytes.⁸⁴ Finalement, il a été démontré que les plaquettes peuvent rouler sur un endothélium activé; phénomène qui serait dépendant de l'interaction GPIb α des plaquettes et de la P-sélectine endothéliale.⁸⁵ Suite à cette discussion, il est apparent de constater que ce complexe membranaire occupe une place primordiale dans la

physiologie des plaquettes par ses diverses implications dans l'adhésion, l'activation et même l'agrégation plaquettaire.

1.3..4 L' intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) est sans doute la glycoprotéine plaquettaire la plus importante. À l'état de repos, environ 80 000 copies de cette molécule d'adhésion sont exprimées à la surface membranaire avec des réserves importantes retrouvées dans les granules α et le système caniculaire ouvert.^{86.87} L'agrégation plaquettaire est un phénomène adhésif cellulaire au cours duquel plusieurs plaquettes interagissent ensemble afin de former un clou hémostatique. Le contact ferme entre deux plaquettes s'effectue par l'intermédiaire d'un pont fibrinogène établi entre deux molécules de GPIIb/IIIa. Suite à l'activation plaquettaire, ce récepteur change de conformation, lui permettant ainsi de lier le fibrinogène et d'enclencher le processus de l'agrégation.

La sous-unité α_{11b} (GPIIb) est constituée de deux chaînes peptidiques reliées par un pont disulfure; une chaîne lourde de 125 kDa comprenant quatre sites de liaison pour des ions divalents (Ca^{2+}) et une chaîne légère de 25 kDa incluant le domaine transmembranaire et une courte région cytoplasmique de 26 acides aminés (figure 5).^{88.89} La sous-unité β_3 (GPIIIa) de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ est principalement composée de trois domaines majeurs, soit un domaine PSI (plexins, semaphorins, and integrins), un domaine I apparenté, et un domaine EGF (epidermal-growth-factor) apparenté.⁹⁰ Le domaine PSI comprend une petite séquence de 90 acides aminés localisée à l'extrémité N-terminale de la sous-unité et sa fonction est encore mal caractérisée.⁹¹ Le domaine I apparenté de la sous-unité β_3 contient deux sites de reconnaissance RGD étant

responsable de l'interaction des différents ligands avec le récepteur. Ainsi, les ligands connus de la GPIIb/IIIa, tels le fibrinogène, le vWF, la fibronectine et la vitronectine, possèdent tous une ou plusieurs séquence RGD (arginine glycine, aspartame) qui sert comme motif de reconnaissance pour le récepteur. Finalement, le domaine EGF apparenté de la sous-unité β_3 est principalement caractérisé par une série de quatre boucles riches en cystéines. Même si cette région n'est pas intégrale à la structure du récepteur et ne possède aucun site de reconnaissance connu, une perturbation (mutation) au niveau de cette région peut enclencher l'activation du récepteur, ce qui suggère que ce domaine possède une activité régulatrice importante au niveau fonctionnel.⁹²⁻⁹⁵

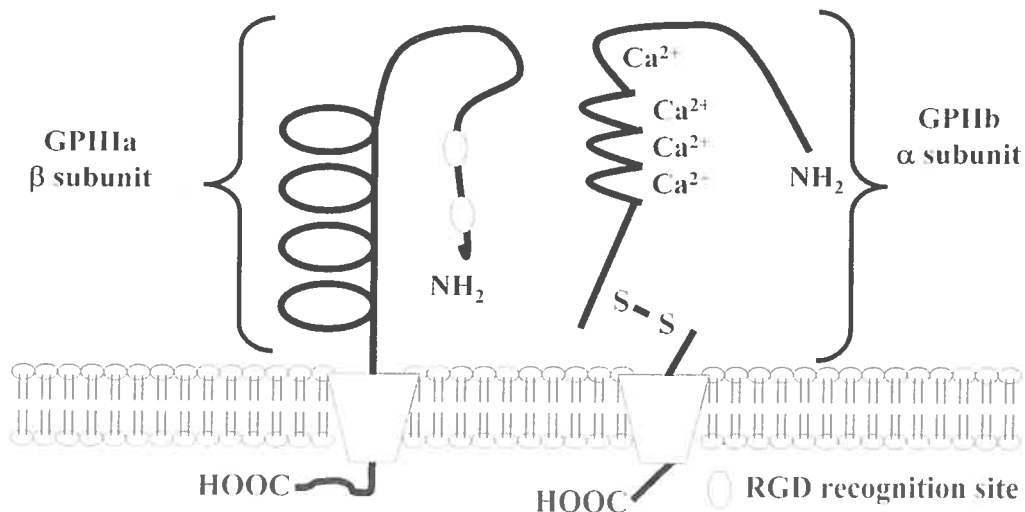


Figure 5: Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. (Production du Laboratoire du Dr. Merhi)

Le cytosquelette plaquettaire occupe une place primordiale dans la structure et l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Au repos, une bonne partie des molécules de GPIIb/IIIa sont associées au cytosquelette membranaire, ce qui permet l'ancrage de la protéine à la

membrane plasmique. Suite à l'activation plaquettaire, la queue cytoplasmique du récepteur s'associe aux filaments d'actine du cytosquelette cytoplasmique.^{96,97} Cette interaction aurait pour but d'augmenter la résistance des agrégats plaquettaires sous condition de forces de cisaillement élevées, tel qu'observé lors de l'agrégation plaquettaire, puis aussi de réguler l'activation du récepteur suite à la liaison du fibrinogène.⁹⁸

1.3..5 La P-sélectine

La famille des sélectines est composée de trois molécules d'adhésion, la P-sélectine, la L-sélectine et la E-sélectine, identifiées en fonction du tissu où elles furent originellement caractérisées. La L-sélectine (CD62L) est la plus petite des sélectines et est exprimée constitutivement à la surface des leucocytes, la E-sélectine (CD62E) est retrouvée dans les cellules endothéliales et est redistribuée à la surface membranaire suite à l'activation endothéliale par un mécanisme de synthèse *de novo*, puis la P-sélectine (CD62P) est retrouvée dans les granules α et denses des plaquettes, mais aussi dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales.⁹⁹⁻¹⁰¹

Parmi la famille des sélectines, seule la P-sélectine est retrouvée dans les plaquettes. Suite à l'activation plaquettaire, environ 10 000 copies de P-sélectine sont redistribuées des granules cytoplasmiques à la membrane cellulaire.^{102,103} Cette expression membranaire correspond à une densité d'environ 350 molécules/ μm , soit 10 fois la densité de P-sélectine au niveau des cellules endothéliales.^{104,105} Environ 30 minutes suivant l'activation cellulaire, des mécanismes de désensibilisation cellulaire

s'enclenchent et la teneur membranaire en P-sélectine diminue considérablement, soit par un mécanisme d'internalisation membranaire ou par un clivage enzymatique.¹⁰⁶⁻¹¹⁰

Les sélectines partagent tous une structure membranaire commune. La région extracellulaire de la molécule est principalement constituée de trois domaines distincts; soit une séquence de taille variable à région consensus répétitive, un domaine structural EGF (Epidermal Growth Factor) et un domaine lectine à dépendance calcique, responsable de l'adhésion et de la liaison du récepteur à ses ligands (figure 6). De plus, chacune des sélectines est composée d'un domaine hydrophobique transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique.¹¹¹ La principale différence entre les sélectines réside dans la taille de la région consensus. Par exemple, pour la P-sélectine, cette région est caractérisée par une séquence de 9 régions répétitives, ce qui lui confère le titre de la plus grande des sélectines.

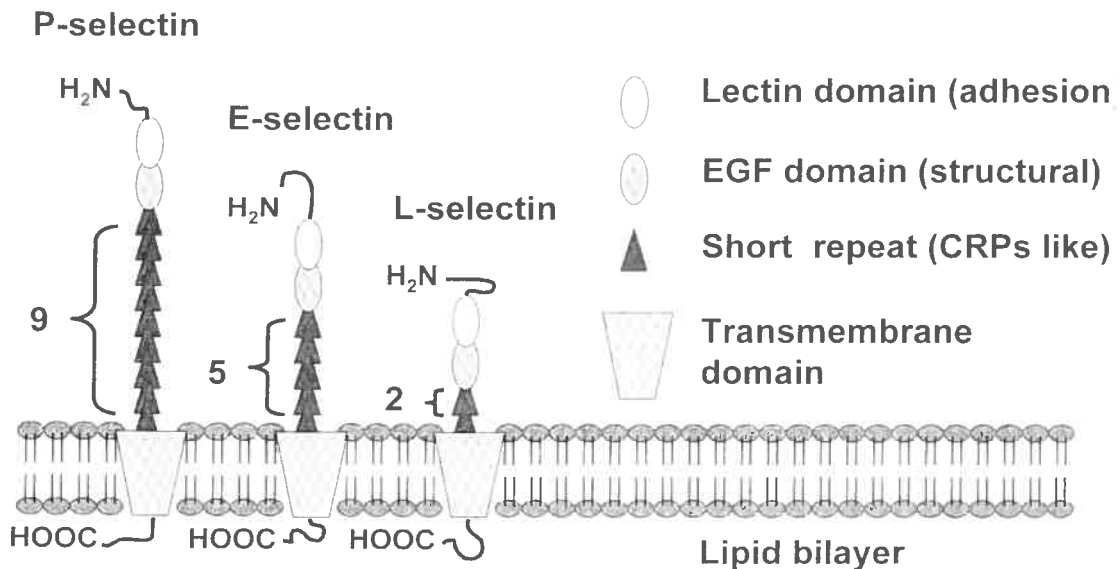


Figure 6: La famille des sélectines. (Production du Laboratoire du Dr. Merhi)

Une des fonctions importantes de la P-sélectine est son implication dans les interactions adhésives entre les plaquettes et les leucocytes. Il est bien établi, depuis plusieurs années, que les leucocytes participent activement aux réactions thrombo-inflammatoires par le biais de leurs interactions avec les plaquettes aux sites de lésions thrombotiques. Ce recrutement secondaire s'effectue majoritairement par la liaison de la P-sélectine à son ligand de haute affinité, le PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), exprimé constitutivement à la surface des leucocytes.¹¹¹⁻¹¹³ Ce phénomène adhésif est d'une grande importance physiologique, mais il occupe aussi un rôle de premier plan dans de nombreuses pathologies, telles la resténose, l'athéromatose, et toutes les autres complications thrombo-inflammatoires.¹¹⁴⁻¹¹⁸

1.4 Fonction plaquettaire

La fonction première des plaquettes est le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins, soit l'hémostase. Suite à un endommagement vasculaire, les plaquettes doivent rapidement former un clou hémostatique afin de corriger toute fuite ou écoulement sanguin pouvant nuire au fonctionnement normal du corps humain. Afin d'accomplir cette tâche les plaquettes suivent une cascade d'événements bien précise qui consiste essentiellement à l'adhésion, l'activation, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire.^{6,119,120} Ces mécanismes cellulaires sont principalement régis par une série de molécules d'adhésion, soient la GPIb/IX/V et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa) pour l'adhésion et l'activation cellulaire et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) pour l'agrégation plaquettaire. La figure 7 résume les principales étapes ainsi que les molécules d'adhésion impliquées dans la fonction plaquettaire.

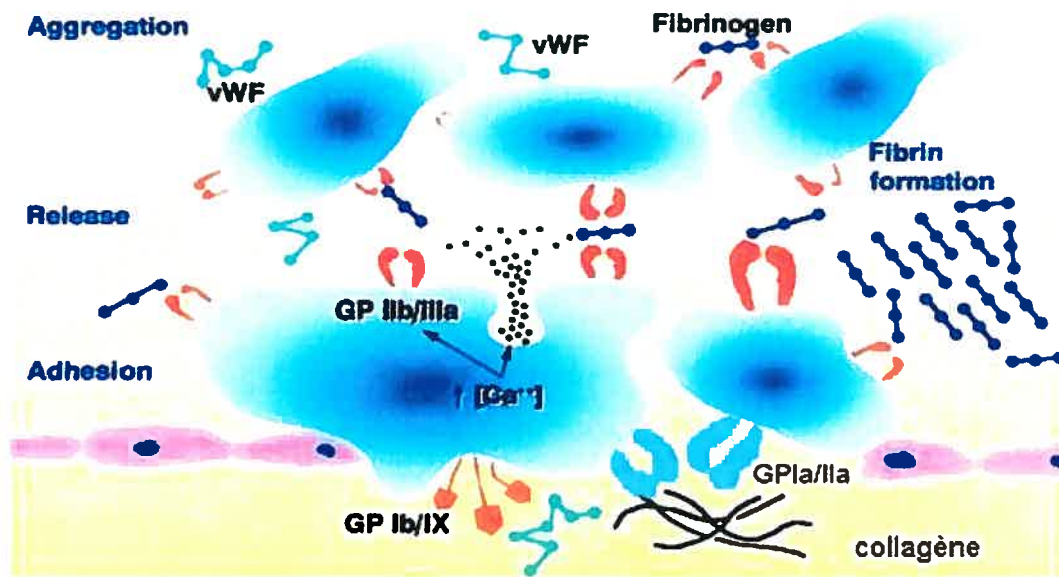


Figure 7: Les principales molécules d'adhésions impliquées dans l'adhésion, la sécrétion et l'agrégation des plaquettes. (Source : Dr. Pierre Théroux; ICM)

1.4.1 Adhésion plaquettaire

L'adhésion plaquettaire est la première étape de l'hémostase et est enclenchée suite à une lésion ou un endommagement vasculaire. Sous conditions physiologiques normales, soit lorsque la paroi des vaisseaux est intacte, les plaquettes circulent librement dans le sang sans être capables d'adhérer. D'ailleurs, la cellule endothéliale exerce un rôle inhibiteur important sur l'activité plaquettaire par sa capacité à sécréter diverses substances inhibitrices, telles le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (PGI₂).¹²¹ Suite à une lésion endothéliale, les composantes de la matrice extracellulaire, comme le collagène, sont exposées à la lumière du vaisseau et les plaquettes peuvent, par la suite, entrer en contact avec ces composantes et adhérer fermement aux sites de lésion. Le processus de l'adhésion plaquettaire peut être divisé en deux étapes, soit le roulement des plaquettes sur l'endothélium activé et l'adhésion des plaquettes aux surfaces de la matrice sous-endothéliales.

Roulement des plaquettes sur l'endothélium activé

Comme pour les leucocytes au cours de l'inflammation, il a été démontré que les plaquettes peuvent rouler sur un endothélium activé; phénomène qui serait totalement dépendant de la P-sélectine endothéliale.¹²² Cette étape serait la toute première de l'hémostase et permettrait le ralentissement séquentiel des plaquettes en circulation avant leur adhésion sur les surfaces de la matrice sous-endothéliale. À la recherche du ligand de la P-sélectine à la surface des plaquettes, deux candidats ont été proposés : le ligand de haute affinité de la P-sélectine, le PSGL-1, et le complexe GPIb/IX/V.^{85.123}

Adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale

L'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale est possible grâce à la participation de trois molécules d'adhésion plaquettaire principales; la GPIb/IX/V, l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa) et la GPVI. Suite à l'exposition des composantes de la matrice sous-endothéliales, les molécules de vWF en circulation dans le sang, adhèrent au collagène présent à la surface sous-endothéliale. Cette adhésion déclenche un changement de conformation aux molécules de vWF, les rendant ainsi aptes à lier le complexe GPIb/IX/V plaquettaire permettant une adhésion de faible intensité.¹²⁴⁻¹²⁷ Cette interaction représente un contact plus ou moins ferme entre les plaquettes et la matrice, mais demeure absolument essentiel, puisqu'il permet le ralentissement des plaquettes et la liaison subséquente de la GPIa/IIa et du GPVI plaquettaires aux fibres de collagène libres de la matrice.^{128.129} Ce dernier contact est de nature ferme et assure une immobilisation complète des plaquettes sur la surface endommagée. La figure 8 résume les principales étapes de l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliales.

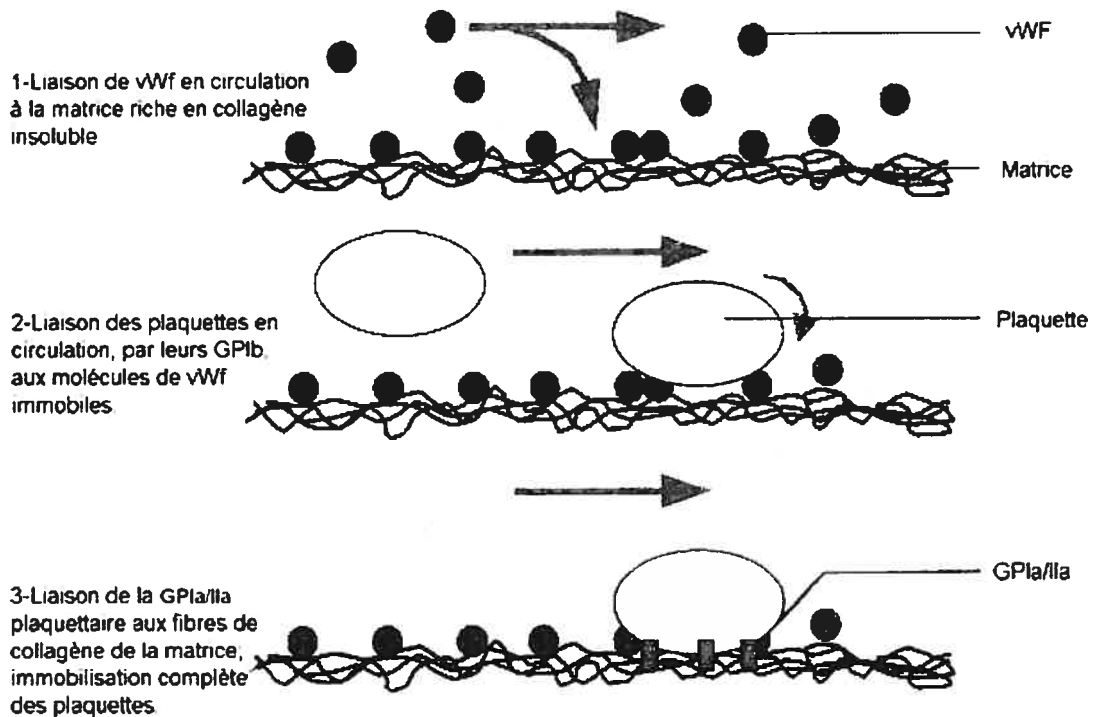


Figure 8: Schématisation des principales étapes et des molécules d'adhésion impliquées dans l'adhésion plaquettaire. (Production du Laboratoire du Dr. Merhi)

1.4.2 Activation plaquettaire

Les interactions de premier (GPIb/IX/V / vWF) et second (GPIIb/IIIa et GPVI / collagène) contact entre les plaquettes et la matrice sous-endothéliale permettent non seulement l'adhésion des plaquettes, mais aussi leur activation. Effectivement, suite à leur adhésion aux surfaces endommagées, les plaquettes changent rapidement de forme, sécrètent maintes substances facilitant l'arrivée et le recrutement de plaquettes supplémentaires et déclenchent l'activation de récepteurs et molécules d'adhésion essentielles à la formation d'un agrégat plaquettaire, telle l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.^{47,130,131} Le premier signe de l'activation plaquettaire est marqué par le changement de forme, soit

d'une forme discoïde à une forme sphérique avec la présence d'extension membranaire nommée les filopodes. Ce changement morphologique permet aux plaquettes de s'étaler et de s'étendre sur les surfaces endommagées afin de couvrir une meilleure superficie. Le changement de forme plaquettaire est dépendant de la réorganisation structurale des filaments d'actine du réseau du cytosquelette cytoplasmique.^{51,52} L'activation plaquettaire engendre, par la suite, la sécrétion de substances activatrices impliquées dans le recrutement additionnel de plaquettes aux sites de lésion. L'adénosine diphosphate (ADP) et la thromboxane A₂ (TXA₂) font, par exemple, partie de substances sécrétées par les plaquettes lors de leur activation (la prochaine section de ce chapitre portera sur la sécrétion plaquettaire). Finalement, l'activation des molécules d'adhésion plaquettaire, telle l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et la P-sélectine, est aussi un phénomène cellulaire clé de l'activation des plaquettes.

Les différents événements cellulaires observés au cours de l'activation plaquettaire sont possibles grâce à une série de cascade de signaux intracellulaires déclenchée suite à la stimulation des plaquettes via leurs différents récepteurs membranaires.^{1,132} L'intégration des différents signaux perçus par les récepteurs membranaires se traduit par la génération de seconds messagers. Il existe deux voies principales de signalisation intracellulaire dans les plaquettes, soit la voie de signalisation activée par la phospholipase C (PLC), qui génère le diacylglycérol (DAG) et le Ca²⁺, et active subséquentement les protéines kinases C (PKC), et celle générée par l'activation de l'adénylate cyclase et des protéines G. L'étude des mécanismes de signalisation plaquettaire sera étudiée en détail à la section 1.5 de ce chapitre.

1.4.3 Sécrétion plaquettaire

La sécrétion plaquettaire constitue une étape indispensable de l'activation et de la fonction plaquettaire. Les granules de sécrétion des plaquettes contiennent des facteurs de croissance, des protéines impliquées dans la cascade de coagulation, des molécules d'adhésions, des cytokines inflammatoires, des facteurs angiogéniques, et maintes autres substances jouant un rôle primordial dans la physiopathologie plaquettaire. La grande majorité de ces molécules sont synthétisées dans les mégacaryocytes puis, par la suite, entreposées dans des granules spécialisées. Au cours de l'activation plaquettaire, ces granules font fusion avec la membrane plasmique et déversent leur contenu dans le milieu extracellulaire par exocytose.

Les plaquettes contiennent trois types de granules spécialisées; les granules alpha, les granules denses et les lysosomes. Les granules alpha sont les plus volumineuses et les plus nombreuses granules plaquettaires, avec approximativement 80 granules alpha par plaquette.¹³³ Elles contiennent principalement des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion et des protéines impliquées dans la coagulation. Les granules denses sont beaucoup moins nombreuses que les granules alpha (environ 7 granules par plaquettes), mais contiennent, par contre, des substances indispensables à l'activation plaquettaire, telles l'ADP et la sérotonine.^{134,135} Finalement, les lysosomes renferment des enzymes jouant un rôle dans la dégradation et la digestion de différentes protéines.^{136,137} Le tableau 1.2 résume les principaux constituants des trois types de granules plaquettaires.

Tableau 1.2: Principaux constituants des granules plaquettaires

Granules alpha	Granules denses	Lysosomes
P-sélectine	GPIb	CD107a (LAMP-1)
Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	GPIIb/IIIa	CD107b (LAMP-2)
GPIb/IX/V	P-sélectine	CD63 (LAMP-3)
GPIV	CD107a (LAMP-1)	Carboxypeptidase
PECAM-1	CD107b (LAMP-2)	Phosphatase acide
$\alpha_v\beta_3$	CD63 (LAMP-3)	Cathepsin D et E
Stomatin	Sérotonine, Histamine	
TLT-1	ATP, ADP, GTP, GDP	
PDGF, VEGF, EGF	Calcium, Magnésium	
Facteur V, Facteur VIII		
Fibronectine, PF4		
Vitronectine, vWf		
Thrombospondine		
Fibrinogène		
Immunoglobulines (IgG, IgA, IgM)		

La sécrétion des granules plaquettaires est contrôlée par les mécanismes de la signalisation intracellulaire. Les plaquettes peuvent être activées par plusieurs agents physiologiques, tels la thrombine, l'ADP, le collagène, la TXA_2 , l'épinéphrine et le PAF (Platelet-Activating Factor). Ces agents interagissent avec leurs récepteurs membranaires spécifiques et déclenchent la cascade de signalisation intracellulaire.^{9,138} Bien que la plupart de ces agonistes soient capables d'induire une sécrétion granulaire importante, seule la thrombine apparaît avoir le pouvoir d'induire la sécrétion des lysosomes.¹³⁹ Les mécanismes de signalisation de la sécrétion plaquettaire semblent être majoritairement dépendants de la voie de la PLC et des seconds messagers du DAG et de l'inositol triphosphate (IP_3). Suite à l'activation plaquettaire, la PLC génère l' IP_3 et le DAG, ce qui

provoque l'augmentation intracellulaire en calcium et permet l'activation des PKCs respectivement. Les plaquettes contiennent plusieurs isoformes de PKC (α , β_1 , β_{11} , δ , ζ , η , θ) et il semble que chacune de ces isoformes possède un rôle particulier dans l'activation et la sécrétion des plaquettes (le deuxième chapitre de ce mémoire sera exclusivement consacré à l'étude des PKCs).¹⁴⁰ Les PKCs peuvent, par la suite, phosphoryler un ensemble de protéines intracellulaires impliquées dans le transport et la sécrétion des granules plaquettaires.¹⁴¹⁻¹⁴⁵

Les mécanismes moléculaires de la sécrétion plaquettaire furent longtemps ignorés et ce n'est qu'au cours des quelques dernières années qu'ils furent complètement élucidés. Les plaquettes contiennent une machinerie moléculaire pour la sécrétion d'une panoplie de protéines et enzymes impliquées dans l'exocytose des granules de sécrétion. Ces protéines comprennent principalement la famille de protéines NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor), l'alpha SNAP (soluble NSF-associated protein), les molécules SNARE (SNAP receptors), puis les protéines Sec1 (PSP) et Rab (figure 9).^{144,146,147} Au repos, les protéines de la famille SNARE forme un complexe membranaire *cis* visant à inhiber l'exocytose des granules. Au cours de l'activation plaquettaire, les protéines SNAP et NSF sont activées et elles inhibent le complexe *cis*-SNARE, ce qui permet l'interaction de Sec1 (PSP) à la syntaxine 4 (les syntaxines appartiennent à la famille de protéines SNARE) (figure 9 C) ; interaction qui semble être sous la dépendance des PKC. Par la suite, un complexe *trans*-SNARE se forme au niveau de la membrane, ce qui apparaît être essentiel au phénomène de l'exocytose. Finalement, suite à l'action des PKC et à l'élévation du calcium intracellulaire, les granules de sécrétion font fusion avec la membrane et il y a exocytose (figure 9E).¹⁴⁸⁻¹⁵⁰

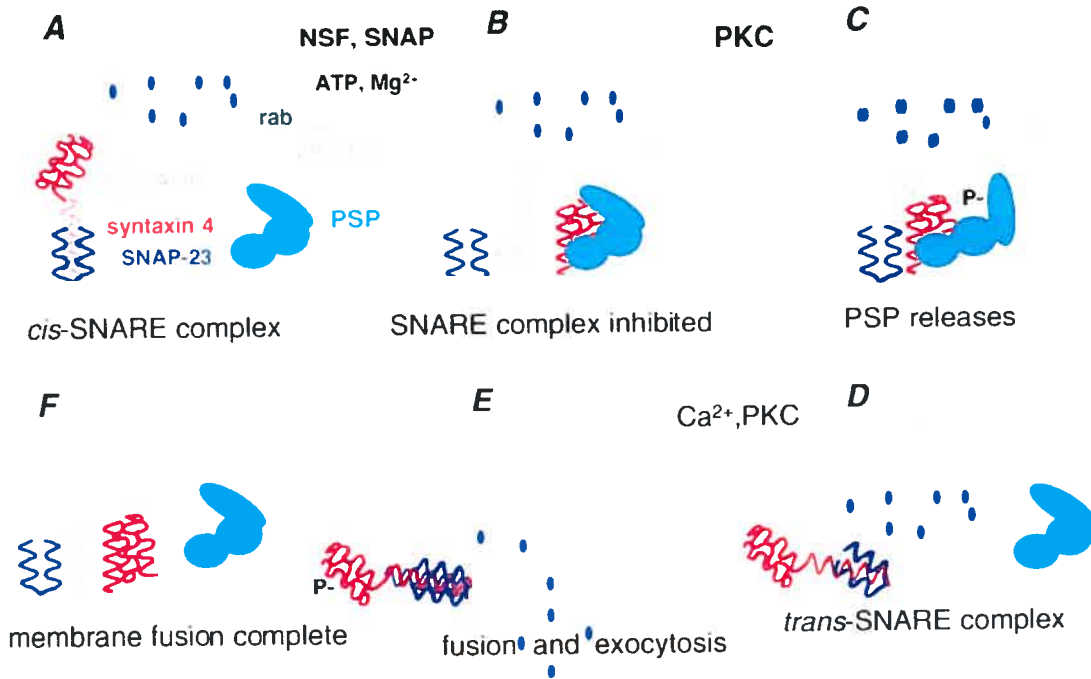


Figure 9: Mécanisme moléculaire de la sécrétion plaquettaire. (Alan D. Michelson. *Platelets*. 2002.)

1.4.4 Agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est la dernière phase de l'hémostase et elle constitue sans doute la fonction plaquettaire la plus importante. L'étape déterminante de l'agrégation plaquettaire repose sur le changement de conformation structurale de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, permettant ainsi sa liaison au fibrinogène soluble et la formation d'un agrégat plaquettaire. Au repos, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ maintient une très faible activité de liaison pour ces ligands, tel le fibrinogène, ce qui permet aux plaquettes de circuler librement dans le sang. Suite à l'exposition des composantes de la matrice sous-endothéliales ou en présence d'agonistes plaquettaires solubles, comme la thrombine, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ s'active très rapidement et son affinité pour le fibrinogène augmente instantanément. Bien entendu, cette activation dépend exclusivement des voies de signalisation intracellulaire déclenchée par la stimulation des plaquettes via leurs

récepteurs membranaire spécifique. Ce phénomène cellulaire est qualifié de signalisation «intérieure-extérieure» (inside-out), comparativement à la signalisation «extérieure-intérieure» (outside-in), issue de la liaison du fibrinogène au récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ (les mécanismes de signalisation de l'activation plaquettaire via les principaux récepteurs membranaires ainsi que la signalisation outside-in de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ seront étudiés dans la prochaine section de ce chapitre).^{47,151} La signalisation inside-out menant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dépend de la nature de l'agoniste et ainsi du récepteur stimulé.^{132,152} Par exemple, la thrombine, via ses récepteurs spécifiques, les PARs (protease-activated receptors), déclenche l'activation des protéines Gq, de la phospholipase C β et des PKC, tandis que la stimulation plaquettaire au collagène active la famille des tyrosines kinases (Src et Syk), de la phospholipase C γ et des PKCs.^{9,153-155} Malgré les différences observées dans les mécanismes de signalisation intracellulaire, chacune des voies déclenchées par les différents agonistes a la capacité d'induire le changement de conformation des deux sous-unités de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et, ainsi, de déclencher l'agrégation plaquettaire. La figure 10 décrit le rôle central de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans l'agrégation plaquettaire mais aussi dans l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale.

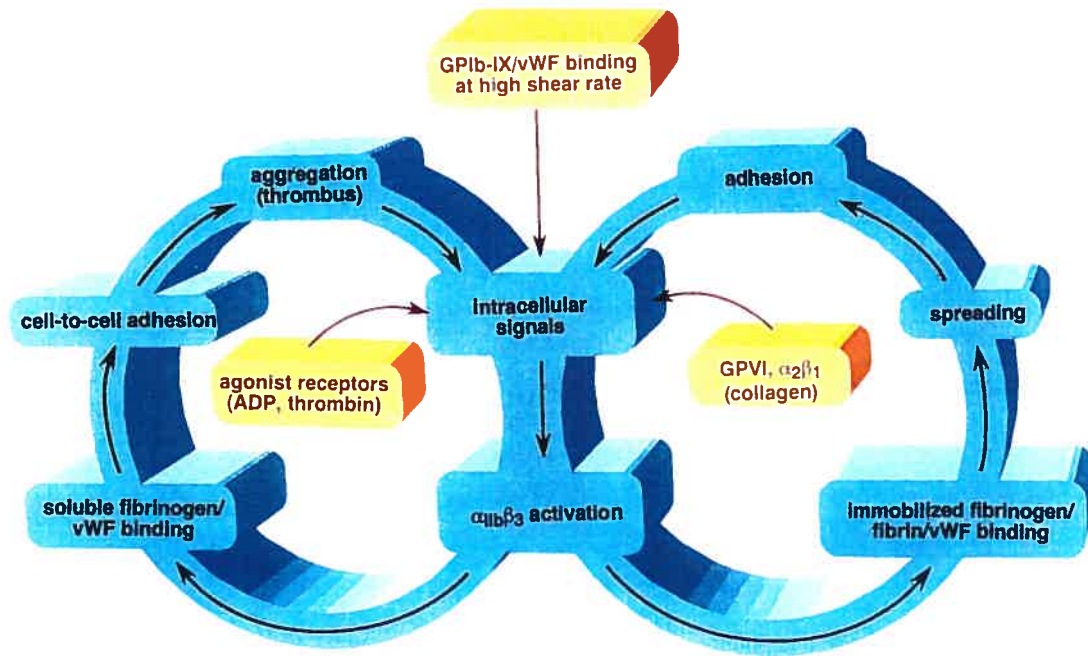


Figure 10 : Rôle de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. (Alan D. Michelson. *Platelets*. 2002.)

La démonstration que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ joue un rôle de premier plan dans l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus *in vivo* a mené vers le développement de traitements anti-thrombotiques. À ce jour, différents antagonistes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ont été développés, soit un anticorps murin bloquant la liaison du fibrinogène au récepteur (Abciximab ou Réopro), puis des peptides se basant sur la séquence RGDS comme l'Eptifibatide (Integrilin) et le tirofiban (Aggrastat).¹¹⁹ Ces antagonistes sont présentement utilisés en clinique chez des patients ayant subi des procédures vasculaires, comme l'angioplastie transluminale coronarienne.^{156,157}

1.5 Signalisation plaquettaire

Les plaquettes sont des cellules anucléées qui dépendent exclusivement des mécanismes de signalisation intracellulaire afin de remplir leur fonction. Du changement de forme à l'agrégation, en passant par l'activation et la sécrétion, la signalisation intracellulaire est au cœur de tout processus physiologique plaquettaire. Les plaquettes humaines possèdent une multitude de récepteurs membranaires et le type de signal déclenché et, ainsi, le comportement des plaquettes, sera dicté par la nature de l'agoniste et le récepteur stimulé. Si le stimulus plaquettaire initial est l'exposition aux fibres de collgène et aux vWF, alors l'activation de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ et la formation de l'agrégat plaquettaire seront accomplis par la stimulation du complexe GPIb/IX/V et de la GPVI respectivement. Par ailleurs, si le stimulus initial est la génération de thrombine, telle qu'observée dans un contexte pathologique, l'activation plaquettaire sera dépendante de l'action des récepteurs à la thrombine (PARs) et de la stimulation subséquente des protéine G. Les mécanismes de signalisation plaquettaire dépendent donc de la nature et du contexte de stimulation, mais les plaquettes devront, peu importe l'agoniste employé, remplir leur fonction de base et former un clou hémostatique. Dans ce chapitre, seul les mécanismes signalétiques via les principaux récepteurs plaquettaires seront exposés, soient ceux déclenchés par les récepteurs au collagène; GPVI et GPIa/IIa, aux vWF; le complexe GPIb/IX/V, à la thrombine; les PARs (PAR 1 et PAR4), et au fibrinogène; intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ (signalisation outside-in).

1.5.1 La GPVI

La GPVI constitue un récepteur membranaire indispensable à l'activation plaquettaire au collagène. Il joue un rôle important dans l'adhésion des plaquettes aux surfaces endommagées et est essentiel à l'agrégation plaquettaire au collagène. La GPVI, avec l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), représente un récepteur de premier plan dans la réponse plaquettaire au collagène.

Il fut démontré, il y a plus de 10 ans, que l'activation plaquettaire au collagène provoque la phosphorylation de plusieurs protéines cytoplasmique, en particulier la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) et la tyrosine kinase Syk.^{25,26} Cependant, la contribution spécifique du récepteur au collagène responsable de ces phénomènes fut ignorée car le récepteur GPVI n'était pas encore bien identifié. Suite à la caractérisation de la structure de GPVI, les mécanismes de signalisation découlant de ce récepteur furent clairement élucidés. La GPVI est associée au niveau de la membrane avec la chaîne γ du récepteur Fc (figure 11).^{59,158} Cette association est indispensable à l'intégrité structurale et aux fonctions de signalisation du récepteur. Puisque la chaîne γ du récepteur Fc possède un domaine ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), ceci souleva l'hypothèse que ce domaine interagissait avec la tyrosine kinases Syk. Cette possibilité fut, par la suite, confirmée par des études d'immunoprécipitations qui démontraient l'association d'un complexe formé par ces deux protéines.⁵⁹ La figure 11 illustre le modèle de signalisation proposé aujourd'hui pour le récepteur GPVI.

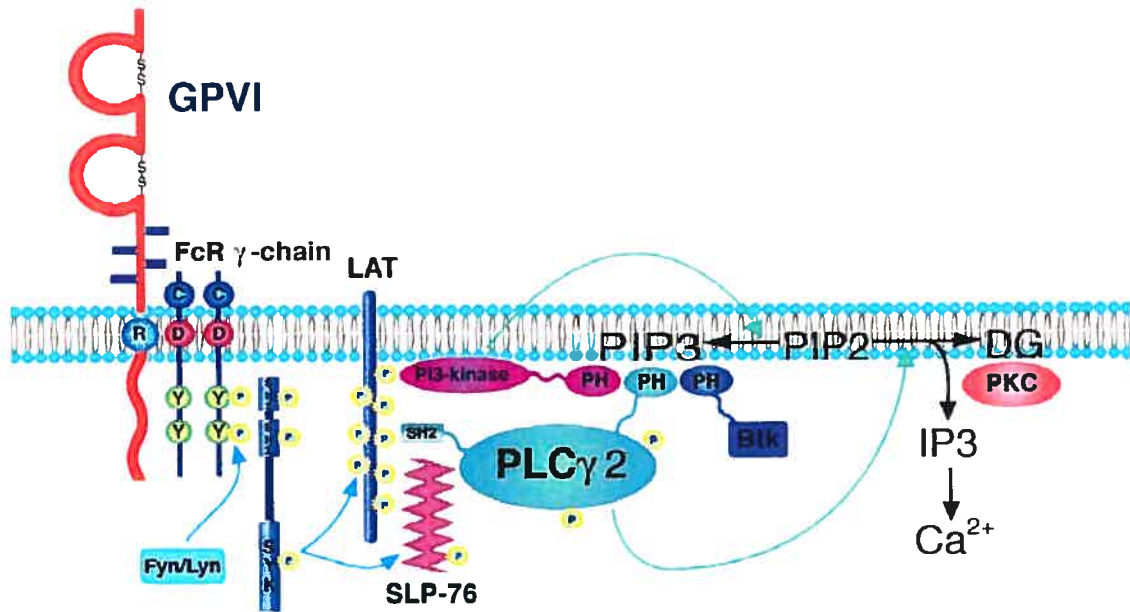


Figure 11: Modèle des mécanismes de signalisations déclenchés par l'activation de GPVI. PH: pleckstrin-homology domain; SH2: Src-homology 2 domain. Maroi, M., and Jung, SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res.*2004. **114**, 221-233.

Suite à l'activation de GPVI, les résidus tyrosines du domaine ITAM de la chaîne γ du récepteur FC sont phosphorylés par les protéines Fyn et Lyn.^{159,160} Cette phosphorylation permet l'association de Syk à la chaîne γ via ses domaines SH2, ce qui engendre l'activation et la phosphorylation de Syk.¹⁶¹ Syk peut, par la suite, activer les protéines adaptatrices SLP76, SLP-130 et LAT qui, elles, facilitent l'activation de la PLC γ 2.¹⁶²⁻¹⁶⁴ La PLC γ 2 catalyse ensuite la PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) membranaire en DAG et IP₃. L'IP₃ permet l'augmentation en calcium intracellulaire, tandis que la DAG active certaines isoformes de la PKC. La PI3-kinase semble aussi être impliquée dans la signalisation de GPVI puisque l'inhibition spécifique de cette enzyme limite considérablement l'activation du récepteur.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ La PI3-kinase convertit la PIP₂ en

PIP₃ (phosphatidylinositol 4,5-trisphosphate) qui, à son tour, sert de ligand au domaine PH de quelques protéines impliquées dans la signalisation par GPVI, comme Btk.¹⁶⁸

La GPVI constitue, certes, le récepteur signalétique plaquettaire le plus important au collagène. L'élucidation des mécanismes de signalisation déclenchés par ce récepteur a ouvert la porte quant à la possibilité de développer une cible pharmacologique dans le traitement de la thrombose vasculaire.

1.5.2 L'intégrine $\alpha_2\beta_1$

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa) fut le premier récepteur au collagène à être identifié à la surface des plaquettes et il est bien établi aujourd'hui qu'il est impliqué dans l'adhésion des plaquettes aux surfaces de collagène. Cependant, sa capacité à générer une signalisation intracellulaire suite à la liaison du collagène est largement débattue. Certains investigateurs prétendent que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est incapable de déclencher quelque signalisation et ce, même en présence de peptides spécifiques,¹⁶⁹⁻¹⁷¹ tandis que d'autres études rapportent que la stimulation du récepteur engendre l'activation et l'extension plaquettaire sur des surfaces de collagène via un mécanisme dépendant de l'activation des tyrosine kinases Src et Syk, et de la PLC γ 2.¹⁷² Cette cascade signalétique serait la même que celle déclenchée par le récepteur GPVI, attribuant ainsi un rôle central à la PLC γ 2 dans la signalisation au collagène. Selon cette dernière étude, les signaux générés par l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ seraient importants dans la stabilisation du thrombus au collagène. D'ailleurs, le groupe de Kuijpers et al¹⁷³ ont démontré que même si des plaquettes déficientes en la sous-unité β_1 du récepteur peuvent adhérer aux surfaces de collagène sous hautes forces de cisaillement, la formation des agrégats plaquettaires était instable et

le thrombus avait tendance à emboliser plus fréquemment que chez les groupes témoins.¹⁷³ De plus, le développement de l'activité procoagulante serait significativement réduit chez les plaquettes déficientes en β_1 . Ces résultats semblent indiquer que le rôle de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ ne se limite pas uniquement à l'adhésion plaquettaire, mais que ce récepteur peut aussi générer des signaux intracellulaires importants dans la stabilisation du thrombus plaquettaire.

1.5.3 La GPIb/IX/V

Le complexe GPIb/IX/V représente, après l'intégrine $\alpha_2\beta_3$, le récepteur le plus abondant à la surface des plaquettes où il occupe un rôle de premier plan dans l'adhésion des plaquettes sous hautes forces de cisaillement. Même si les plaquettes sont exposées à une panoplie d'agonistes dans le microenvironnement de la lésion vasculaire, il est devenu apparent que l'interaction de ligands, tels que le vWF et la thrombine, avec le complexe GPIb/IX/V est suffisante pour induire une signalisation plaquettaire menant au réarrangement du cytosquelette, à une mobilisation du calcium intracellulaire et à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.^{174,175} Effectivement, la GPIb/IX/V est le premier récepteur plaquettaire à interagir avec le milieu extérieur lors de la cascade d'activation des plaquettes et il représente, certes, un outil signalétique indispensable à la fonction plaquettaire.

La stimulation du récepteur GPIb/IX/V déclenche l'activation de deux principales voies signalétiques dans les plaquettes; la première est responsable du réarrangement du cytosquelette et la deuxième mène vers l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.¹⁷⁶ On ignore, par contre, si ces deux événements proviennent de deux voies signalétiques distinctes ou si

elles représentent deux conséquences séparées issues d'une voie initiale commune. Les mécanismes exacts de la polymérisation des filaments d'actine et du réarrangement du cytosquelette sont peu caractérisés, mais il semble que les protéines associées au complexe GPIb/IX/V, telles la calmoduline, la filamine A et le dimère 14-3-3 ζ , sont impliquées dans ces phénomènes.^{80,177,178}

La liaison du vWF au complexe GPIb/IX/V déclenche des voies de signalisation qui mènent à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et ce, indépendamment de la participation d'autres récepteurs plaquettaires. Cette cascade intracellulaire dépend de l'activation de plusieurs molécules signalétiques, soit les tyrosines kinases Syk, FAK, Src et PyK2, la PLC γ 2, les PKC, la PLA $_2$, la PI3-kinase, la 14-3-3 ζ , et autres protéines (figure 12).

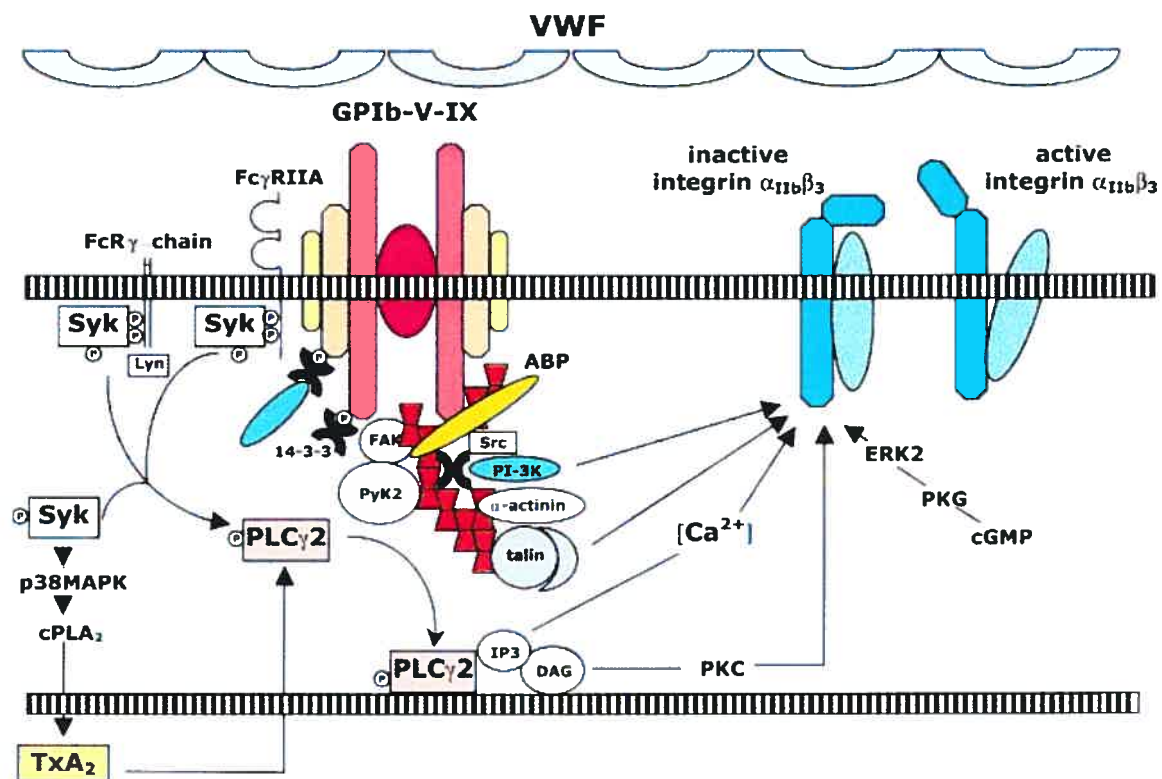


Figure 12: Modèle des mécanismes signalétiques déclenchés par le complexe GPIb/IX/V suite à la liaison du VWF. Canobbio I., Balduini C., and Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cellular signaling*. 2004. **16**, 1329-1344.

Il existe deux principaux mécanismes signalétiques déclenchés suite à l'activation du complexe GPIb/IX/V par le VWF; la première implique l'activation de la PI3-kinase et du dimère 14-3-3 ζ et la deuxième est régulée par les récepteurs FcR γ et Fc γ RIIa. Chacune de ces voies est capable, à elle seule, de déclencher l'activation de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$.

Le complexe GPIb/IX/V est associé au niveau de la membrane avec les récepteurs FcR γ et Fc γ RIIa et l'activation du complexe déclenche une signalisation via ces récepteurs.^{179,180} La signalisation découlant des récepteurs FcR γ et Fc γ RIIa est similaire à celle observée suite à l'activation de la GPVI, où la phosphorylation de la tyrosine kinase Syk provoque l'activation des PKCs par l'action de la PLC γ 2 (figure 12).^{179,181} L'activation de la Syk peut parallèlement favoriser la synthèse de TxA₂ via la p38MAPK et la cPLA₂. La TxA₂ peut, par la suite, activer son propre récepteur et accroître l'activation de la PLC γ 2.¹⁸²⁻¹⁸⁴ Cette cascade signalétique ne semble pas être essentielle à l'activation de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$, mais serait plutôt responsable de potentialiser la voie de la PI3-kinase et du dimère 14-3-3 ζ .¹⁸⁵

La deuxième voie de signalisation issue de la GPIb/IX/V comprend l'activation de la PI3-kinase, du dimère 14-3-3 ζ , de la tyrosine kinase Src, de la FAK et de la PyK₂ qui, conjointement, forment un complexe au niveau de la queue cytoplasmique de la GPIb/IX/V.¹⁸⁶ La formation de ce complexe serait nécessaire à l'activation de la PI3-kinases et de la taline, ce qui permettrait l'activation de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$. Toutefois, comme l'activation de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ nécessite une élévation en calcium intracellulaire, certains investigateurs stipulent que ce complexe protéique favorise l'activation de la PLC γ 2.^{181,187} L'activation de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ serait ainsi régulée par l'action de la PLC γ 2 et non directement par la PI3-kinase et la taline. Cette dernière hypothèse

demeure pour le moment incertaine et des études futures à ce sujet seront nécessaires afin de confirmer cette possibilité.

Le complexe GPIb/IX/V possède aussi un site de liaison de haute affinité pour la thrombine et il semble que cette interaction soit capable de déclencher une signalisation intracellulaire favorisant l'activation plaquettaire.¹⁸⁸⁻¹⁹² Cependant, les mécanismes exacts impliqués dans ce phénomène sont peu caractérisés et encore débattus. Néanmoins, les protéines signalétiques incluant la tyrosine kinase Src et de la PI3-kinases, ainsi que de la Rho kinase et de la MEK1/2, occupent apparemment une fonction importante dans la signalisation du complexe GPIb/IX/V par la thrombine.^{193,194} De plus, la GPV du complexe GPIb/IX/V possède un site de clivage pour la thrombine et certains investigateurs stipulent que ce clivage enzymatique permet la dimérisation des deux molécules de GPIb α avoisinantes (figure 4), facilitant ainsi la transduction de signaux intracellulaires.^{175,189} À l'heure actuelle, cette hypothèse fait l'état d'un débat important et des études plus approfondies à ce sujet seront nécessaires afin d'identifier clairement les mécanismes d'activation de la GPIb/IX/V suite à la liaison de la thrombine.

1.5.4 Les PARs

Les PARs (proteinase-activated receptors) sont des récepteurs à serine protéinases à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G. À ce jour quatre PARs ont été identifiés et leur distribution tissulaire n'est pas uniquement limitée aux cellules impliquées dans l'hémostase, mais aussi à celles jouant un rôle dans la neurologie, la physiologie cardiaque, et même dans les phénomènes métastatiques. PAR1 est le récepteur plaquettaire prédominant à la thrombine, mais il est également retrouvé dans la

plupart des tissus humains, surtout dans les cellules impliquées dans la régulation de l'hémostase, soit les plaquettes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.¹⁹⁵⁻¹⁹⁸ PAR2 est le seul récepteur de la famille des PARs à ne pas être clivé par la thrombine, mais plutôt par la trypsine et la tryptase.^{199,200} Pour cette raison, il ne constitue pas un récepteur à la thrombine, malgré qu'il possède des mécanismes d'action structuraux et fonctionnels semblables aux autres PARs. Toutefois, son expression tissulaire est plus ou moins ubiquitaire.²⁰⁰ PAR3 est exprimé dans les cellules de la moelle osseuse, dans les cellules endothéliales vasculaires et très faiblement dans les plaquettes.²⁰¹⁻²⁰³ Finalement, PAR4 constitue le deuxième plus important récepteur plaquettaire à la thrombine. Il est également retrouvé dans la majorité des tissus avec une forte expression dans les poumons, le pancréas, la glande thyroïde, les testicules et le petit intestin.²⁰⁴

Les plaquettes humaines possèdent un double système signalétique comprenant deux récepteurs à la thrombine fonctionnant conjointement. Ce système inclut les récepteurs PAR1 et PAR4 qui, ensemble, sont responsables de la grande majorité de la réponse cellulaire déclenchée par l'action de la thrombine.²⁰⁵ PAR1 est approximativement 10 fois plus sensible que PAR4, ce qui veut dire qu'il est activé par des concentrations de thrombine largement inférieures à celles de PAR4 (1nM pour PAR1 vs 10-30nM pour PAR4).^{198,204} PAR4 serait possiblement fonctionnel lorsque les plaquettes sont exposées à de fortes doses de thrombine et que PAR1 est désensibilisé. Ainsi, l'activation et l'agrégation plaquettaire en réponse à de faibles doses de thrombine sont médiées par PAR1, tandis que la stimulation plaquettaire à de forte concentration de thrombine est gouvernée par PAR4.²⁰⁶

La stimulation des PARs engendre une forte activation plaquettaire qui mène ultimement à la réorganisation du cytosquelette et à l'activation des intégrines, tel l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$; phénomènes cellulaires essentiels à l'adhésion ferme et à l'agrégation plaquettaire. Les voies de signalisation déclenchées suite à l'activation des PARs impliquent l'hydrolyse de la phosphoinositide (PI), la phosphorylation de plusieurs protéines, l'augmentation en calcium intracellulaire libre et la suppression de la synthèse de l'AMPc (l'AMPc est un puissant médiateur de l'inhibition plaquettaire). Les protéines hétérodimériques G $\alpha\beta\gamma$ sont responsables des diverses cascades signalétiques découlant de l'activation des PARs.⁹ Les plaquettes contiennent plusieurs familles de protéines G, G_{as} , G_{ai} , G_{aq} et $G_{\alpha_{12/13}}$, et au moins deux isoformes de la PLC, PLC β et PLC γ , tous impliqués dans la signalisation plaquettaire à la thrombine, à l'exception de la PLC γ qui occupe un rôle important dans l'activation au collagène.^{153,207-210} La figure 13 résume les principaux mécanismes de signalisation plaquettaire suite à l'activation des PARs.

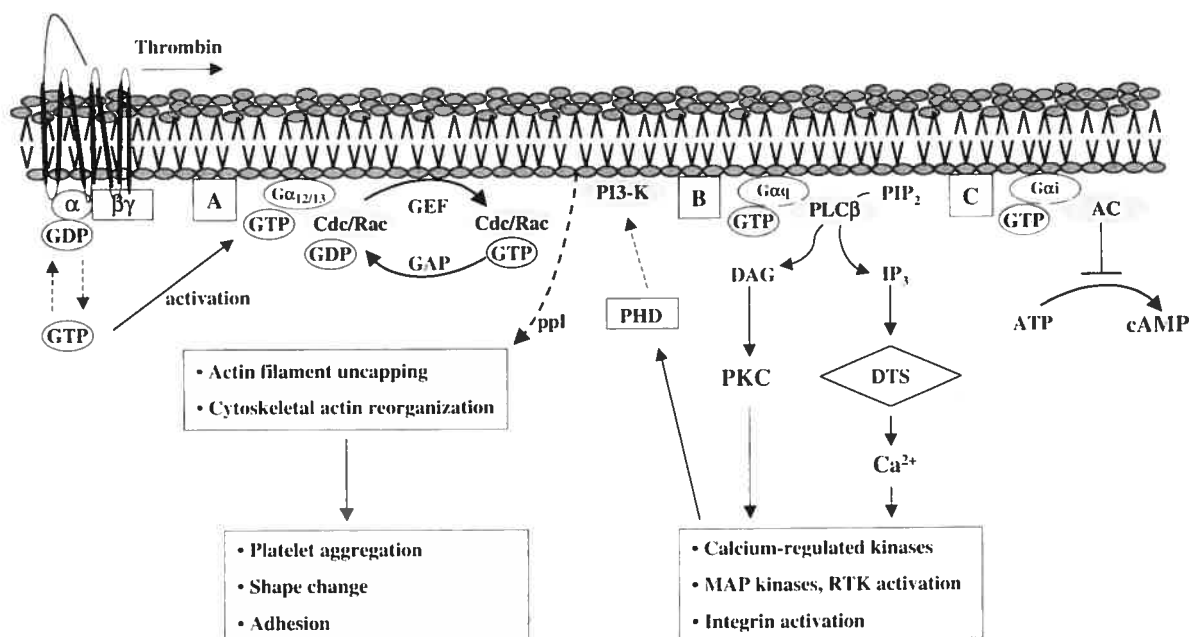


Figure 13 : Cascade signalétique intracellulaire via les PARs. (Alan D. Michelson. *Platelets*. 2002.)

Il existe trois principales voies signalétiques impliquées dans l'activation des PARs, soit celles découlant des protéines $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12/13}$ et $G_{\alpha i}$. La stimulation de $G_{\alpha q}$ active la voie de la PLC β , ce qui favorise l'activation des PKC et la libération du calcium intracellulaire sous l'action du DAG et de l'IP $_3$, respectivement.²¹¹ Cette voie est requise pour l'activation des intégrines et ainsi pour l'agrégation plaquettaire. La voie $G_{\alpha 12/13}$ est impliquée dans le changement de forme plaquettaire et dans le réarrangement du cytosquelette par l'intermédiaire des protéines Cdc42 et Rac1 sous l'action de la p115RhoGEF.²¹²⁻²¹⁴ Finalement, la stimulation de $G_{\alpha i}$ est responsable de l'inhibition de l'adényl cyclase et de l'AMPc.²¹⁵

Même si les cinétiques d'activation de PAR1 et PAR4 diffèrent, PAR1 étant plus sensible à la thrombine que PAR4, les mécanismes de signalisation déclenchés par ces deux récepteurs sont sensiblement les mêmes. Tous deux semblent être couplés à $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha 12/13}$, permettant ainsi l'activation de la PLC β et de la p115RhoGEF, respectivement (figure 14). Toutefois, comparativement à PAR1, PAR4 est incapable d'inhiber la formation d'AMPc, ce qui suggère qu'il n'est pas couplé à $G_{\alpha i}$.²¹⁶ De plus, la stimulation de PAR4 déclenche une réponse signalétique plus soutenue que celle de PAR1. Ce phénomène est démontré par la cinétique calcique intracellulaire, où PAR1 provoque une forte mais brève augmentation en calcium, tandis que l'activation de PAR4 engendre une plus faible mais plus longue augmentation en calcium.^{217,218}

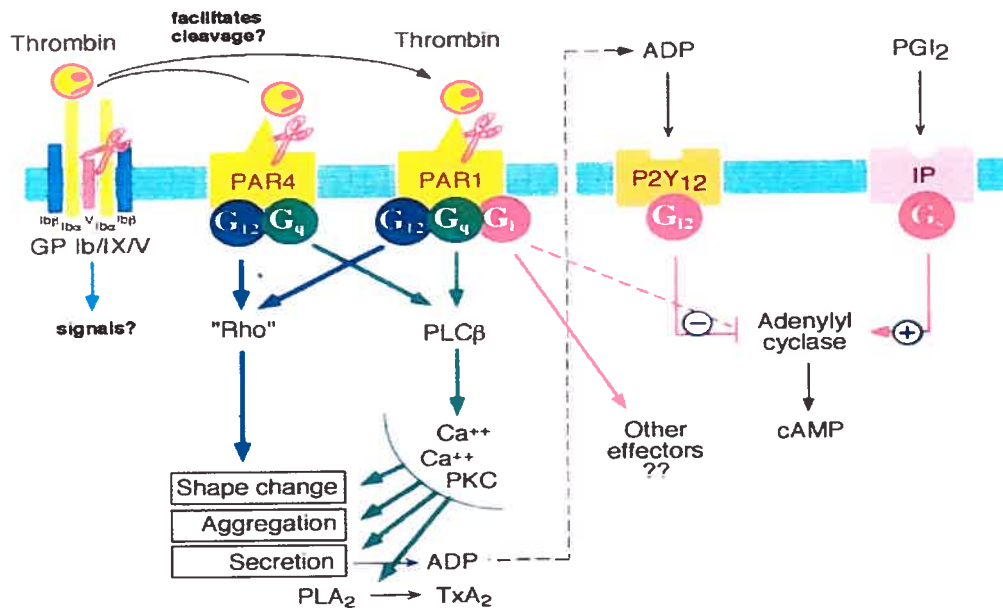


Figure 14: Rôle de PAR1 et PAR4 dans la signalisation plaquettaire à la thrombine. (Alan D. Michelson. *Platelets*. 2002.)

1.5.5 L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est sans équivoque le récepteur plaquettaire le plus fondamental à la fonction plaquettaire. Avec ses 80 000 copies par plaquette, il occupe une place primordiale dans l'agrégation, mais aussi dans l'adhésion plaquettaire. Suite à l'adhésion ferme des plaquettes à la matrice sous-endothéliale, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ change rapidement de conformation, ce qui favorise la liaison du fibrinogène et la formation d'un agrégat plaquettaire. L'interaction du fibrinogène avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ confère aux plaquettes une force adhésive leur permettant de résister aux pressions hémodynamiques de la circulation, mais elle engendre aussi une signalisation intracellulaire *outside-in* qui contribue à la solidification et à l'irréversibilité de l'agrégat plaquettaire.²¹⁹ En plus d'être

essentielle à la formation d'un agrégat plaquettaire ferme et stable, cette signalisation favorise la dégranulation complète des plaquettes, et leur confère une activité procoagulante.²²⁰

La signalisation plaquettaire *outside-in* débute suite à la liaison du fibrinogène et à la formation d'amas des récepteurs $\alpha_{IIb}\beta_3$ (clustering) à la surface membranaire.^{221,222} Des études effectuées à l'aide de plaquettes humaines et sur des cellules CHO (chinese hamster ovary) transfectées avec le récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ ont révélé la présence d'au moins trois voies signalétiques *outside-in* distinctes (figure 15).^{223,224}

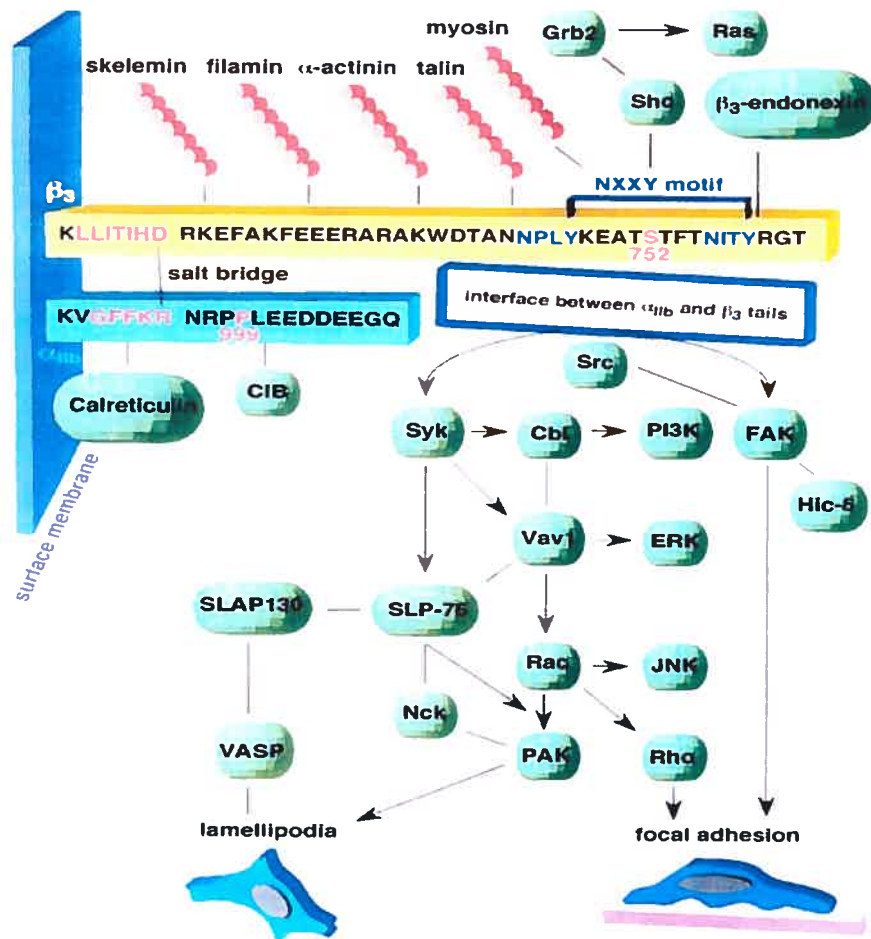


Figure 15 : Mécanisme de la signalisation plaquettaire *outside-in* de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. (Alan D. Michelson. *Platelets*. 2002.)

La première voie résulte de l'activation de la tyrosine kinase Syk, la deuxième provient de l'activation de la pp125^{FAK} et la troisième débute par la phosphorylation des résidus tyrosine de la queue cytoplasmique de la chaîne β_3 (figure 15). La voie caractérisée par l'activation de Syk et celle de la pp125^{FAK} sont toutes deux déclenchées suite à la formation de clusters des molécules d' $\alpha_{IIb}\beta_3$.^{225,226} Cependant, la voie de la pp125^{FAK} requiert, en plus, la stimulation plaquettaire à l'aide d'agonistes spécifiques, tels la TxA₂ ou l'ADP.²²⁶ De plus, l'activation de Syk nécessite la queue cytoplasmique des deux sous-unités du récepteur, l' α_{IIb} et la β_3 , comparativement à la voie signalétique de l'activation de la pp125^{FAK} qui ne requiert que la sous-unité β_3 .²²⁵

L'activation de la voie cellulaire médiée par la tyrosine kinase Syk provoque la phosphorylation séquentielle des protéines Cb1, Vav1, Rac et PAK. Cette signalisation est impliquée dans la formation de lamellipodes et dans l'étalement plaquettaire (focal adhesion).^{227,228} Cette cascade signalétique permet aussi l'activation de la SLP-76, une molécule adaptatrice multifonctionnelle activée par la tyrosine kinase Syk (figure 15).²²⁹ SLP-76 interagit avec la protéine Nck, ce qui permet le recrutement de PAK, la protéine effectrice de Rac. Aussi, SLP-76 interagit avec la SLAP-130, une autre molécule adaptatrice pour, ensuite, lier la protéine VASP et favoriser la formation de lamellipodes plaquettaires.

La deuxième signalisation outside-in provient de l'activation de la protéine FAK (pp125^{FAK}). Cette voie est peu caractérisée, mais il semblerait que l'activation de FAK lui permettrait d'interagir avec la protéine Hic-5, une molécule adaptatrice impliquée dans le phénomène d'étalement plaquettaire.²²³

Enfin, la queue cytoplasmique de la sous-unité β_3 contient deux motifs NXXY servant de séquences qui interagissent avec certaines protéines contenant des domaines de liaison phospho-tyrosine. Les résidus Y747 et Y759, compris dans la séquence des motifs NXXY, se retrouvent phosphorylés suite à l'agrégation plaquettaire, ce qui génère des sites de liaison pour plusieurs molécules signalétiques, comme la Shc²³⁰. Les motifs NXXY de la sous-unité β_3 possèdent aussi un site de reconnaissance pour la myosine et cette interaction semble occuper une place importante dans la rétraction du caillot sanguin *in vitro*.²³¹ L'importance physiologique de la signalisation *outside-in* de la sous-unité β_3 provient d'études chez des souris transgéniques où les résidus tyrosine 747 et 759 des motifs NXXY de la sous-unité β_3 furent substitués par des résidus phénylalanines. Les plaquettes de ces souris semblent être incapables de former des agrégats plaquettaires stables et démontrent un temps de saignement prolongé.²¹⁹

Chapitre II

Les Protéines Kinases C

2.1 Structure et fonction des Protéines kinases C

Les protéines kinases C (PKC) constituent une famille ubiquitaire de kinases sérine/thréonine qui occupent un rôle primordial dans le contrôle et la régulation de divers mécanismes cellulaires, tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, la survie, l'apoptose, et la sécrétion. Depuis leur découverte en 1977, les PKCs ont suscité un énorme intérêt scientifique se rapportant à plusieurs domaines d'étude et nous possédons, à ce jour, une meilleure compréhension de leur diversité fonctionnelle et de leur régulation pathophysiologique. Cependant, malgré ces avancements, l'implication spécifique des différentes isoformes des PKCs dans les processus physiologiques normaux demeure mal caractérisée. L'élucidation de ces mécanismes amélioreront nos connaissances sur les modes d'action spécifiques de ces enzymes dans les différents tissus et constitueront, certes, un potentiel thérapeutique de choix dans le traitement de nombreuses pathologies liées aux PKCs.

La famille des PKCs comprend 12 isoformes classées en trois sous-groupe structurellement et fonctionnellement distincts.¹⁵⁻¹⁸ Les isoformes conventionnelles (PKCc), PKC α , PKC β I, PKC β II et PKC γ , sont régulées par le diacylglycérol (DAG) et le Ca²⁺; les isoformes nouvelles (PKC η), PKC δ , PKC ϵ , PKC θ , PKC η et PKC μ , sont insensibles au Ca²⁺, mais dépendent du DAG; puis les isoformes atypiques (PKC α), PKC ζ et PKC ν/λ , sont insensibles au Ca²⁺ et au DAG (figure 16).¹⁹

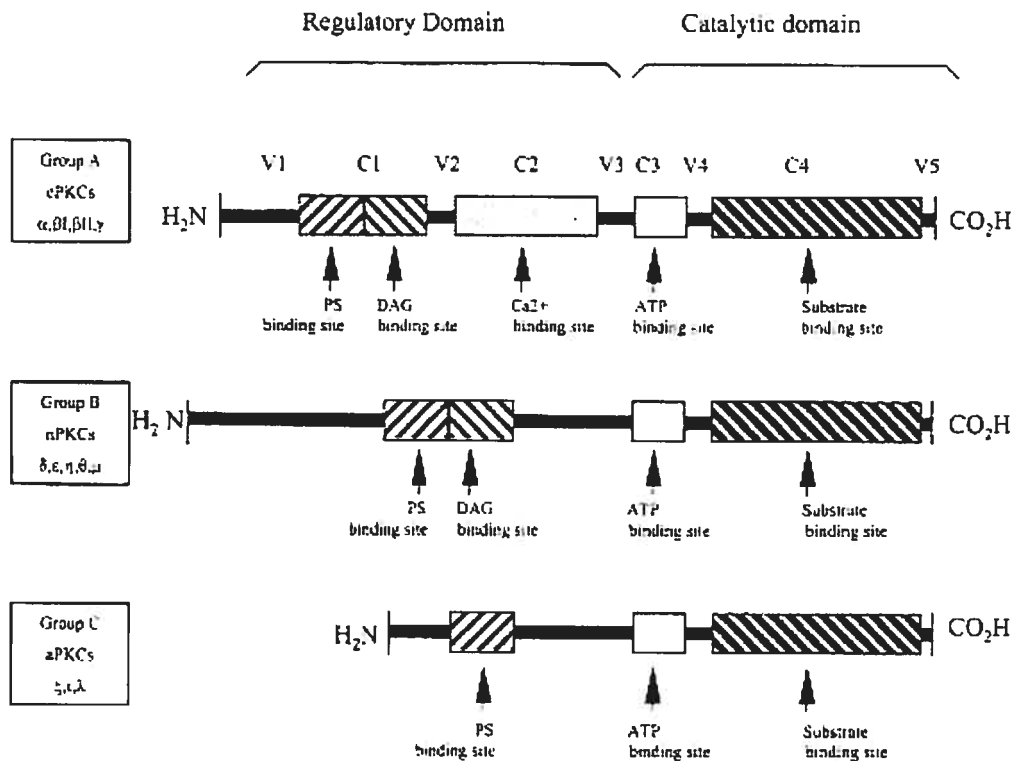


Figure 16: Structure des domaines régulateurs et catalytiques des PKCs. Les différentes isoformes sont divisées en trois catégories, soit les PKC α , les PKC β , et les PKC γ . Les régions conservées (C1-C4) et variables (V1-V5) des PKCs sont indiquées dans les domaines régulateurs et catalytiques. Idris I., and Donnelly GR. Protein kinase C activation : isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2001. 44:659-673.

La structure primaire des PKCs est divisée en quatre domaines conservés, C1-C4, séparés par cinq régions variables, V1-V5. Les régions C1, C2, V1, V2 et une partie de V3 de la portion NH₂-terminale de la chaîne polypeptidique constituent le domaine régulateur, alors que les régions C3, C4, V4 et V5 en CO₂H forment le domaine catalytique.²³² Chacune des 12 isoformes des PKCs possèdent un domaine catalytique (C3, V4, C4, et V5) identique et les différences structurales parmi les isoformes se situent au niveau des régions conservées et variables du domaine régulateur.^{233,234}

Les domaines fonctionnels se situent dans les régions conservées (C1-C4). Le domaine C1 contient deux motifs répétés riches en cystéine retrouvés dans toutes les isoformes, excepté pour les PKC atypiques (PKC ζ et PKC ι/λ) qui ne contiennent qu'un des deux motifs (figure 16).²³⁵⁻²³⁷ Ce domaine possède un site de liaison pour le DAG et la phosphatidylsérine (PS) et est essentiel à l'activation de la kinase.^{235,238} Le domaine conservé C1 contient aussi un site d'interaction pour les activateurs pharmacologiques, tels que le phorbol ester (PMA).^{238,239} La liaison du PMA requiert la présence des deux motifs cystéines, tandis que le DAG et la PS n'interagissent qu'avec un des deux motifs;²⁴⁰⁻²⁴² le premier motif étant responsable de la liaison du DAG et le second de la PS. Le domaine régulateur C2 n'est retrouvé que dans la famille des PKC conventionnelles et est responsable de la liaison du Ca²⁺.^{233,243-245} La délétion de ce domaine réduit considérablement l'activation des PKC conventionnelle, ce qui suggère que la présence de Ca²⁺ est essentielle à l'activité kinésique de cette famille.^{246,247} Le domaine catalytique C3 est présent dans toutes les isoformes des PKCs. Cette région constitue le site de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP) et cette interaction est fondamentale à l'activation des PKCs. D'ailleurs, la majorité des inhibiteurs pharmacologiques des PKCs employés aujourd'hui bloquent le domaine catalytique C3, ce qui empêche la liaison de l'ATP à son site d'interaction.^{248,249} Finalement, le domaine C4 représente le site de reconnaissance pour les substrats des PKCs. C'est à cet endroit que les PKCs interagissent avec leur substrat et les phosphorylent.^{232,250}

Les PKCs sont exprimées ubiquitairement à travers les différents tissus de l'organisme, cependant chaque isoforme montre une distribution particulière. Le tableau

2.1 résume la principale distribution tissulaire de chaque isoforme des PKCs ainsi que les facteurs requis pour leur activation.²⁵¹

Tableau 2.1 : Distribution tissulaire et facteurs d'activation requis pour les PKCs

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

Tel que mentionné plus haut, les PKCs jouent un rôle fondamental dans la régulation d'une multitude de mécanismes cellulaires. La nature de la réponse cellulaire engendrée par les PKCs est intimement reliée aux mécanismes menant à leur activation, de même qu'aux différents substrats et protéines d'interaction présents dans un type cellulaire donné. En effet, la fonction première des PKCs est d'interagir avec une protéine cible particulière, ce qui permet l'activation et la régulation d'une activité biologique cellulaire bien précise, telle que la sécrétion, la différenciation ou l'apoptose. Les protéines d'interactions des PKCs peuvent être classées en quatre catégories;²⁵² soit les protéines qui redirigent les PKCs vers leurs activateurs placés en amont (trafficking); celles qui permettent la localisation des PKCs vers des compartiments cellulaires bien spécifiques, tel que le cytosquelette; les protéines qui agissent comme substrats pour les

PKCs; puis, finalement, les protéines d'interaction formant un complexe signalétique avec les PKCs (figure 17).²⁵²

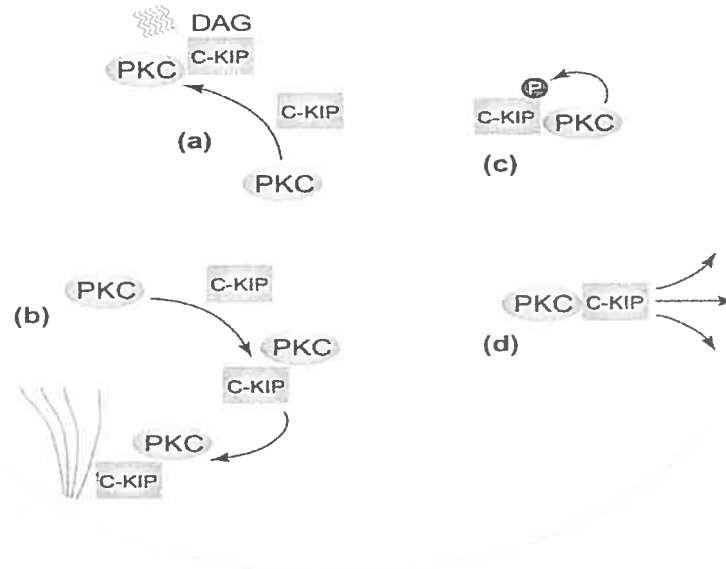


Figure 17: Mécanismes d'action des protéines interagissant avec les PKCs. Au niveau moléculaire, ces protéines sont classées en quatre catégories fonctionnelles distinctes. A) Les protéines qui redirigent les PKCs vers leurs activateurs en amont, B) les protéines d'interaction favorisant la translocation des PKCs vers des compartiments intracellulaire spécifiques, C) les protéines servant comme substrats pour les PKCs et D) les protéines formant un complexe signalétique avec les PKCs. C-KIP= Protéines d'interaction des PKCs. Poole AW., Pula G., Hers I., Crosby D., and Jones ML. PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2004. **25**: 528-535.

Une des fonctions majeures de ces protéines d'interaction consiste à réguler l'activation même des PKCs. Cette catégorie de protéines oriente les PKCs vers leurs activateurs principaux, comme le DAG. À titre d'exemple, la protéine InaD (inactivation no-after potentiel protein) retrouvé chez la *Drosophila* interagit directement avec les PKCs pour favoriser leur acheminement vers la phospholipase C, ce qui résulte en leur activation.²⁵³ Par ailleurs, certaines protéines interagissent avec les PKCs afin de permettre leur localisation vers des compartiments cellulaires particuliers, tels que le cytosquelette riche en actine; le cytosquelette constitue une cible de régulation importante des PKCs où elles interagissent avec d'autres protéines cibles, comme des récepteurs

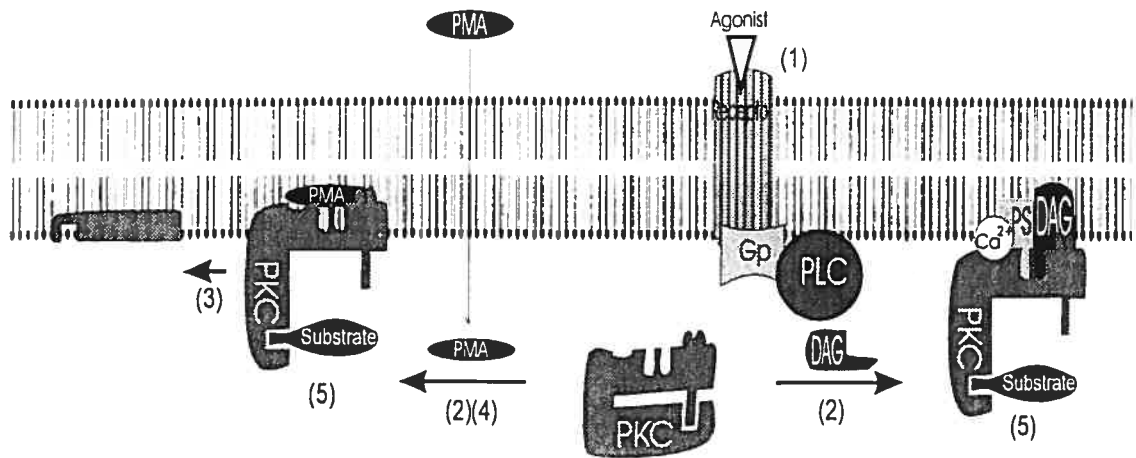
membranaires.²⁵⁴ La grande majorité des protéines d'interaction des PKCs sont qualifiés de substrats, c'est-à-dire que leur interaction avec les PKCs engendre leur phosphorylation.^{255,256} Le domaine C4 des PKCs possède un site de liaison attribué à la reconnaissance de leur substrat. Comme toute autre kinases sérine/thréonine, les PKCs catalysent le transfert d'un groupement phosphate terminal d'une molécule d'ATP à un résidu thréonine ou sérine (moins fréquent) d'une protéine cible. Les substrats protéiques des PKCs contiennent des motifs présentant des séquences particulières, telles que S*/T*XK/R, K/RXXS*/T*, K/RXXS*/T*XK/R, K/RXS*/T*, ou K/RXS*/T*XK/R (/ = ou, * = site de phosphorylation, et X = n'importe quel acide aminé), leur conférant ainsi une certaine spécificité.²⁵⁷ À ce jour, plus de 150 substrats protéiques des PKCs ont été identifiés.²⁵⁸⁻²⁶⁰ Ces protéines incluent des récepteurs membranaires et nucléaires, des protéines G, des enzymes, des protéines du cytosquelette, des proto-oncogènes, et toute autre protéine possédant une séquence cible pouvant être reconnue par les PKCs. Finalement, les PKCs peuvent interagir avec des protéines signalétiques, telles que d'autres kinases, afin de former un complexe protéique pouvant déclencher une réponse cellulaire particulière. Un exemple typique de ce genre d'interaction protéique est retrouvé dans les plaquettes où les tyrosines kinases Fyn et Btk interagissent avec les PKC δ et θ respectivement afin de réguler l'activité kinésique de ces protéines et de déclencher l'activation d'une voie signalétique spécifique.^{21,22} Au cours des dix dernières années, une multitude d'interactions protéiques avec les PKC ont été rapporté et les années à suivre révéleront certes la présence de nouveaux partenaires d'interactions importants dans l'activation et la régulation de divers mécanismes cellulaires. Le tableau 2.2 illustre une liste de protéines d'interaction des PKCs récemment identifiées.²⁵²

Tableau 2.2: Protéines d'interaction des PKCs récemment identifiées

Isoform	Direct or indirect interaction	Interacting protein	Function of interaction
PKC- α	Direct	DAGK ϵ , through the catalytic domain of DAGK	Controls the availability of DAG for PKC activation
PKC- α	Direct	Fascin, through the C1B domain of PKC- α	Regulation of cell-matrix contacts
PKC- α	Direct	Filamin A	Regulation of cell-matrix contacts
PKC- α	Direct	Lamin A, through V5 and C2 domains of PKC- α	Nooplastic transformation
PKC- α	Direct	Lamin B1, through V1 and C2 domains of PKC- α	Nooplastic transformation
PKC- α	Direct	PLD2 interacts with PKC- α but not with PKC- δ	PKC- α interaction regulates PLD2 activity
PKC- α	Direct	Syndecan 4, through its cytoplasmic domain	Localisation of PKC- α
PKC- α	Indirect	Kainate receptors, mediated by PICK1 and GRIP	Synaptic transmission through kainate and AMPA receptors
PKC- β	Direct	PKK (RIP4) in B cells	B cell development and proliferation
PKC- β I	Direct	GRK2 through its PH domain	GRK2 negatively regulates PKC- β I
PKC- β II	Direct	Gravin, which also associates with PKC- α but not with PKC- δ	In neuronal cells, gravin acts as an isozyme-selective scaffold
PKC- β II	Direct	Insulin receptor, through the catalytic domain of PKC- β II; PKC- β I and PKC- δ also interact	Inhibits insulin receptor activity in adipocytes
PKC- β III	Direct	Periconin, through the C1A domain of PKC- β III	Interaction required for cytokinesis
PKC- δ	Direct	Actin, through the C2 domain of PKC- δ	Crucial for activation of NKCC1 in airway epithelia
PKC- δ	Direct	PLD1 in melanoma cells; PLD1 also associates with PKC- α	PKC- α -mediated activation of PLD1 is inhibited by associated PKC- δ
PKC- δ	Direct	Fyn tyrosine kinase but not Syk, Src and Btk; Fyn does not interact with PKC- δ	Reciprocal kinase regulation in platelets
PKC- δ	Direct	PDGF- β and Src	Reactive oxygen induced remodelling of vascular smooth muscle
PKC- δ	Direct	Multiple Src family kinases including Src and Lyn	Src family kinase activity is required for activation of PKC- δ
PKC- δ	Direct	TNF- α receptor	Anti-apoptotic in neutrophils
PKC- δ	Direct	hNhtt (huntingtin), which also associates with PKC- α and PKC- ζ	Pro-apoptotic in neuronal cells
PKC- δ	Indirect	gp130 via STAT3 binding to the catalytic domain of PKC- δ	Important role in IL-6 signalling
PKC- δ	Direct	14-3-3 ζ , which also interacts with PKC- α	14-3-3 ζ differentially regulates PKC- α and PKC- δ in PC12 cells
PKC- δ	Direct	Bax, and 17 other proteins in a proteomic screen	Anti-apoptotic in human prostate cancer cells
PKC- δ	Direct	Cypher/ZASP through its LIM domain, which also associates with PKC- α and PKC- β	Enhanced interaction is associated with dilated cardiomyopathy
PKC- δ	Direct	Enigma homologue protein	Ternary complex enables PKC mediated regulation of N type Ca $^{2+}$ channels
PKC- δ	Direct	Lck	Cardioprotection
PKC- δ	Direct	MAPK	Cardioprotection by inactivation of Bad through phosphorylation by PKC- δ
PKC- δ	Direct	Myosin IIA, together with actin, α Cop and cytokeratin	Cell spreading in fibroblasts
PKC- δ	Direct	RACK1	Recruitment of NHERF1 to RACK1 at a site distinct from the PKC- δ site
PKC- δ	Direct	RACK2	Nitration of PKC- δ by NO induces activation and interaction with RACK2
PKC- δ	Direct	Src, through multiple interaction sites	Specific sites of interaction defined
PKC- δ	Direct	Mitochondrial permeability transition pore proteins	Interaction inhibits mitochondrial pore function, which leads to cardioprotection
PKC- δ	Direct	Insulin granules; PKC- α does not associate	Interaction essential for insulin secretion in response to glucose
PKC- δ	Indirect	NHERF1 via RACK1	RACK1 ternary complex might regulate Cl $^{-}$ flux controlled by CFTR
PKC- δ	Indirect	N type Ca $^{2+}$ channel via enigma homologue protein	Ternary complex to enable PKC regulation of N type Ca $^{2+}$ channels
PKC- δ	Indirect	Integrin β -chains via RACK1	Cell adhesion in glioma cells
PKC- δ	Indirect	β 1-integrin	Recycling of β 1-integrin, increasing cell motility
PKC- δ	Direct	α 1- and α 4-subunits of the GABA $_A$ receptor, which do not interact with PKC- δ and PKC- ϵ	Ethanol induced GABA response in cerebral cortex
PKC- δ	Direct	Btk through its PH domain; Btk does not interact with PKC- α , PKC- β , PKC- δ and PKC- ϵ	Mutual regulation of Btk and PKC- δ in platelets
PKC- δ	Direct	Cytokine-induced SH2 protein, which also interacts with PKC- α and PKC- β	Induction of AP-1 and NF- κ B in TCR signalling
Atypical PKCs	Direct	Par-6 adapter through its PB1 and OPCA domains	Localization to epithelial tight junctions
Atypical PKCs	Direct	Rab2 through the Rab2 N terminus and PKC- δ / ϵ regulatory domain	Rab2 interaction inhibits PKC- δ / ϵ
Atypical PKCs	Direct	PAR4, an inhibitor of atypical PKCs	Mediates JNK activation and T cell differentiation
Atypical PKCs	Indirect	TRAF6 via p62 adaptor	Ternary complex of TRAF6, p62 and an atypical PKC in osteoclasts controls bone remodelling
PKC- ζ	Direct	I κ B kinase	Inflammatory response in intestinal epithelia
PKC- ζ	Direct	ZIP3, through several domains of ZIP3	Ternary complex with neuronal GABA $_A$ receptors
Multiple	Direct	CPI-17, through cysteine rich domain of PKCs	Complex between PKCs, CPI-17, CKI, and CKI- γ inhibits MLCP
Multiple	Direct	gC1qBP	gC1qBP (p32) coordinates signalling by many PKC isoforms in hepatocytes

2.2 Activation et régulation des Protéines kinases C

L'activation des PKCs est un processus moléculaire complexe qui requiert la présence d'activateurs endogènes, tels que le DAG et le Ca^{2+} (pour les PKCs conventionnelles), mais qui dépend aussi des mécanismes de phosphorylation et de translocation vers la membrane des kinases. La figure 18 décrit les principaux mécanismes cellulaires impliqués dans l'activation des PKCs.



- (1) Receptor activation
- (2) Translocation
- (3) Down-regulation
- (4) Membrane insertion
- (5) Substrate phosphorylation

Figure 18: Représentation schématique des mécanismes moléculaires de l'activation des PKCs. La voie d'activation endogène débute suite à l'activation d'un récepteur membranaire et à la production subséquente du DAG par l'action de la PLC. Le DAG favorise la translocation des PKC vers la membrane où elles peuvent, par la suite, interagir avec le Ca^{2+} et la phosphatidylsérine (PS). La formation de ce complexe induit un changement de conformation structurale permettant la liaison et la phosphorylation des substrats des PKCs. Les PKCs peuvent aussi être activées par des substances exogènes, telle que le PMA (phorbol ester). Le PMA mime l'action du DAG et du Ca^{2+} en se liant aux deux motifs cystéines du domaine C1, ce qui engendre l'activation et l'interaction des substrats aux PKCs. Liu J. Protein Kinase C and its substrates. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1996. 116: 1-29.

L'activation des PKCs est amorcée suite à la génération des seconds messagers, le DAG et le Ca^{2+} , produits par l'hydrolyse de la PIP_2 membranaire sous l'action de la PLC. Le DAG interagit avec le domaine C1 de la région régulatrice et cette association favorise

la translocation des PKCs vers la membrane plasmique où elles peuvent alors lier le Ca^{2+} et les phospholipides membranaires, tels que la phosphatidylsérine (PS) afin de solidifier l'ancrage des PKC à la membrane.^{18,261} La PKC dans sa conformation active est donc retrouvée au niveau de la membrane au sein d'un complexe protéique comprenant le DAG, le Ca^{2+} et la PS, tous associés à leur site de liaison respectif sur la kinase.²⁶² Ces interactions protéiques entraînent un changement conformationnel permettant la liaison et la phosphorylation des substrats des PKCs.²⁶³⁻²⁶⁵ Les mécanismes d'activation des nouvelles PKCs (PKC δ , PKC ϵ , PKC θ , PKC η et PKC μ) ressemblent largement à ceux des PKCs conventionnelles, sauf qu'ils ne requièrent pas la présence du Ca^{2+} . Quant aux PKCs atypiques (PKC ζ et PKC ι/λ), leurs mécanismes d'activation moléculaire sont moins caractérisés, mais elles semblent être insensibles au Ca^{2+} et au DAG.¹⁹ Toutefois, leur activation nécessite la liaison du PS au domaine C1 apparenté de la sous-unité régulatrice, ce qui permet leur ancrage à la membrane plasmique. La PIP₃ (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate), produit principalement par la PI-3 kinase, serait aussi impliquée dans l'activation et la phosphorylation de cette famille de PKC.²⁶⁶ De plus, la céramide, un composé dérivé de l'hydrolyse de la sphingomyéline, a été démontré essentiel à l'activation complète de la PKC ζ .²⁶⁷

Interactions des PKCs avec des activateurs endogènes

Il existe trois principales substances endogènes pouvant interagir avec les PKCs lors de leur activation, soit le DAG, le Ca^{2+} et la PS. La liaison du PS est essentielle à l'activation de toutes les PKCs et cette association permet principalement l'ancrage des kinases à la membrane plasmique. Cette interaction peut s'effectuer par une attraction électrostatique en absence de cations métalliques²⁶⁸, mais elle est toutefois renforcée en

présence du Ca^{2+} .^{262,269-272} Par ailleurs, de même que le Ca^{2+} renforce la liaison du PS aux PKCs, le PS accroît le nombre d'ions Ca^{2+} liés au PKCs : en absence de PS, une molécule de PKC lie un ion Ca^{2+} , tandis qu'en présence de PS, au moins 8 ions Ca^{2+} se lient à une molécule de PKC.²⁷³ Même en présence de ce complexe PS- Ca^{2+} , l'activation complète des PKCs nécessite une liaison avec le DAG. La principale voie impliquée dans la production du DAG est celle qui découle de l'hydrolyse de la PIP_2 membranaire par la PLC. Cependant, il semble exister d'autres voies signalétiques pouvant générer le DAG, telle que l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC), le phospholipide prédominant des membranes cellulaires.²⁷⁴⁻²⁷⁶ Cette réaction est catalysée par la phospholipase D (PLD) et produit l'acide phosphatidique (PA) qui, lui, est dégradé en DAG par la phosphomonoestérase. En plus d'être essentiel à la translocation des PKCs vers la membrane plasmique, le DAG augmente l'affinité de l'interaction PS/PKC et diminue la concentration en Ca^{2+} requise pour l'activation des PKCs. En absence de DAG, les PKCs ne s'activent que lorsque la concentration intracellulaire en Ca^{2+} est augmentée de 100 fois, ce qui suggère que la liaison du DAG accroît considérablement l'affinité de l'interaction PKC / Ca^{2+} .^{277,278} Bref, dans sa conformation active, la molécule de PKC est retrouvée au niveau de la membrane sous la forme d'un complexe quaternaire, incluant le DAG, le Ca^{2+} , le PS et l'enzyme elle-même; chacune de ces interactions étant influencée par l'autre.

Outre ces trois principales substances endogènes, les PKCs peuvent aussi être activées par des composantes lipidiques membranaires, comme les acides gras et les lysophospholipides.²⁷⁹⁻²⁸¹ Ces produits dérivent essentiellement des membranes cellulaires et sont catalysés par la phospholipase A_2 (PLA_2). Les acides gras insaturés,

tels que l'acide arachidonique et l'acide linoléique sont capables d'activer toutes les PKCs conventionnelles.²⁸² Cette réaction ne dépend que de très faibles concentrations de Ca^{2+} (moins de $1\mu\text{M}$), ne requiert pas la présence du PS et est potentialisée par le DAG.²⁸³⁻²⁸⁵ Les acides gras insaturés constituent également de puissants activateurs de la classe des nouvelles PKCs.²⁸⁶ Finalement, les lysophospholipides, en particulier la lysophosphatidylcholine, peuvent significativement potentialiser l'activation des PKCs conventionnelles, mais leur action dépend toutefois de la présence des activateurs principaux des PKCs conventionnelles, soit le DAG, la PS et le Ca^{2+} .^{287,288}

Phosphorylation des PKCs

L'activation des PKCs requiert obligatoirement la liaison des substances activatrices endogènes, telles que le DAG, le PS et le Ca^{2+} , mais dépend aussi des mécanismes de phosphorylation post-traductionnelle de la protéine. La phosphorylation des PKCs se produit au niveau du domaine catalytique de l'enzyme et ce phénomène est essentiel à l'activité kinésique et à l'interaction et à la phosphorylation des substrats des PKCs.²⁸⁹ La phosphorylation des PKCs est un processus qui régule la maturation, l'activation et même l'inactivation de l'enzyme.

Il existe deux principaux types de phosphorylation, soit l'autophosphorylation sur des résidus sérine/thréonine et la transphosphorylation sur des résidus tyrosine et/ou sérine/thréonine.²⁹⁰ L'autophosphorylation signifie que la PKC se phosphoryle à elle-même, tandis que la transphosphorylation représente une phosphorylation provenant d'une autre kinase. À ce jour, plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés et les résidus impliqués (sérine/thréonine ou tyrosine) varient d'une isoforme de PKC à une autre. À titre d'exemple, la phosphorylation de la thréonine 500 sur la PKC βII a été

démontrée essentielle à l'activation de cette isoforme.^{291.292} Ce résidu semble être phosphorylé par une autre kinase et constitue donc une transphosphorylation.²⁹³ Par ailleurs, la phosphorylation de la thréonine 497 de la PKC α est requise pour l'activité catalytique de l'enzyme et des études mutagéniques ont révélé qu'il s'agissait dans ce cas d'une autophosphorylation.^{289.294} Dû aux différents sites de phosphorylation identifiés sur les nombreuses isoformes des PKCs, il est difficile d'élaborer un schème de phosphorylation universelle s'appliquant à toutes les PKCs. Par contre, il semble que certains événements de phosphorylation demeurent essentiels à l'activité de la grande majorité des PKCs et il est donc possible d'établir une certaine cascade de phosphorylation pouvant s'appliquer aux PKC en général. Afin d'atteindre la maturation complète, les PKCs traversent trois phases de phosphorylation importantes lors de leur activation. La première phase est obligatoirement une transphosphorylation sur un résidu compris dans la boucle d'activation du domaine catalytique et cette étape confère à la kinase une conformation la rendant apte à suivre l'autophosphorylation. Par la suite, les PKC s'autophosphorylent sur la thréonine 641, ce qui permet à l'enzyme d'être catalytiquement compétente et de lier ses substrats. Finalement les PKCs suivent une deuxième autophosphorylation sur la sérine 660 permettant ainsi la dissociation de l'enzyme activée de la membrane au cytosol de la cellule.²⁹⁰

Translocation des PKCs vers la membrane

Une des étapes importantes de l'activation des PKCs est la redistribution intracellulaire de l'enzyme. Il est aujourd'hui grandement accepté que l'activation des PKCs soit associée à la translocation de la protéine du cytosol à la surface membranaire et que ce mécanisme constitue un indice important de l'activité enzymatique de la

kinase.²⁹⁵⁻²⁹⁷ Ce phénomène a été démontré dans plusieurs systèmes, mais il semble que le degré de corrélation entre la translocation membranaire et l'activation enzymatique dépend fortement du type de cellule. Par exemple, l'activation des cellules pituitaires antérieures à la vasopressine, entraîne la phosphorylation de la protéine MARCKS (myristoylated alanin rich C-kinase substrate), un substrat majeur des PKCs, sans toutefois provoquer la translocation des PKC vers la membrane.^{298,299} Cette étude, ainsi que d'autres, nous indiquent que même si la translocation des PKCs vers la membrane plasmique représente en général un indice important de l'activation des PKCs, l'étude de phosphorylation des substrats des PKCs demeure un outil plus précis de l'activité enzymatique.

Les mécanismes moléculaires exacts de la translocation membranaire des PKCs sont mal caractérisés, mais plusieurs facteurs et protéines impliqués dans ce phénomène ont été rapportés. Par exemple, la production de phospholipides acides, la présence de longues chaînes d'acides gras insaturés, un pH acide, la mobilisation intracellulaire calcique et la présence d'ATP, semblent promouvoir la redistribution des PKCs vers la membrane plasmique.^{262,272,300-302} L'interaction des PKCs à la membrane implique la liaison des protéines aux PS et est potentialisée en présence de Ca^{2+} .²⁷⁰ En plus de se retrouver associés aux phospholipides, les PKCs peuvent aussi interagir certaines protéines d'ancrage de la membrane plasmique, telles que la PKCI (PKC inhibitor protein), l'annexine I et les RACKs (receptors for activated C kinase).³⁰³⁻³⁰⁵ D'ailleurs, ces protéines possèdent une séquence conservée de 16 acides aminés pouvant représenter un domaine de liaison direct pour les PKCs.³⁰³

Plusieurs données expérimentales suggèrent que les PKCs peuvent aussi interagir avec la membrane nucléaire. Il semble que le domaine catalytique des PKCs se lie à un récepteur nucléaire spécifique facilitant la translocation des PKCs vers le noyau.³⁰⁶ Par contre, la nature de ce récepteur et les mécanismes de translocations demeurent inconnus. Les PKCs peuvent entraîner la phosphorylation de plusieurs protéines nucléaires, comme les lamines, l'ADN topoisomérase II, la protéine de liaison CCAAT (séquence d'ADN) et la myogénine, et il semble que la régulation fonctionnelle de ces protéines soit en partie dépendante de cette phosphorylation.³⁰⁷⁻³¹⁰

Bref, l'activation des PKCs est sans doute un mécanisme moléculaire complexe qui comprend plusieurs étapes séquentielles et coordonnées, dont les plus importantes sont l'interaction avec des substances activatrices endogènes, la phosphorylation et la translocation vers la membrane plasmique.

L'activation et les événements qui suivent l'activation des PKCs sont étroitement reliés à des mécanismes de régulation bien définis. Ces mécanismes sont essentiels au bon fonctionnement des PKCs et assurent l'intégrité des effets qui en découlent. Il existe plusieurs mécanismes de régulation des PKCs, dont les plus importants sont la régulation par le site du pseudosubstrat, les mécanismes de rétroaction, la désensibilisation enzymatique et la régulation de l'activité des PKCs par des protéines intracellulaires.

Le site du pseudosubstrat

Au repos, l'activité cellulaire des PKCs est maintenue à un faible niveau par des mécanismes d'auto-inhibition. Le site du pseudosubstrat est une séquence en acides aminés comprise entre les résidus 19 et 31 de la région C1 du domaine régulateur.²⁶³ Cette séquence est impliquée dans le contrôle de l'activité enzymatique des PKCs. Au

repos, ce site se lie fermement à la région du domaine C4 généralement responsable de l'interaction des substrats aux PKCs.^{263,311-313} Cette interaction est d'une importance capitale puisqu'elle maintient l'enzyme sous une forme inactive en bloquant la liaison des protéines aux PKCs. Suite à l'activation, la liaison du DAG et du PS provoque un changement de conformation, ce qui libère la région du domaine C4 et permet l'interaction des substrats aux PKCs.^{263,314} Le site du pseudosubstrat constitue un des éléments régulateurs les plus importants et assure le contrôle des mécanismes intracellulaires.

Les mécanismes de rétroaction

L'activité enzymatique des PKCs est également régulée par des mécanismes de rétroaction. Cette régulation peut se produire à différents niveaux, soit par des récepteurs membranaires, des protéines G, des phospholipases et par les PKCs elles-mêmes. À date, plusieurs boucles de rétroaction entre les PKCs et un nombre de protéines intracellulaires ont été mises en évidence. Un des mécanismes de rétroaction le plus étudié est celui entre la PLC et les PKCs. Il a été démontré que les PKCs peuvent négativement réguler l'activité de la PLC (l'enzyme qui catalyse la formation du DAG).³¹⁵⁻³¹⁹ Cette boucle de rétroaction négative a été observée dans plusieurs systèmes et elle permettrait de limiter la production du DAG générée par l'hydrolyse de la PIP₂.³²⁰⁻³²² Parallèlement, les PKCs exercent un contrôle positif sur l'activité de la PLD qui, elle, est responsable de la production du DAG via l'hydrolyse de la PC.^{250,323} Ces deux mécanismes régulateurs seraient responsables des deux vagues de production du DAG observées suite à l'activation cellulaire. La première vague, celle qui provient de l'hydrolyse de la PIP₂ par la PLC, est plus rapide et moins soutenue, tandis que la deuxième vague, hydrolyse de la

PC par la PLD, entraîne une plus grande production de DAG et est plus persistante.^{324,325}

Cette deuxième vague permettrait l'activation prolongée des voies de signalisation découlant des PKCs pendant plusieurs heures.^{250,326} Bref, l'activation des PKCs peut servir comme un point de contrôle qui limite l'hydrolyse de la PIP₂ tout en activant celle de la PC.

Désensibilisation des PKCs

La stimulation prolongée des PKCs à l'aide d'activateurs directs, tel que le PMA, peut entraîner la désensibilisation des protéines, par un mécanisme de protéolyse enzymatique.^{232,327} Ce processus de régulation a été démontré pour la plupart des isoformes exposées à des concentrations variées de PMA pour de longues périodes de stimulation (10-72 heures).³²⁸⁻³³⁰ Les mécanismes de désensibilisation des PKCs sont reliés à une dégradation enzymatique et non à une baisse de synthèse protéique puisque l'inhibition de certaines protéases limite considérablement la désensibilisation des PKCs, tandis que la cycloheximide (un puissant inhibiteur de la synthèse protéique) n'a aucun effet sur ce mécanisme.³³¹ De plus, plusieurs protéases, dont la calpaine et les protéases à sérines, semblent être directement impliquées dans le processus de dégradation enzymatique des PKCs.^{327,332} Le phénomène de désensibilisation des PKCs nécessite l'association des enzymes à la membrane plasmique. La liaison des PKCs à la membrane induirait un changement de conformation exposant ainsi certains sites de clivages reconnus par les protéases responsables de la dégradation des enzymes.²⁹³

Régulation des PKCs par des protéines intracellulaires

Il existe plusieurs protéines d'interaction qui peuvent réguler l'activité enzymatique des PKCs. Parmi ces protéines, l'inhibiteur I des PKCs (PKC inhibitor I) est

la mieux caractérisée. Cette dernière est un puissant inhibiteur de l'activité des PKCs, mais son mécanisme d'action et son implication physiologique demeure encore mal caractérisés.^{333,334} Toutefois, il semble que cette protéine puisse interagir avec un site de liaison autre que celui du Ca^{2+} , du DAG ou du PS, afin d'empêcher l'association des PKC à la membrane plasmique.³³⁴

Une autre famille de protéines largement impliquée dans la régulation des PKC est celle des protéines 14-3-3. Ces protéines sont exprimées de façon ubiquitaire à travers l'organisme et occupent une place importante dans la régulation de divers mécanismes cellulaires. Les protéines 14-3-3 sont également de très puissants inhibiteurs des PKCs et sont d'ailleurs nommés les protéines inhibitrices des kinases C (kinase C inhibitor proteins ou KCIP).^{305,335} Leur mode d'action consiste à inhiber le domaine C1 des PKCs et à entrer en compétition avec les substrats des PKCs, tels que l'ATP, le Ca^{2+} et le DAG.^{305,335,336} De plus, les protéines 14-3-3 inhibent aussi la translocation des PKCs vers la membrane plasmique.³⁰³

2.3 Voies de signalisation dépendantes des Protéines kinases C

Les PKCs sont impliquées dans une multitude de voies signalétiques régulant la prolifération et la différenciation cellulaire, la survie, l'apoptose, la sécrétion, et bien d'autres. Les mécanismes de signalisation médiés par les PKCs dépendent de l'isoforme, du type cellulaire et de la stimulation en question. La spécificité des voies de signalisation découle largement de la liaison entre les PKCs et leurs protéines d'interaction, telles que les RACKs (receptors for activated C kinases) et les STICKS (substrates that interact with C kinases).^{253,256} Ainsi, chaque isoforme de PKC interagit

avec une protéine différente et déclenche subséquemment une signalisation particulière. Somme toute, il existe trois voies signalétiques principales qui découlent de l'activation des PKCs, soit la cascade signalétique de la Raf/MEK/ERK, celle de l'activation de la NF- κ B et de l'AP-1, et la voie signalétique de l'apoptose (figure 19).

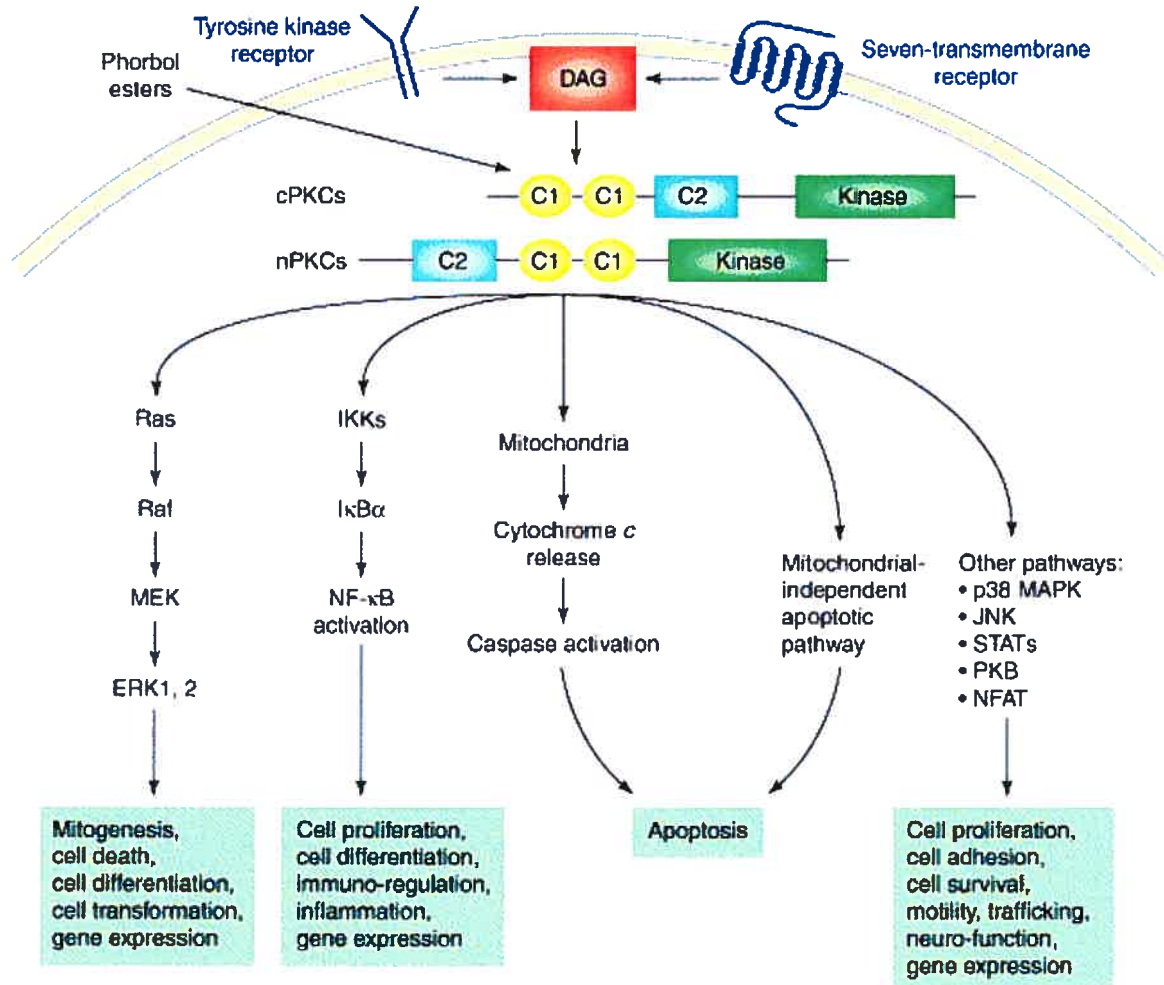


Figure 19 : Mécanismes signalétiques découlant de l'activation des PKCs. Le DAG est produit suite à l'activation des récepteurs à sept passages transmembranaires et des récepteurs tyrosine kinases, et déclenche l'activation des PKCc et des PKCn. Les trois voies signalétiques principales dépendantes des PKCs sont illustrées : la voie de la Raf/MEK/ERK, de la NF- κ B et de l'AP-1, et de l'apoptose. Voir texte pour abréviations. Yang C and Kazanietz MG. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2003. 24: 602-608.

La cascade Raf/MEK/ERK

La voie signalétique des MAPKs (mitogen activated protein kinase) est largement impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire dans presque tous les types cellulaires. Les PKCs participent activement dans la régulation de cette cascade, mais la réponse physiologique qui en découle dépend de l'isoforme et du tissu en question. Par exemple, la stimulation des cellules NIH3T3 au PMA, active la PKC α et la voie de ERK afin de promouvoir la prolifération cellulaire.³³⁷ Par contre, l'activation de la PKC α dans les cellules rhabdomyosarcomales humaines, déclenche la cascade signalétique de ERK, JNK (c-JUN N-terminal protein kinase) et de la p38 MAPK, ce qui favorise l'arrêt de croissance et la différenciation myogénique.³³⁸ Un autre exemple de cette complexité provient d'études effectuées auprès de cellules musculaires squelettiques L6, où l'activation de la PKC β et non la PKC α par l'insuline, stimule la ERK et la synthèse de l'ADN.³³⁹ Dans cette même optique, malgré que les forces de cisaillement activent la PKC α et la PKC ϵ dans les cellules endothéliales, seule la PKC α contribue à la stimulation de ERK.³⁴⁰

La PKC δ est généralement identifiée comme une isoforme impliquée dans l'arrêt de croissance cellulaire et l'apoptose.³⁴¹⁻³⁴³ Toutefois, il a été démontré que cette isoforme peut activer la cascade signalétique de la ERK afin de réguler la prolifération et la différenciation cellulaires. Cette signalisation fut observée dans des cellules COS et NIH3T3 par un mécanisme dépendant de la Raf, mais indépendant de la Ras. Des réponses cellulaires opposées ont aussi été identifiées pour la PKC ϵ .³⁴⁴ Dans la majorité des systèmes cellulaires, la stimulation de ERK par la PKC ϵ déclenche la prolifération et la survie cellulaire. Par exemple, la stimulation des cellules épithéliales de l'intestin à la

leukotriène D₄ favorise la croissance de ces cellules par un mécanisme dépendant de l'activation de la PKC ϵ et de la voie signalétique de la ERK.³⁴⁵ Par ailleurs, la PKC ϵ exerce un effet cardioprotecteur suite à l'ischémie via l'activation de la ERK et JNK.^{346,347} Par contre, dans certaines circonstances la voie signalétique PKC ϵ /ERK entraîne la mort cellulaire. C'est le cas les cellules épidermiques JB6 où l'activation de cette cascade induit l'apoptose.³⁴⁸ Bref, la voie de la Raf/MEK/ERK est largement impliquée dans la signalisation des PKCs, mais son activation engendre des réponses cellulaires bien diversifiées qui dépendent fortement du contexte cellulaire (type de cellule) et de l'isoforme de PKC en cause.

La cascade de la NF- κ B et de l'AP-1

Les protéines NF- κ B (nuclear factor- κ B) et AP-1 (activator protein-1) sont des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'inflammation, de la survie cellulaire et de la transformation néoplasique.³⁴⁹ Généralement, l'activation de la NF- κ B résulte de la phosphorylation et de la dégradation de l'I κ B (inhibitor of κ B), un processus déclenché par les IKKs (I κ B kinases). La cascade signalétique de la NF- κ B et de l'AP-1 est principalement dépendante de l'activation des PKCs. Des études effectuées auprès de souris transgéniques semblent indiquer que la PKC β contrôle l'activation de la NF- κ B dans les cellules lymphocytaires B,^{350,351} tandis que la PKC θ serait responsable de ce mécanisme de régulation dans les cellules lymphocytaires T. Dans ces cellules, l'activation de la voie PKC θ / NF- κ B et AP-1 stimulerait la transcription génique de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-2 (interleukin 2).^{352,353} De plus, une étude récente démontre que l'activation de la PKC θ dans les cellules lymphocytaires T peut

activer le facteur nucléaire NFAT (nuclear factor of activated T cells), indépendamment de la NF- κ B.³⁵⁴ Ensemble, ces études révèlent l'importance de la voie PKC (en particulier PKC θ)/ NF- κ B et AP-1 dans la régulation immunologique et inflammatoire des cellules B et T. Ces trouvailles pourraient faciliter le développement d'une cible thérapeutique dans le traitement des maladies auto-immunes et des lymphomes, par exemple.

La cascade de l'apoptose

L'activation de certaines isoformes de PKC peut entraîner l'arrêt de prolifération et même la mort cellulaire, soit l'apoptose. La cascade d'activation de l'apoptose, découlant des PKCs, comprend les voies signalétiques dépendantes des enzymes mitochondriales (caspases) et celles indépendantes des mitochondries. La PKC δ semble être l'isoforme principale impliquée dans cette cascade et plusieurs données expérimentales pointent vers son rôle dans l'apoptose.³⁴¹ Dans les cellules kératinocytaires et HeLa, la PKC δ est redistribuée vers la membrane mitochondriale en réponse au PMA, où elle réduit le potentiel membranaire et favorise ainsi la relâche des enzymes du cytochrome c et l'activation des caspases.^{342,343} De plus, la PKC δ serait clivée par la caspase-3 et le fragment catalytique produit par cette réaction pourrait amplifier le signal apoptotique en cours.^{355,356} Cependant, ce clivage enzymatique n'est observé que dans des tissus particuliers et qu'en présence d'activateurs spécifiques. Tel que mentionné, les PKCs peuvent aussi déclencher l'apoptose via des mécanismes indépendants des enzymes mitochondriales. Un exemple d'un tel mécanisme, provient d'une étude qui démontre que la PKC δ peut s'associer avec la membrane nucléaire et provoquer des dommages à la

structure de l'ADN, pour entraîner par la suite l'apoptose.³⁵⁷ Afin de valider l'implication de la PKC δ dans l'apoptose cellulaire, Mecklenbrauker et al³⁵⁸ ont démontré que des souris déficientes en PKC δ possèdent un compte cellulaire en lymphocyte B supérieure au groupe contrôle.³⁵⁸ Par contre, cette voie signalétique, PKC δ /apoptose, n'est pas universelle; dans certains tissus, tels que dans les cellules MCF-7, la PKC δ est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire,³⁵⁹ puis dans les cellules tumorales du poumon elle favorise la croissance et la différenciation cellulaire.³⁶⁰

En résumé, aucune généralité sur les voies de signalisation dépendantes des PKCs, et les effets biologiques qui en découlent, ne peut être appliquée; une même isoforme de PKC peut médier des réponses cellulaires contraires dans des tissus différents et chacune de ces isoformes semble jouer un rôle bien particulier dans une même cellule. Bref, la compréhension des mécanismes de régulation des PKCs, tels que leurs différents partenaires d'interactions ou leurs modes de phosphorylation, est essentielle à l'élucidation et à l'identification des différentes fonctions signalétiques des PKCs à l'intérieur d'une même cellule.

2.4 Rôles des Protéines kinases C dans la fonction plaquettaire

Les PKCs, comme dans la majorité des cellules, occupe une place fondamentale dans la physiologie des plaquettes. Plusieurs isoformes de PKCs ont été identifiées dans les plaquettes (α , β , δ , θ , ϵ , η , ζ et μ) et il est présumé que chacune de ces isoformes joue un rôle particulier dans la fonction plaquettaire.³⁶¹⁻³⁶⁵ Malgré que la contribution spécifique de chacune de ces isoformes dans la fonction plaquettaire soit mal

caractérisée, il est bien établi que les PKCs, en général, sont indispensables aux grandes fonctions des plaquettes, soit l'adhésion ferme et l'activation, la sécrétion et l'agrégation.

Adhésion et activation

Tel que discuté dans la section 1.4.1 du premier chapitre, l'adhésion plaquettaire dépend de trois molécules d'adhésion principales; le complexe GPIb/IX/V, la GPVI et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$. La GPIb permet l'adhésion de premier contact sur les molécules du vWF, tandis que la GPVI et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ sont responsables de l'adhésion ferme des plaquettes sur la matrice.^{63,66} Suite à ces interactions de premier et second contact, les plaquettes s'activent (via ces principaux récepteurs) et sécrètent de maintes substances, tels que l'ADP et la TxA_2 , ce qui favorise le recrutement de plaquettes additionnelles aux sites de lésion.³⁶⁶ De plus, ces interactions entraînent l'activation de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ qui, elle, participe aussi dans l'adhésion ferme des plaquettes à la matrice sous-endothéliale. Bref, l'activation cellulaire qui découle des interactions de premier contact est essentielle à l'adhésion ferme des plaquettes et les PKCs sont activement impliquées dans ce phénomène. *In vitro*, l'activation plaquettaire au collagène, au vWF, à l'ADP et même à la thrombine est dépendante des PKCs (voir section 1.5 sur la signalisation intracellulaire). Ces récepteurs sont couplés soit aux protéines G ou aux tyrosine kinases et déclenchent l'activation des PLC et des PKCs. *In vivo*, ou à l'aide de chambres de perfusion, l'implication des PKCs dans l'adhésion plaquettaire a aussi été démontrée. L'attachement et l'adhésion ferme des plaquettes aux surfaces de collagène sous conditions de débit sont dépendants de l'activation des PKCs.³⁶⁷ Malgré que l'activation des PKCs n'est pas essentielle à l'adhésion rapide des plaquettes, elles sont largement impliquées dans la stabilisation et l'adhésion ferme des plaquettes aux surfaces de

collagène. Ceci fut aussi démontré pour l'adhésion des plaquettes aux surfaces de vWF, où les PKCs seraient essentielles à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui, elle, serait impliquée dans la solidification et l'attachement ferme des plaquettes à ces surfaces.^{368.369}

Les PKCs sont donc activement impliquées dans l'adhésion et l'activation plaquettaire; cependant, le rôle exact des différentes isoformes dans ces phénomènes demeure inconnu. Avec le développement de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques sélectifs aux différentes isoformes de PKC, la fonction individuelle de ces isoformes dans la physiologie plaquettaire commence à être explorée.

Sécrétion plaquettaire

Plusieurs données expérimentales pointent vers l'importance des PKCs dans la sécrétion plaquettaire. Par exemple, l'activation des PKCs entraîne la phosphorylation de plusieurs molécules impliquées dans la sécrétion des plaquettes, telles que Sec1 et la syntaxine 4.^{142.144} Dans la majorité des cellules sécrétrices, l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire est suffisante afin d'induire l'exocytose, tandis que dans les plaquettes, les PKCs paraissent occuper une place importante dans ce phénomène. En absence des PKCs, la concentration en Ca^{2+} requise pour déclencher la sécrétion est largement supérieure, ce qui suggère la présence d'un mécanisme de coopération entre le Ca^{2+} et les PKCs.³⁷⁰ Effectivement, des agents qui miment la stimulation des PKCs par le DAG, peuvent induire l'exocytose et potentialiser les effets de la sécrétion déclenchée par le Ca^{2+} ionophore.³⁷¹⁻³⁷³ Par ailleurs, l'inhibition des PKC atténue significativement la sécrétion des granules par les plaquettes.^{142.374}

L'implication des PKCs dans la sécrétion plaquettaire est largement plus documentée pour les granules denses que pour les granules alpha et les lysosomes.

Effectivement, la sécrétion des constituants principaux contenus dans les granules denses, tels que la sérotonine (5-HT), l'ADP et l'ATP, est modulée par l'activation des PKCs.^{370.375-377} L'emploi d'inhibiteurs spécifiques des PKCs, atténue considérablement la sécrétion de sérotonine et d'ATP par des plaquettes stimulées à la thrombine et au calcium ionophore A23187.^{378.379} De plus, les PKCs sont activement impliquées dans la sécrétion de sérotonine par l'ADP, le PMA, la vasopressine, et le PAF (platelet activating factor).³⁸⁰

Récemment, quelques études ont évalué l'implication d'isoformes individuelles des PKCs dans la régulation de la sécrétion de sérotonine par les plaquettes. La PKC δ est une des plus abondantes isoformes de PKC dans les plaquettes³⁶² et elle semble agir de façon dichotomique dans ce phénomène, selon la stimulation plaquettaire. Lorsque les plaquettes sont stimulées à l'aide d'agonistes spécifiques des récepteurs à la thrombine, PAR-1 et PAR-4, la PKC δ est positivement impliquée dans la sécrétion de sérotonine, car son inhibition limite considérablement celle-ci. À l'inverse, lorsque les plaquettes sont activées à la convulxine, un agoniste spécifique de GPVI, la PKC δ limite la sécrétion de sérotonine et, son inhibition, potentialise donc cette sécrétion.²³ La régulation de la sécrétion de sérotonine par la PKC δ dépend ainsi des mécanismes signalétiques par lesquels elle est activée. Selon Crosby²² et al la régulation négative de la sécrétion de sérotonine par PKC δ est dépendante de son interaction physique avec la tyrosine kinase Fyn.²² Suite à l'activation plaquettaire à l'alboaggrégine-A, un puissant agoniste de GPVI et GPIb/IX/V, la PKC δ s'active et interagit avec Fyn, ce qui module négativement la sécrétion de sérotonine, en plus de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ et l'agrégation plaquettaire (figure 20).²²

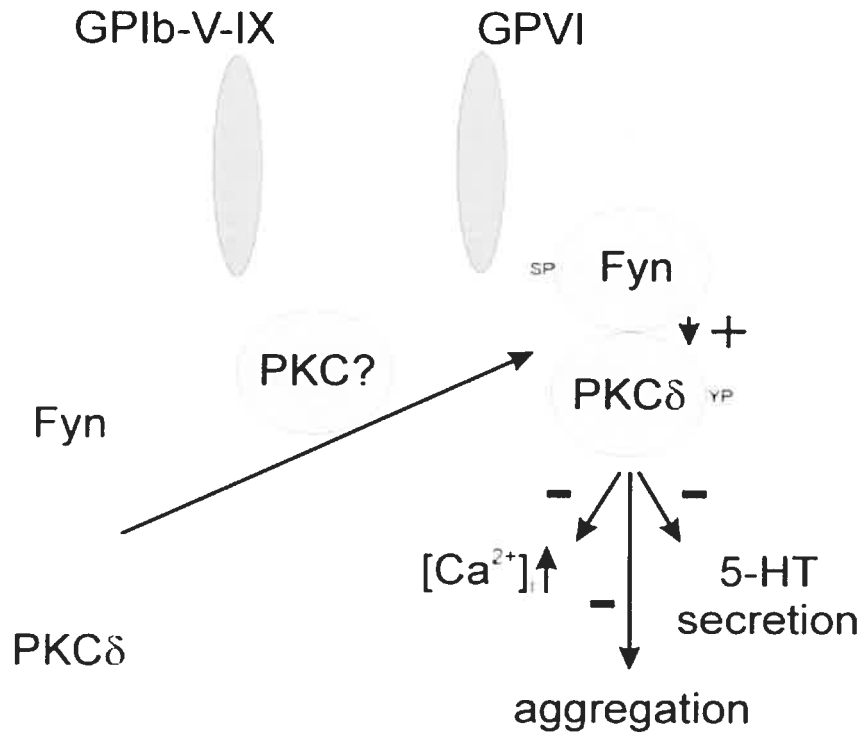


Figure 20 : Schématisation du rôle de la PKC δ dans l'activation plaquettaire à l'alloaggrégine. Suite à l'activation des récepteurs GPVI et GPIb/IX/V la PKC δ interagit avec la tyrosine kinase Fyn pour négativement réguler la sécrétion de sérotonine, la concentration en Ca²⁺ intracellulaire et l'agrégation. Crosby D and Poole W. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. 278: 24533-24541.

La PKC θ est une autre isoforme qui fut spécifiquement étudiée dans la sécrétion de sérotonine par les plaquettes. Suite à la stimulation plaquettaire à l'alloaggrégine (agoniste des récepteurs GPVI et GPIb/IX/V), cette isoforme de PKC interagit avec la protéine Btk (Bruton's tyrosine kinase), afin de réguler négativement la sécrétion de sérotonine. Les investigateurs de cette étude démontrent que l'inhibition de cette interaction protéique potentialise significativement la sécrétion de sérotonine induite par l'alloaggrégine, mais que l'inhibition des PKCs en général, empêche totalement ce phénomène.²¹

Bref, la sécrétion de sérotonine et des granules denses par les plaquettes semble dépendre des PKCs; l'inhibition de toutes les isoformes des PKCs limite

considérablement cette sécrétion, tandis que certaines isoformes spécifiques, telles que la PKC δ et la PKC θ , semblent réguler négativement ce phénomène. Ces exemples démontrent, une fois de plus, la complexité fonctionnelle des PKCs, où chaque isoforme de PKC possède un rôle bien particulier dans une cellule et qu'une même isoforme peut médier des effets inverses à l'intérieur d'une même cellule, selon la stimulation cellulaire et les mécanismes de régulation qui en découlent.

Le rôle des PKCs dans la sécrétion des granules alpha est mal défini. Toutefois, il semble que la sécrétion de la P-sélectine, composante intégrale des granules alpha, soit dépendante des PKCs, en particulier des isoformes ϵ , η et ζ , et non des isoformes conventionnelles α et β .²⁴

Agrégation plaquettaire

Les PKCs étant impliquées dans l'activation et la sécrétion plaquettaire, il n'est pas surprenant d'apprendre qu'ils occupent également une place importante dans le processus de l'agrégation plaquettaire. Plusieurs études ont démontré leur implication dans ce phénomène en réponse à une variété d'agonistes plaquettaires. Par exemple, l'agrégation plaquettaire induite par la trombine, le collagène et le calcium ionophore A23187 est significativement atténuée en présence d'inhibiteurs sélectifs des PKCs.^{378,380,381} De plus, l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, composante clé du processus de l'agrégation plaquettaire, est bloquée en présence de ces inhibiteurs, ce qui explique l'importance des PKCs dans les mécanismes cellulaires menant au phénomène de l'agrégation plaquettaire.³⁸²

L'étude du rôle des isoformes individuelles dans le processus de l'agrégation plaquettaire est cependant mal documentée. Toutefois, il a été démontré que la PKC α est essentielle à l'agrégation plaquettaire au Ca²⁺.²⁰ De plus, tel que mentionné auparavant, la PKC δ peut réguler négativement l'agrégation plaquettaire à l'alboaggégine, par son association avec la tyrosine kinase Fyn.²²

Problématique et hypothèse

Les PKCs constituent une famille polygénique de protéines kinases largement impliquées dans la physiologie plaquettaire. Les principaux récepteurs membranaires, tels que la GPVI, la GPIb/IX/V et les PARs, déclenchent l'activation de mécanismes signalétiques dépendants des PKCs. Cependant, la contribution des diverses isoformes de PKCs dans la fonction plaquettaire demeure encore mal définie et le défi principal se rapportant à ce domaine d'étude vise justement à élucider les différents mécanismes de régulation qui découlent de chacune de ces isoformes.

Nous avons récemment démontré que l'expression de la P-sélectine, à la thrombine, dépend des isoformes ϵ , η et ζ , et non des isoformes conventionnelles α et β . En se basant sur cette étude et sur les autres études effectuées à ce sujet, il semble que chacune des différentes isoformes de PKCs occupent une fonction particulière dans la physiologie plaquettaire et il s'avère donc primordial de bien décortiquer le rôle de ces isoformes dans les divers mécanismes signalétiques générés dans les plaquettes.

Ainsi, les objectifs principaux de cette étude visent principalement à caractériser l'implication des différentes isoformes de PKCs dans l'activation et l'agrégation plaquettaire, en étudiant spécifiquement les mécanismes de signalisation déclenchés par le collagène (GPVI) et la thrombine (les PARs).

Contribution originale

**Novel PKC δ is required for collagen- but not thrombin-
induced platelet activation and aggregation:
Essential regulation by integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$**

Daniel Yacoub, Jean-François Théorêt, Louis Villeneuve, Danielle Libersan, Haissam
Abou-Saleh, Bruce Allen and Yahye Merhi

Short Title: Yacoub- PKC δ in platelet function

Key words: PKC, platelet, aggregation, P-selectin, $\alpha_{IIb}\beta_3$

Character Count: 43,004

Cet article sera soumis à *Journal of Cell Biology*

From the Research Center, Montreal Heart Institute and University of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to Yahye Merhi, PhD, Laboratory of Experimental Pathology,
Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street East, Montreal, Quebec,
Canada H1T 1C8. Tel. (514) 376-3330 ext. 3035; Fax (514) 376-1355;

██

ABSTRACT

In platelets many PKC isoforms are expressed but their relative contribution to platelet function is still unknown. Using isolated human platelets, we report that the novel PKC δ isoform is an essential mediator involved in collagen-induced platelet aggregation and cell activation of integrin α IIB β 3, while thrombin utilizes multiple PKC isoforms to achieve these functions. Interestingly, PKC δ plays differential roles in thrombin-mediated signaling, where it appears to be involved in PAR1- but not PAR4-induced platelet aggregation. Analysis of enzymatic activity, as measured by protein phosphorylation and translocation to the cell membrane upon activation by both thrombin and collagen, indicate that PKC δ is positively regulated by integrin α IIB β 3. In addition, PKC δ triggers activation of the MEK/ERK signaling pathway essential for collagen-induced platelet activation and aggregation. This study adds new insights into the role of PKC δ in platelet signaling and function, and reveals its importance in collagen- and PAR-1, but not PAR-4-induced platelet activation and aggregation. In addition, this study reveals the existence of a new regulatory mechanism in platelets where integrin α IIB β 3 signaling is required to sustain the activity of PKC δ .

INTRODUCTION

Platelets are enucleated blood cells that play a crucial role in the maintenance of normal hemostasis but are also actively involved in many pathological complications, such as thrombosis, restenosis and inflammatory reactions. Platelet reactions are mediated by specific cell adhesion molecules that induce adhesion to other platelets, leukocytes, endothelial cells, and the extracellular matrix ¹⁻⁵.

Platelet adhesion represents the first step in thrombogenesis. The initial binding of platelets to damaged blood vessels, which does not necessitate activation, is predominantly mediated by the interactions of platelet GPIb-IX-V (leucin-rich) with von Willebrand Factor (vWF) ⁶ at high shear, and GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$ integrin) with collagen at low shear ⁷. This, in turn, induces platelet signaling and activation which lead to aggregation through GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin) binding to fibrinogen ⁸.

Platelet signaling may be induced by the adhesion process itself and by several agonists to provoke granule secretion and activation ⁹⁻¹¹. One of the most physiologic and potent agonists, thrombin, activates platelets through proteinase-activated receptors (PARs) ¹². Activation of PAR1 and PAR4 in human platelets induces inside-out signaling ³⁸³ through the activation of phospholipase C (PLC β and γ). On the other hand, collagen promotes the adhesion and activation of platelets through its binding to platelet integrin $\alpha_2\beta_1$ and GPVI, respectively (Morton LF 1989, Santoro SA 1991). The binding of collagen to GPVI stimulates a non-receptor protein tyrosine kinase (PTK) that phosphorylates PLC γ . Activation of PLC stimulates phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), thereby generating the second messengers 1,2-diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). IP₃, in turn, mediates the release of intracellular Ca²⁺, while DAG

activates protein kinase C (PKC) ²⁴. Activation of these two pathways results in the phosphorylation of specific substrates at serine/threonine residues of the myosin light chain by a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase and phosphorylation of pleckstrin by PKC.

Protein kinase C (PKC) is a ubiquitous family of serine/threonine kinases which has long been recognized to play key roles in regulating numerous aspects of cellular functions. It comprises 12 related isoforms, classified into 3 structurally and functionally distinguished subgroups ¹⁵⁻¹⁸. The conventional PKC isoforms (PKC α , PKC β I, PKC β II, and PKC γ) are regulated by both DAG and Ca²⁺, the novel isoforms (PKC δ , PKC ϵ , PKC θ and PKC η) are insensitive to Ca²⁺, and the atypical isoforms (PKC ζ and PKC ι/λ) are Ca²⁺ and DAG insensitive ¹⁹. Even though PKC's share a high degree of homology, it is believed that particular PKC isoforms have unique and specific cellular functions among different cell types ^{253, 370, 375, 380}. In platelets, various PKC isoforms are expressed ^{23, 361, 362, 365} and it is presumed that each individual isoform plays distinctive roles. Indeed, several studies have underlined a role for PKC's in platelet function such as aggregation and secretion of granular contents. Recently, it has been demonstrated that PKC α is involved in calcium-induced platelet aggregation and that it physically interacts with tyrosine kinases Syk and Src ^{20, 384}. Moreover, it appears that PKC θ and PKC δ can interact with tyrosine kinases Btk and Fyn, respectively, to regulate the kinase activity of each other ^{21, 22}. PKC δ also seems to be involved in dense granule secretion following platelet activation ²³. We have previously shown that PKC blockade results in the inhibition of P-selectin expression and binding to neutrophils, as well as complete abrogation of GPIIb/IIIa activation and platelet aggregation ²⁴. However, it seems that

isoform-specific PKCs differentially regulate platelet activation and P-selectin expression. In fact, thrombin-induced P-selectin expression is PKC-sensitive, but PTK and PI3-K-insensitive. The novel PKC isoforms ϵ and η and atypical ζ , but not the conventional α and β and the novel δ isoform, may be involved in this process²⁴. In spite of the above studies, the role of individual PKC isoforms in platelet function still remains to be elucidated. For instance, it is well established that collagen-induced platelet activation and aggregation through GPVI is mediated by tyrosine kinase Syk and activation of PLC γ_2 ^{25,26}, but very few data exists on the implication of specific PKC isoforms and their downstream effectors in this process.

This study was therefore undertaken to examine the role of PKCs, in particular PKC δ , in platelet activation and aggregation. Using thrombin and collagen as two physiological and potent platelet activators, we were able to show that activation of PKC δ is essential for collagen-induced platelet aggregation and activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, while thrombin utilizes multiple PKC isoforms to induce aggregation and cell activation. Here, we also demonstrate that, once activated, integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ positively modulates the activity of PKC δ , which seems to be a common regulatory mechanism for both thrombin and collagen.

RESULTS

Role of Src, Syk and PLC in platelet aggregation and activation

Collagen activates platelets by transducing signals through GPVI, via a tyrosine kinase-dependent cascade that culminates in tyrosine phosphorylation of PLC. Activation of PLC leads, in turn, to the generation of second messenger's IP₃ and DAG, which mobilizes intracellular Ca²⁺ and activates certain PKC isoforms, respectively. It was therefore important for us to first confirm the implication of Src, Syk and PLC in collagen- and thrombin-induced platelet aggregation and activation. As depicted in figure 1A, collagen-induced platelet aggregation was inhibited, in a dose-dependant manner, in the presence of PP1, Piceatannol, and U713122, which selectively inhibit Src, SyK and PLC, respectively. In contrast thrombin-induced platelet aggregation was not affected by the Src/Syk inhibitors, whereas the PLC inhibitor (U73122) induced 50% inhibition (Figure 1B). The effect of PLC inhibition on collagen-induced platelet activation was associated with 90% inhibition of the integrin α IIb β 3 activation and P-selectin translocation to the platelet surface (figure 1C). On the other hand, thrombin-induced platelet activation of integrin α IIb β 3 and P-selectin were less affected by PLC inhibition, but still significantly reduced by almost 50%. These results indicate that platelet activation and aggregation by collagen is Src/Syk/PLC-dependant, whereas these platelet responses to thrombin are partly mediated by PLC.

Implication of PKCs in platelet activation and aggregation

Since PLC seems to be actively involved in platelet function and that PKCs are downstream effectors, we sought to evaluate the specific role of individual PKC isoforms

in platelet function. As illustrated in figure 2A, aggregation of platelets induced by collagen and thrombin was completely inhibited by the wide spectrum PKC inhibitor, chelerytrin. However, platelet aggregation was minimally affected by the PKC α and PKC β inhibitors, HBDDE and Hispidin respectively, or by Gö6976, an inhibitor of both the conventional PKC α and β isoforms. Interestingly, collagen-induced platelet aggregation was completely blocked in the presence of the selective PKC δ inhibitor (rottlerin), while aggregation of platelets by thrombin, in the presence of rottlerin was unaffected. In addition, activation of α IIb β 3 in response to collagen, but not to thrombin, was completely prevented by PKC δ inhibition (figure 2B). These results clearly indicate that activation of the novel PKC δ isoform is essential for collagen-induced platelet aggregation, whereas aggregation by thrombin seems to be mediated by multiple PKC isoforms.

Phosphorylation of PKC δ by collagen and thrombin

Activation of PKC depends not only on activators such as phospholipids and Ca²⁺ but also on phosphorylation of the protein. Having shown that PKC δ is essential for collagen-, but not thrombin-, induced platelet activation and aggregation, we evaluated next its phosphorylation. As expected, both collagen and thrombin were able to phosphorylate PKC δ in a time-dependent manner (figure 3A). However, PKC δ appears to be phosphorylated more rapidly by thrombin than by collagen, 30 seconds following stimulation by thrombin in comparison to 60 seconds by collagen. Interestingly, these times coincide exactly with the time required to initiate platelet aggregation (30 seconds for thrombin and 60 seconds for collagen, data not shown). As shown in figure 3B, pre-

treatment of platelets with Rottlerin or with U73122 completely prevented the phosphorylation of PKC δ by collagen, suggesting that PLC is responsible for the activation of PKC δ . Surprisingly, Rottlerin, which selectively inhibits PKC δ , did not prevent its phosphorylation by thrombin. In addition U73122 was able to inhibit phosphorylation of PKC δ by approximately 50% in response to thrombin. Again, these results are in accordance with the activation and aggregation responses of platelets to collagen and thrombin.

Regulation of PKC δ by integrin α IIb β 3

In order to explain the differences in the phosphorylation of PKC δ observed previously with collagen and thrombin, we assessed the role of the integrin α IIb β 3 in this process. Since the results obtained with the phosphorylation state of PKC δ correspond exactly with those obtained with the activation and aggregation of platelets, we presumed that integrin α IIb β 3 might regulate the activity of PKC δ . In order to support the role of the integrin α IIb β 3 in the regulation of PKC δ , we showed that Reopro or abciximab, a monoclonal antibody that specifically binds to α IIb β 3 and inhibits its function³⁸⁵, was also able to abolish the phosphorylation of PKC δ (Figure 3B) induced by both collagen and thrombin. These results indicate that α IIb β 3, once activated, can positively modulate the phosphorylation of PKC δ .

Translocation of PKC δ to cell membrane upon activation

One particular and important aspect of PKC activation is the intracellular redistribution of the enzyme from the cytosol to the cell membrane. This mechanism was studied using

confocal microscopy (Figure 4). In unstimulated platelets, PKC δ is distributed across the cytosol of the cell and redistributed to the membrane upon activation by collagen and thrombin. In platelets pretreated with Rottlerin, U73122 or Reopro, PKC δ was incapable of translocating to the platelet membrane upon activation by collagen. In contrast, thrombin-induced translocation of PKC δ was not affected by Rottlerin and minimally by U73122, whereas Reopro prevented translocation of PKC δ to the membrane. Thus, phosphorylation and translocation of PKC δ to platelet membrane are intimately linked, both events being required for enzymatic activation.

Differential role of PKC δ in PAR1- and PAR4-induced platelet activation and aggregation

Since activation of PKC δ does not appear to be a prerequisite in thrombin-induced platelet aggregation, we sought to evaluate the individual roles of the thrombin receptors PAR1 and PAR4 in this process. It is well recognized that PAR1 is the high thrombin receptor and responds to low thrombin concentration, while PAR4 is only sensitive to higher concentrations of thrombin^{204,205,386}. As illustrated in figure 5A, platelet aggregation induced by thrombin (0.1 U/mL) and by a PAR 4 agonist was insensitive to the PKC δ inhibitor, Rottlerin. On the other hand, the aggregation response to lower thrombin concentration (0.025 U/mL) and to a PAR1 agonist were equally significantly inhibited by Rottlerin, suggesting that thrombin concentrations of 0.025U/mL solely activate PAR1, while concentrations of 0.1U/mL are mediated principally through activation of PAR4. In order to explore this possibility, we examined the effect of SCH79797, a selective PAR1 antagonist, on thrombin-induced platelet aggregation

(figure 5A) and activation of P-selectin (figure 5B). Blockade of PAR1 abolished platelet aggregation induced by 0.025 U/mL of thrombin, and by PAR1 stimulation, while the aggregation in response to 0.1 U/mL of thrombin or to PAR4 stimulation was unaffected by PAR-1 blockade. In addition, the same results were obtained when examining the translocation of P-selectin to the cell surface following platelet activation with the different stimulators, with and without PAR-1 blockade (Figure 5B). Together, these results indicate that PKC δ is differentially involved in thrombin-induced platelet aggregation; it may be involved in PAR1 but not in PAR-4 stimulation.

Activation of the MEK/ERK pathway by PKC δ

In platelets, physiological agonists, such as thrombin and collagen can activate mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways, and it is presumed that the PKC family may be involved in this process. Thus, the MEK/ERK pathway may be an important downstream effector of PKC δ involved in platelet activation and aggregation. As illustrated in figure 6, platelets pretreated with the MAPK kinase inhibitor, PD98059, were unable to aggregate following activation by collagen (Figures 6A and 6C). On the other hand, thrombin-induced aggregation was unaffected by PD98059 (Figures 6B and 6C). Moreover, activation of α IIb β 3 (figure 6D) and translocation of P-selectin (figure 6E) by collagen, but not by thrombin, were significantly inhibited by PD98059. Since the MAPK signaling pathway appears to be involved in collagen-induced platelet aggregation and activation, we next evaluated the phosphorylation of MEK1/2 and ERK1/2 upon activation by collagen. As illustrated in figure 7A, MEK1/2 and ERK1/2 were time dependently phosphorylated by collagen. As expected, PD98059 was able to

prevent the phosphorylation of both MEK1/2 and ERK1/2 by collagen. In addition, Rottlerin and U73122 also inhibited the phosphorylation of these two kinases, which indicate that PKC δ and PLC are involved in this signaling cascade. By contrast, Reopro slightly affected the phosphorylation state of MEK1/2 and ERK1/2 (figure 7B).

DISCUSSION

Since its discovery in 1977, the PKC family has been the attention of numerous studies and it is well established today that it plays key roles in regulating signaling events in many cell types. In platelets, PKC appears to be an important signaling mediator required for activation, secretion of granular contents and aggregation. Many PKC isoforms are expressed in platelets but their relative contribution to platelet function are largely uncharacterized. Therefore, this study was designed to examine the role of individual PKC isoforms in platelet activation and aggregation induced by physiological agonists such as collagen and thrombin. The major findings of this study are fourfold: 1) activation of PKC δ is essential for collagen-induced platelet activation of integrin α IIb β 3, and aggregation, 2) platelet activation and aggregation by thrombin is mediated by more than one PKC isoform, possibly the novel PKC δ isoform in PAR-1 signaling, whereas PAR-4 signaling requires participation of other PKCs, 3) the activity of PKC δ , as measured by its phosphorylation and translocation to the platelet membrane upon activation by both collagen and thrombin, is positively regulated by integrin α IIb β 3, and 4) collagen-, but not thrombin-, induced stimulation of PKC δ triggers activation of the MEK/ERK signaling pathway, which is necessary for platelet activation and aggregation.

It is well established that collagen supports the adhesion of platelets to the site of vascular injury via integrin α 2 β 1 and triggers platelet activation via GPVI^{128,129}. The binding of collagen to GPVI results in receptor clustering and thereby stimulates the tyrosine phosphorylation of specific tyrosine residues within an associated transmembrane protein, the Fc receptor γ -chain. This leads to the phosphorylation of the tyrosine Syk leading to the activation of several signaling pathways including PLC.

Activation of PLC leads to the hydrolysis of PIP₂ and generation of DAG, which activates certain PKC isoforms. Here, we were able to show that collagen-, but not thrombin-, induced platelet aggregation is Src- and Syk-dependant, as demonstrated by the efficiency of the specific inhibitors PP1 and piceatannol, respectively. Although PLC inhibition using U73122 completely prevented platelet aggregation, αIIbβ3 activation and P-selectin translocation after collagen stimulation, it reduced by only 50% these platelet responses to thrombin. These results suggest the existence of PLC-dependent and independent mechanisms in thrombin induced platelet activation and aggregation. In platelets, many PLC isoforms have been identified and all evidence suggests that thrombin activates a G-protein-coupled PLCβ pathway, while signaling through collagen is mediated by receptor-bound tyrosine kinases and activation of PLCγ^{207,210}.

Having confirmed the involvement of PLC in collagen- and thrombin-induced platelet aggregation and activation, we evaluated next which PKC isoforms are involved in platelet function. The implication of PKC in collagen- and thrombin-induced platelet aggregation was first confirmed using Chelerytrin, a wide spectrum PKC inhibitor. In contrast, inhibition of the conventional PKCα and PKCβ, using HBDDE, Hispidin and Gö6976, showed no effect, while inhibition of PKCδ alone, using Rottlerin, was sufficient to completely abolish collagen-, but not thrombin-, induced platelet activation and aggregation. These results indicate that the platelet response to collagen is largely mediated via PKCδ, while the response to thrombin may involve other PKC isoforms. In contrast to our results, it has been recently shown that PKCδ can interact with tyrosine kinases Fyn to negatively modulate platelet serotonin release, intracellular calcium response and aggregation²². However, in that report, platelets were activated by the

snake venom alboaggregin-A, which is capable of activating both GPIb-V-IX and GPVI on platelets. In our study, a physiological agonist such as collagen was employed to achieve platelet activation, and thus, only signaling events mediated through GPVI were studied. Therefore, it seems that PKC δ may play dichotomous roles in platelet aggregation, possibly involving differential regulatory mechanisms related to the signaling pathways triggered by different specific receptors.

Platelet aggregation is a process that is accomplished by the adhesive interaction of two active α IIB β 3 receptors on adjacent platelets, via a fibrinogen bridge. Having established that PKC δ is required to achieve this process, we evaluated next its involvement in the activation of integrin α IIB β 3, and in the translocation of P-selectin to the platelet surface upon activation. As expected, collagen-induced activation of integrin α IIB β 3 was totally dependant upon PKC δ , explaining the incapacity of platelets to aggregate in the presence of Rottlerin. PKC δ also seems to be involved, but to a lesser extent, in integrin α IIB β 3 activation by thrombin. On the other hand, P-selectin translocation to the platelet surface, as a marker of alpha granule secretion, was not affected by PKC δ inhibition. These results add new insights into the mechanisms of platelet P-selectin translocation as reported in our previous findings that the novel ϵ and η and atypical ζ , but not the conventional α and β and the novel δ PKCs, may be involved in this process²⁴. Here, we were able to show that P-selectin translocation by collagen was affected by Rottlerin, but only at higher dose (100 μ M) where it interferes with the PKC isoforms η , ζ , and ϵ (data not shown). Signaling events involved in the translocation of P-selectin to the surface of activated platelets are still not fully characterized. For instance, the involvement of PKC may be related to its capacity to phosphorylate a

number of platelet substrates implicated in the secretion of granule contents, such as platelet Sec 1 protein and syntaxin 4^{142,144,145}.

Phosphorylation of PKC is an essential regulatory mechanism required for complete kinase activity. Hence, having showed the importance of PKC δ in platelet function, it was essential for us to study the phosphorylation state of PKC δ upon activation by collagen and thrombin. Some investigators have reported PKC δ to be phosphorylated upon stimulation by platelet activators such as thrombin, convulxin and alboaggregin-A^{22,23,387}, but activation of PKC δ by collagen is yet to be demonstrated. As expected, both collagen and thrombin were able to time-dependently phosphorylate PKC δ , as soon as 30 seconds for thrombin and 60 seconds for collagen. These times happen to coincide with the onset of aggregation induced by both these activators. In platelets pretreated with the PLC inhibitor (U73122), collagen-induced PKC δ phosphorylation was completely prevented, which indicates that its activation is dependant upon the activity of PLC. Surprisingly, U73122 did not fully inhibit phosphorylation of PKC δ by thrombin, but rather reduced its activity by approximately 50 %, which would suggest that it may be activated by a PLC (DAG/Ca²⁺)-independent pathway. Rottlerin, which selectively inhibits PKC δ , abolished its phosphorylation induced by collagen but not by thrombin. Murugappan et al. have recently demonstrated that Rottlerin inhibits the phosphorylation of PKC δ and concluded that it affects the phosphorylation of the activity domain of the kinase²³. However, in that report, convulxin-induced phosphorylation of PKC δ was profoundly more affected by Rottlerin than by SFLLRN or AYPGKF activation (PAR1 and PAR4 activating peptides, respectively). In our study, the inability of Rottlerin to prevent phosphorylation of PKC δ

by thrombin, suggests that Rottlerin does not directly inhibit the phosphorylation domain of the kinases or that it may be activated by an alternate mechanism, even in the presence of Rottlerin. Thus, the phosphorylation of PKC δ has shown again an astonishing correlation with the aggregation results obtained in the first part of the study. These observations lead us to believe that the α IIb β 3 integrin might actively participate in the regulation of PKC δ , possibly by positively regulating its activity. Experiments in which integrin α IIb β 3 is blocked by Reopro have shown no detectable phosphorylation of PKC δ upon stimulation by collagen or thrombin. Thus, it is likely that integrin α IIb β 3, once activated by PKC δ , positively regulates PKC δ by maintaining its phosphorylation. This would explain the inability of observing any given phosphorylation of PKC δ in the presence of α IIb β 3 inhibitors, such as Reopro. Hence, once PKC δ is activated, it quickly dephosphorylates, but the subsequent activation of α IIb β 3, via binding to fibrinogen, triggers outside-in signaling events to maintain PKC δ activated. Since Rottlerin does not prevent activation of α IIb β 3 by thrombin, we were able to observe PKC δ activity. Moussazadeh et al. have reported that thrombin-induced activation of PKC δ is achieved by a α IIb β 3 integrin independent pathway and that the blockade of α IIb β 3 does not affect the phosphorylation activity of PKC δ ³⁸⁷. However, the investigators in that report employed a very high thrombin concentration (5 U/mL) and it is possible that at these concentrations, PKC δ dephosphorylates much slower, thereby allowing the observation of a phosphorylation even in the absence of α IIb β 3. In this study, we conclude that PKC δ is activated independently of α IIb β 3 (the initial activation of PKC δ precedes the activation of α IIb β 3), but that it may be regulated by the latter. Outside-in signaling of α IIb β 3 contributes to the adhesive strengthening of the platelet plug and allows

irreversible aggregation²¹⁹. These results highlight the importance of PKC δ in the activation of α IIB β 3 and in platelet aggregation. They also indicate that inhibition of PKC δ alone is sufficient to abolish collagen- but not thrombin-induced platelet aggregation. This may be explained by the level of α IIB β 3 activation on platelets, necessary to sustain the aggregation process. Thus, the regulation of PKC δ by α IIB β 3 could be of physiological significance in that it may participate in the strengthening and solidification of the platelet aggregate.

Activation of PKC is associated with translocation of the enzyme from the cytosol to the cell membrane and can therefore be used as an index of enzymatic activation. In resting platelets, PKC δ appeared as uniformly distributed across the cytosol of the membrane and rapidly translocated to the cell surface upon activation by collagen and thrombin. Phosphorylation and cell translocation of PKC δ were intimately linked; both events perfectly correlate in terms of the activity of the enzyme under different conditions, thus supporting a role for α IIB β 3 in the regulation of PKC δ .

Since PKC δ did not appear to be a prerequisite for the induction of thrombin-induced platelet aggregation, we sought to evaluate its implication in PAR1 and PAR4 signaling. We were able to show that thrombin concentrations of 0.1U/mL preferentially activate PAR4 while concentrations of 0.025U/mL activate PAR1. Interestingly, platelet aggregation induced by PAR1 or by thrombin concentrations of 0.025U/mL appeared to be sensitive to the inhibition of PKC δ by Rottlerin and thus, provides an explanation as to why Rottlerin was incapable of affecting thrombin (0.1U/mL)-induced platelet aggregation. It therefore seems that PKC δ may play differential roles in thrombin signaling depending on the signaling events triggered by different receptors.

Having established that PKC δ is required for collagen-induced platelet aggregation and activation, we evaluated the role of the MAPK signaling pathway in this process. It has been reported that physiological agonist such as collagen and thrombin can activate ERK1/2 in platelets and it appears that the PKC family may be involved in the this process³⁸⁸⁻³⁹⁰. However, the exact role of the MAPK signaling cascade in platelet function is still uncharacterized. Here, we have shown that collagen-, but not thrombin-, induced platelet aggregation, activation of α IIB β 3, and translocation of P-selectin are sensitive to PD98059, a MAPK kinase inhibitor. These results are in accordance with a previous study indicating that MEK1 is not involved in thrombin nor U46619 platelet response, while being important in collagen-induced platelet aggregation³⁹¹. In addition, we have demonstrated that MEK1/2 and ERK1/2 are both activated by collagen and thrombin, and more importantly have established the requirement for PKC δ and PLC activation in this process. Moreover, inhibition of α IIB β 3 by Reopro slightly affected the phosphorylation activity of MEK1/2 and ERK1/2, indicating that PKC δ , even if not regulated by α IIB β 3, is able to activate and phosphorylate its substrates.

In conclusion, this study adds new insights into the role of PKC δ in platelet signaling and function, and reveals its importance in collagen- and PAR-1, but not PAR-4-induced platelet activation and aggregation. In addition, this study shows that integrin α IIB β 3 contributes to sustain the activity of PKC δ , which triggers activation of a MEK/ERK signaling pathway essential for collagen-induced platelet activation and aggregation.



ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC).



MATERIALS AND METHODS

Materials

Cell-permeable inhibitors U73122, Rottlerin, PD98059, HBDDE, Hispidin and Gö6976, were all purchased from Calbiochem (San Diego, CA). The selective PAR-1 antagonist, SCH79797 was obtained from Tocris Cookson (Elisville, MO). Phospho-specific antibodies for PKC δ , MEK1/2 and ERK1/2 came from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA), while anti-phospho PKC α and PKC β antibodies were purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) and Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA) respectively. PKC isoform-selective antibodies were obtained from Gibco BRL.

Preparation of platelets

Venous blood (50 to 100 mL) was drawn from healthy volunteers free from medication known to interfere with platelet function for at least 10 days before the experiment. Blood samples were anti-coagulated with acid citrate dextrose (1:5 vol:vol) and prepared as previously described^{385,392}. Briefly, platelet-rich-plasma (PRP) was prepared by centrifugation of whole blood at 500g for 15 minutes. Platelets were then obtained by centrifugation of PRP and resuspended in a Hank's balanced salt solution (HBSS)-HEPES containing 0.4 mM EDTA (pH 6.5) with 1 μ g/mL of prostacyclin (PGI₂). Any remaining red blood cells were removed by low-speed centrifugation and platelets were pelleted and resuspended in HBSS-HEPES buffer (pH 7.4) with Ca²⁺ (1.3 mM CaCl₂) and Mg²⁺ (0.81 mM MgSO₄) and adjusted to a final concentration of 250 x 10⁶/mL using an automated cell counter (Microdriff16, Beckman Coulter). Platelet purity exceeded

99% as determined by an electronic counter and by light microscopy examination.

Platelets were allowed to stand at 37°C for 30 minutes before further treatment.

Platelet Aggregation

Aggregation of washed platelets was monitored on a 4-channel optical aggregometer (Chrono-log Corp.). Platelets were prepared as described above at a concentration of 250×10^6 /mL and pre-incubated with different inhibitors or with a vehicle solution (0.1 % DMSO final concentration) as a control for 5 minutes at 37°C. Samples were then stimulated with the appropriate agonist (thrombin 0.1 U/mL or collagen 2 µg/mL) with continuous stirring (1000 rpm) at 37°C. Platelet aggregation was recorded for 5 minutes and the percentage of aggregation was calculated at that specific time, which corresponds to the end-point and stabilization time of aggregated platelets.

SDS-PAGE and immunoblotting

Platelets were stimulated for the appropriate time, with stirring at 37°C, in the presence or absence of inhibitors and the reaction was terminated by the addition of a 4X SDS-Laemmli sample buffer. Lysates were then boiled for 10 minutes and proteins were resolved by electrophoresis in 8-10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were subsequently transferred to nitrocellulose and membranes were blocked with 5 % BSA for 1 hour at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody, washed and labeled with HRP-conjugated secondary antibody for 1 hour at room temperature. Following additional washing steps, proteins were detected by enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer).

FACS analysis

Activation of platelet GPIIb/IIIa and P-selectin translocation were assessed by FACS, as described previously^{385,392}, using Mabs against P-selectin (clone AK4, Santa Cruz, CA) and the active form of GPIIb/IIIa (clone PAC-1, Becton Dickinson). Platelets were prepared at a concentration of 250×10^6 /mL and pre-incubated with antagonists or with vehicle solution (DMSO 0.1% final concentration) for 5 minutes at room temperature. P-selectin translocation was measured at baseline and 5 minutes following platelet activation. Samples were then fixed with 1% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) for 1 hour at 4°C, washed with 0.1% sodium azide in PBS, and labeled with saturating concentration of monoclonal antibody for 30 minutes at room temperature in the dark. GPIIb/IIIa activation was determined by incubating PAC-1 antibody in platelet suspension prior to activation, in order to allow PAC-1 binding to active GPIIb/IIIa, otherwise prevented by bound fibrinogen secreted by platelets. All samples were analyzed within 6 hours on an Altra flow cytometer (Beckman Coulter, Inc.) using single-color immunofluorescence staining with saturating concentration of fluorescence dye-conjugated antibodies. Non-specific labeling was excluded using appropriately labeled isotype-matched control IgG. Platelets were identified and gated by their characteristic forward- and side-scatter properties. Twenty thousand platelets were analyzed from each sample and results are presented as the mean fluorescence intensity (MFI) of the entire platelet population to which was subtracted the MFI of the isotype-matched control IgG.

Confocal immunofluorescence and imaging

Platelets were prepared as described above, pretreated with antagonist or with vehicle solution (DMSO 0.1% final concentration) and stimulated with thrombin or collagen for the appropriate time. Platelets were then fixed with 2% (v/v) paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS), washed twice with PBS and allowed to immobilize on poly-L-lysine coated coverslips overnight. Adhered platelets were subsequently blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) for 30 minutes at room temperature and incubated with wheat germ agglutinin (WGA)-Alexa488 in 1% BSA for 1 hour at room temperature. Coverslips were then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 2% normal donkey serum (NDS), incubated with polyclonal anti-PKC δ for 3 hours at room temperature, washed 3 times with PBS and labeled with anti-rabbit IgG-Alexa555 secondary antibody for 1 hour at room temperature. Samples were subsequently washed three times in PBS and mounted on 0.2 % 1,4-diazobicyclo-[2,2,2]octane (DABCO) diluted in glycerol (1:5). Z stacks were acquired with a LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and save as LSM files. Anti-rabbit (donkey) Alexa 555 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, United States) and WGA-Alexa 488nm were visualized using a 543nm Helium-Neon laser and an 488nm Argon laser respectively. A 100x/1.3 Plan-Neofluar objective (Zeiss) was used for magnification. Voxel size is 30nm X 30nm X 150nm (X,Y,Z). Z stacks were deconvolved with the Huygens Pro 2.6.5a software (Scientific Volume Imaging, Alexanderlaan, Netherlands) using the Maximum Likelihood Estimation (MLE) algorithm. Signal-to-noise ration was quantified for each Z stacks and added to the MLE algorithm. We used a point spread functions (PSFs) derived from z stacks of 15 fluorescent (540-560nm and 500-515nm) beads of 170nm in

diameter (Molecular Probes, Eugene, Oregon, United States). Deconvolution was applied until the obtention of 0.01% quality change threshold (QCT) between iterations. Deconvolved Z stacks were saved in Tiff files format series and transferred to the LSM 510 software. Six slices thick projections (0.9um total thickness) were produced using the 3-D tool from the LSM510 software and saved in Tiff files format

Data analysis

All experiments were performed at least 3 times on different individuals. Results are presented as mean \pm SEM. Comparisons of multiple treatments in the same individuals were analyzed by repeated measures ANOVA with Bonferroni t-test, while treatment groups composed of different individuals were analyzed by one way ANOVA. Values with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

ABBREVIATION LIST

PKC; Protein Kinases C

PLC; Phospholipase C

IP₃; inositol-D-1,4,5-triphosphate

DAG; diacylglycerol

PAR1; protease-activated receptor 1

PAR4; protease-activated receptor 4

MAPK; mitogen-activated protein kinase

FIGURE LEGENDS

Figure 1 **Collagen-, but not thrombin-, induced platelet aggregation requires Src, Syk and PLC.** Isolated human platelets ($250 \times 10^6/\text{ml}$) were preincubated with the different inhibitors for 5 min, followed by the addition of collagen (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or thrombin (0.1 U/mL) and the optical aggregation response was recorded during 5 min. A) Representative traces of the effects of increasing concentrations of PP1, Piceatannol, and U73122, which selectively inhibit SRC, SyK and PLC, respectively, on collagen induced platelet aggregation. B) The mean data of the aggregation responses induced by collagen and thrombin in the absence (vehicle solution) or presence of PP1 (50 μM), Piceatannol (50 μM), or U73122 (5 μM); $n=4$, * $p<0.05$ vs control. C) Graph representing the effect of U73122 (5 μM) on the activation of integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$, and on P-selectin translocation to the platelet surface, as assessed by FACS. Results are presented as the relative % of inhibition ($n=3$, * $p<0.05$ vs control).

Figure 2 **Collagen-, but not thrombin-, induced platelet aggregation and activation is PKC δ dependant.** Impact of PKC-selective isoform inhibitors on collagen- (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and thrombin- (0.1U/mL) induced platelet aggregation and activation. Isolated platelets were pretreated with the pan-specific PKC inhibitor, Chelerythrin (5 μM); specific inhibitors of PKC α , HBDDE (100 μM) and PKC β , Hispidin (10 μM); the conventional

PKC α and β inhibitor, Gö6976 (100nM); or the specific PKC δ inhibitor, rottlerin (10 μ M) prior to stimulation by collagen or thrombin. A) The mean data of the aggregation response (n=4-7, * p <0.05 vs control). B) Representative flow cytometry graphs and the mean data showing the activation state of platelet integrin α IIb β 3 and P-selectin upon stimulation by collagen and thrombin in the presence or absence (control) of the PKC δ inhibitor, rottlerin (10 μ M) (n=3, * p <0.05 vs control).

Figure 3 PKC δ phosphorylation by collagen and thrombin requires α IIb β 3.

Platelets were stimulated with collagen (2 μ g/mL) or thrombin (0.1U/mL) for the appropriate time and lysates were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and immunoblotted with anti-PKC δ antibody. Measurement of total protein lysates were analyzed with anti-Filamin A (ABP-280) antibody. A) Time-dependant activation of PKC δ by collagen and thrombin. Blots are representative of three independent experiments. B) Effect of Rottlerin (10 μ M), U73122 (5 μ M), and Reopro (a α IIb β 3 blocking Mab, 100 nM) on PKC δ phosphorylation. Blots were analyzed by densitometry and results are depicted as the relative percentage (%) of phosphorylation (n=4, * p <0.05 vs collagen or thrombin alone).

Figure 4 α IIb β 3 is essential for translocation of PKC δ to cell membrane.

Platelets were pretreated with the different inhibitors or with vehicle solution (control), stimulated for the appropriate time (collagen 2 μ g/mL; 2

minutes and thrombin 0.1 U/mL; 1 minute), fixed and adhered on poly-L-lysine. Samples were subsequently permeabilized, incubated with anti-PKC δ , stained with anti-rabbit IgG-Alexa555 secondary antibody and visualized by confocal microscopy immunofluorescence. Data shown are representative of three independent experiments. Bar = 0.5 μ m.

Figure 5 **PKC δ is involved in PAR-1-, but not in PAR-4-, induced platelet aggregation.** Role of PKC δ in PAR1- and PAR4- induced platelet aggregation and activation. A) Platelets were pretreated with the PKC δ inhibitor, rottlerin (10 μ M) or the PAR1 antagonist (SCH79797, 1 μ M) and aggregation was induced by the indicated agonists. Results are presented as the relative percentage of aggregation (n=4-7, * p <0.05 vs control). B) Platelets were pretreated with the selective PAR1 antagonist (SCH79797, 1 μ M) and stimulated as described above, followed by the assessment of P-selectin translocation to the cell surface by FACS analysis. Results are depicted as the relative percentage of the mean fluorescence intensity (MFI) of positive cells, (n=3, * p <0.05 vs control).

Figure 6 **Collagen-, but not thrombin-, induced platelet aggregation and activation requires the MEK1/2 and ERK1/2 signalling pathway.** Representative traces of the aggregation response induced by collagen (2 μ g/mL) (A), and thrombin (0.1U/mL) (B) obtained in the presence or absence (vehicle solution) of the MAPK kinase inhibitor, PD98059 (10-50

μM). Graphs are representative of mean data shown in C ($n=5$, $*p<0.05$ vs control). D) Effect of PD98059 on activation of integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ and E) P-selectin translocation to the platelet membrane in response to thrombin (0.1U/mL) and collagen ($2\mu\text{g/mL}$) ($n=3$, $*p<0.05$ vs 0).

Figure 7 Collagen-induced stimulation of PKC δ triggers activation of the MEK1/2 and ERK1/2 signalling pathway. A) Representative blots showing the time course of MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation in platelets activated by collagen. B) The effects of PD98059 (50 μM), Rottlerin (10 μM), U73122 (5 μM), and Reopro (100 nM) on collagen-induced phosphorylation of platelet MEK1/2 and ERK1/2. Blots were analyzed by densitometry and results are depicted as the relative percentage (%) of phosphorylation ($n=3$, $*p<0.05$ vs collagen alone).

Figure 8 Diagram summarizing the role of PKC δ in collagen- and thrombin-induced platelet signaling. Collagen-induced platelet activation is primarily mediated through stimulation of GPVI. GPVI initially triggers the activation of the tyrosine kinases Src and Srk which then phosphorylate PLC γ . The latter subsequently activates PKC δ and the MEK/ERK signaling pathway, which is ultimately responsible for the activation $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin. PAR-1 and PAR-4 are the predominant thrombin receptor on the platelet surface. PARs are heterodimeric G-

coupled receptors and their stimulation lead to the activation of Gαq and Gα12/13. While Gα12/13 is responsible for the rearrangement of the platelet cytoskeleton, Gαq is mainly involved in the activation of PLCβ and PKCs. In PAR-1 signaling, PKCδ, in addition to other PKC isoforms, appears to be involved in the activation of αIIbβ3 integrin. Collagen- and thrombin-induced αIIbβ3 outside-in signaling is necessary to maintain the activity of PKCδ, a mechanism possibly involved in the stabilization of the platelet aggregate.

Figure 1A

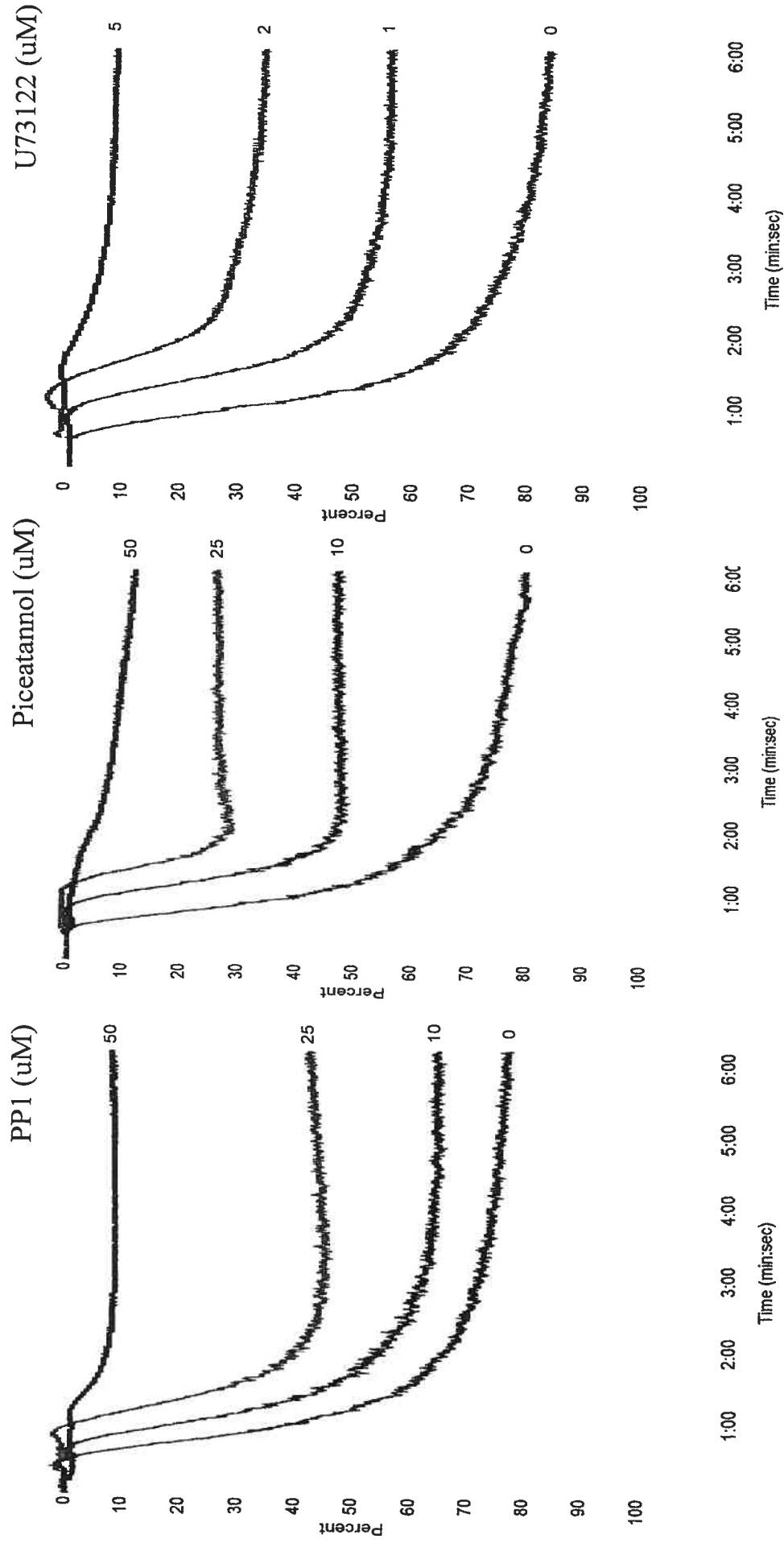


Figure 1B

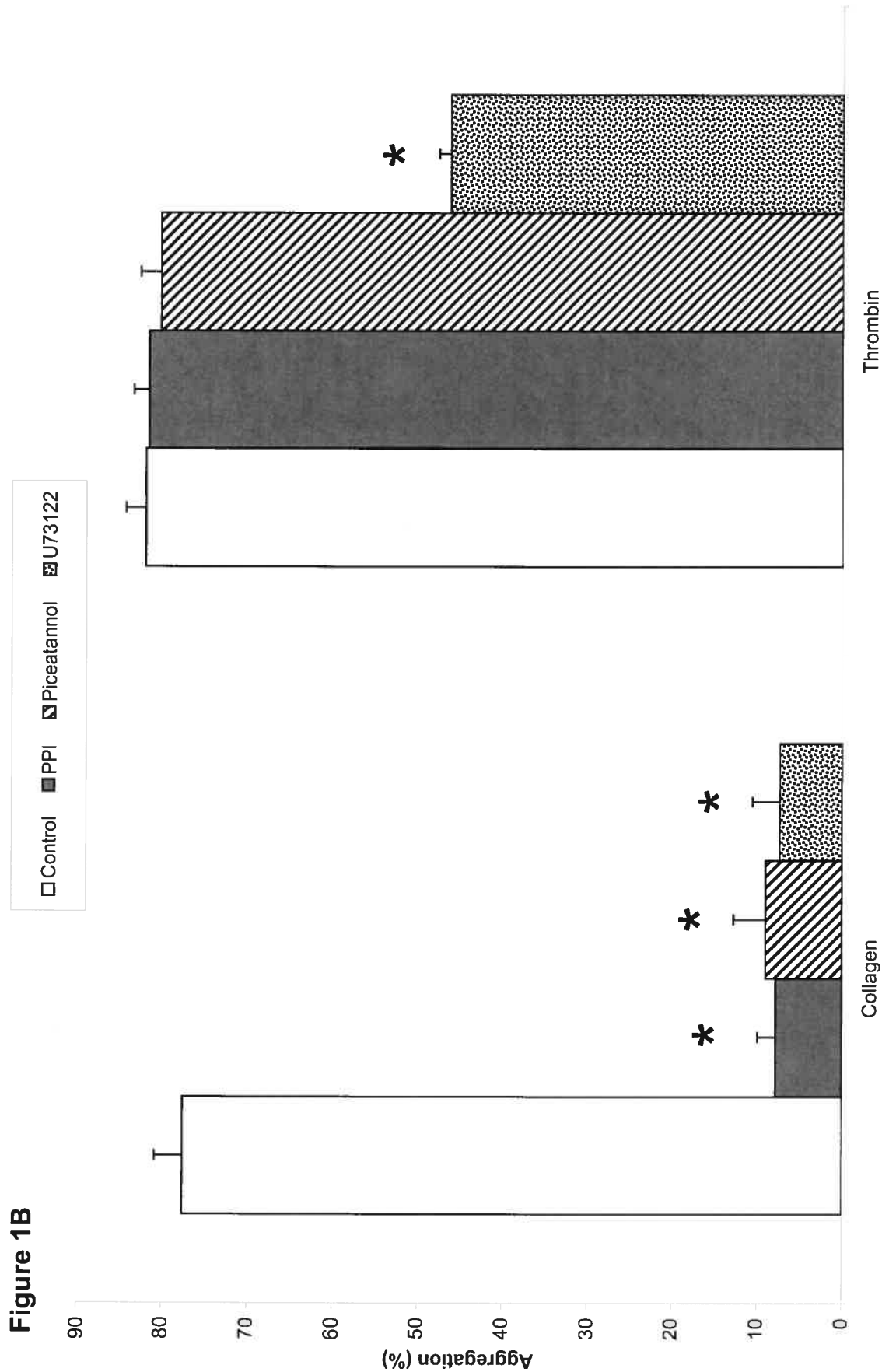


Figure 1 C

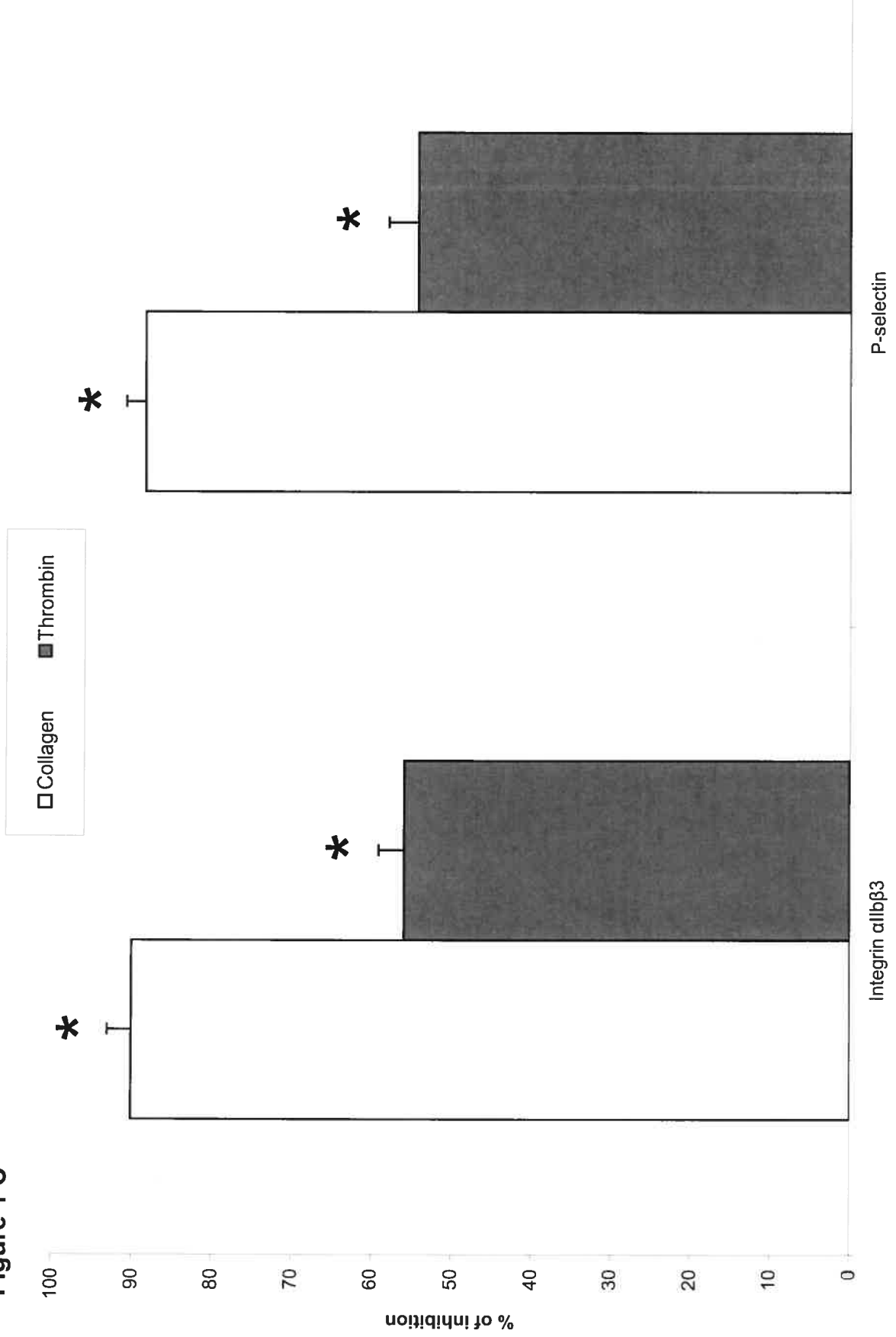


Figure 2A

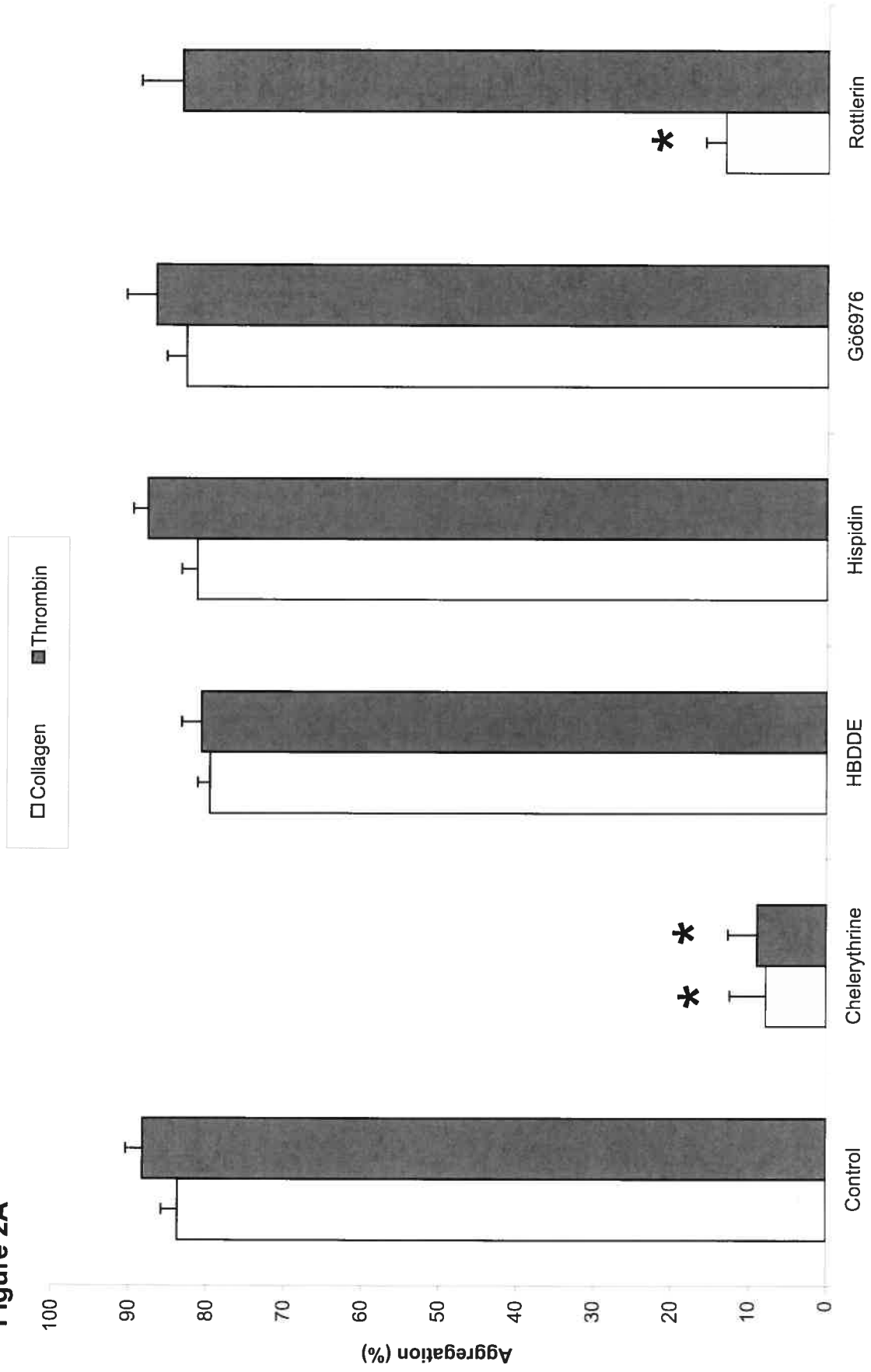


Figure 2B

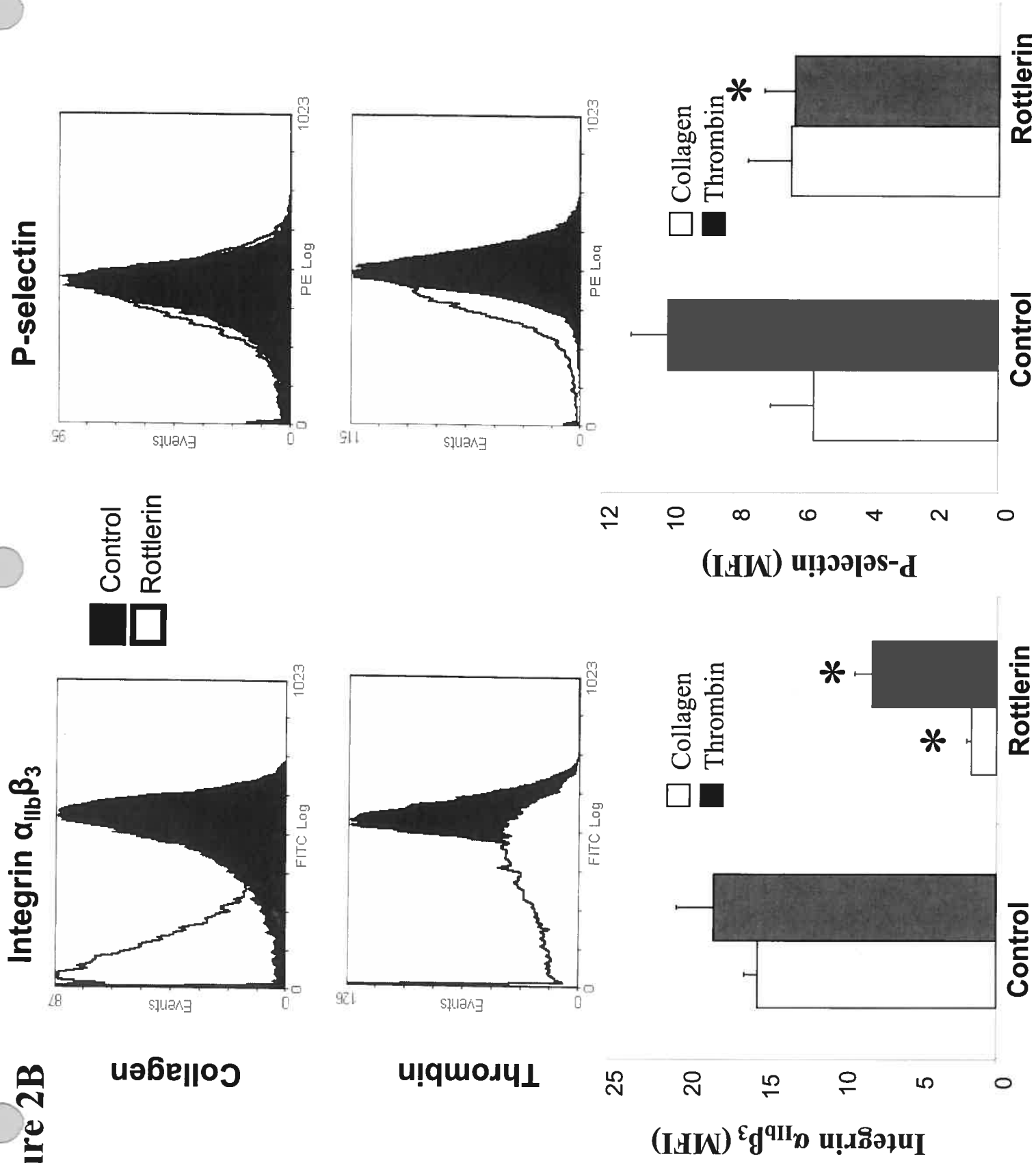


Fig 3A

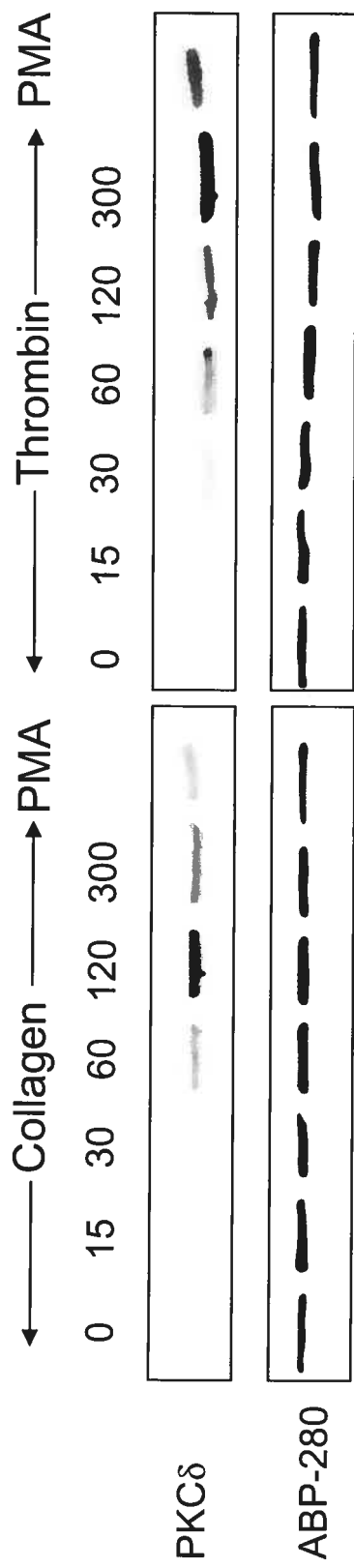
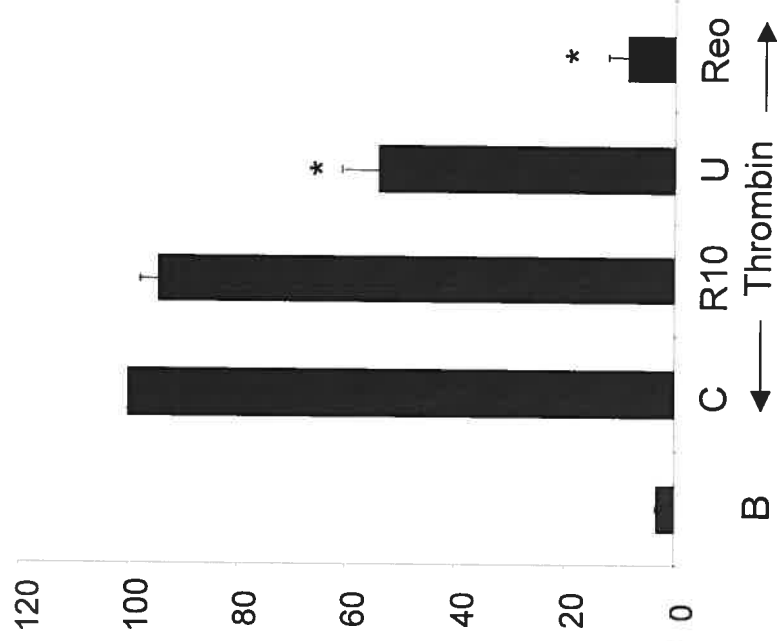
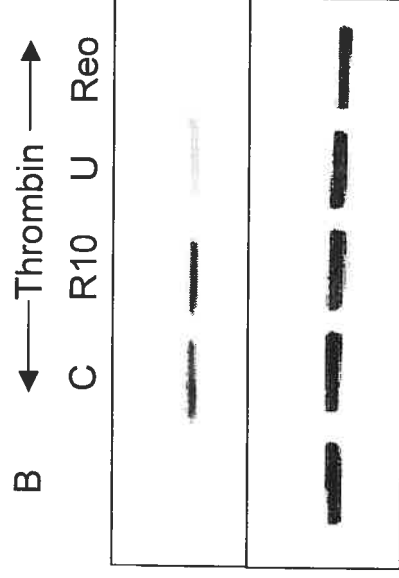
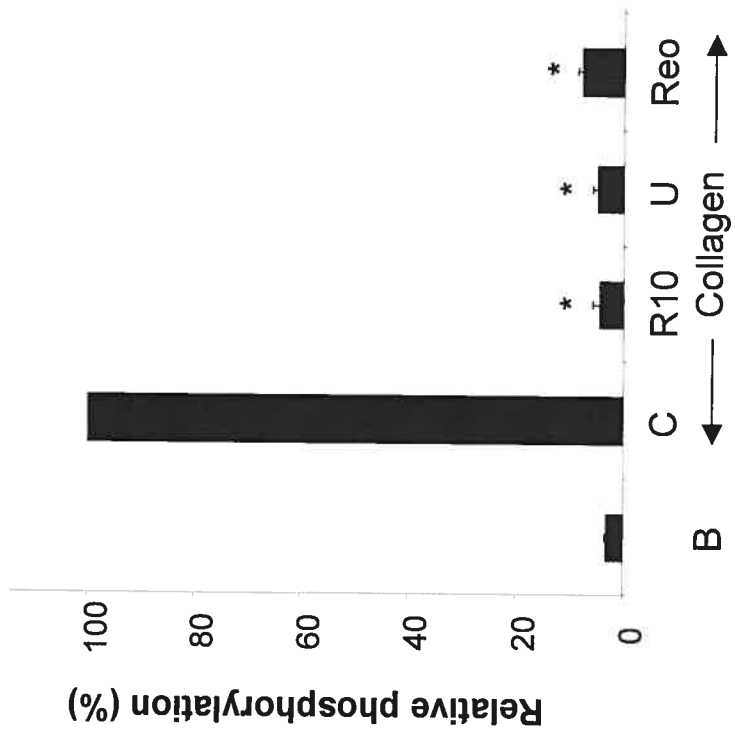
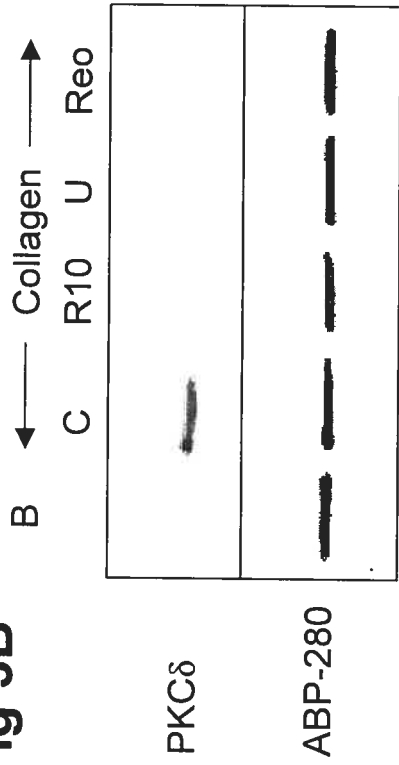
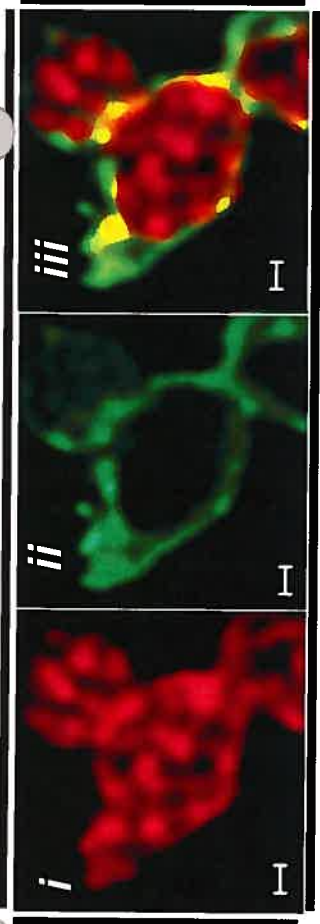


Fig 3B



Figure

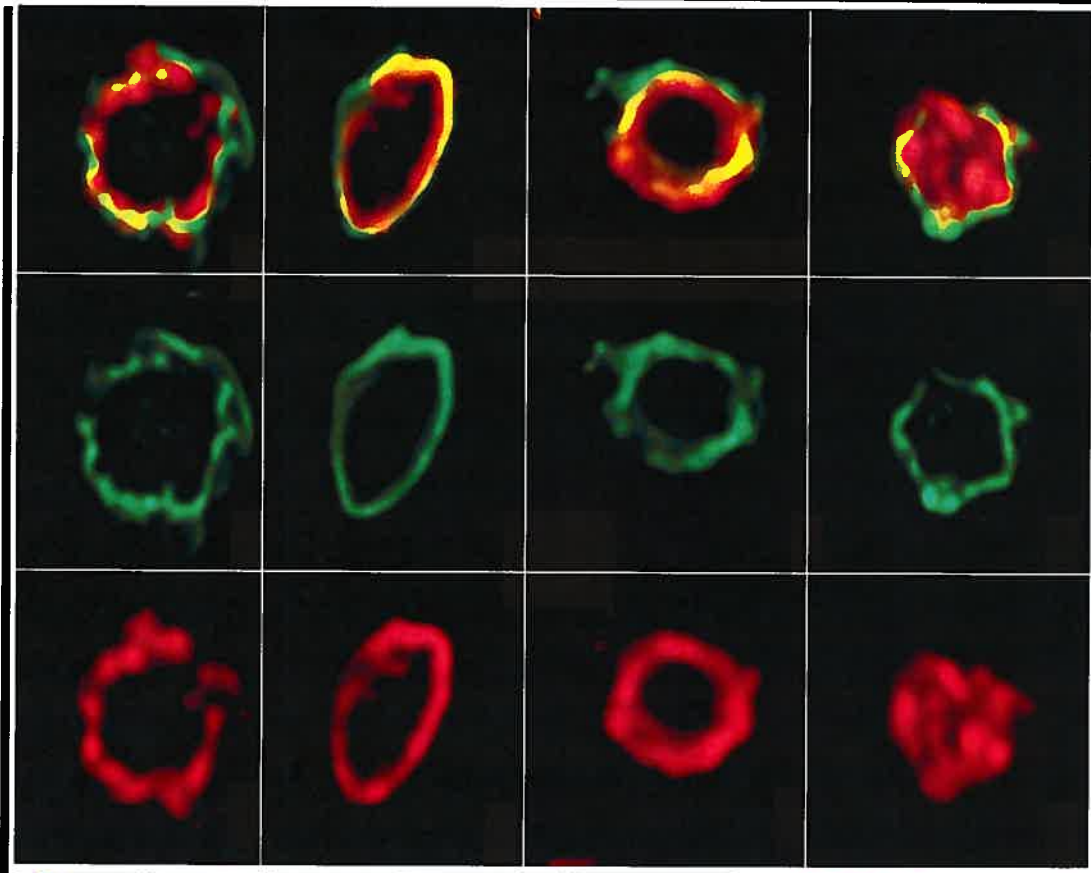
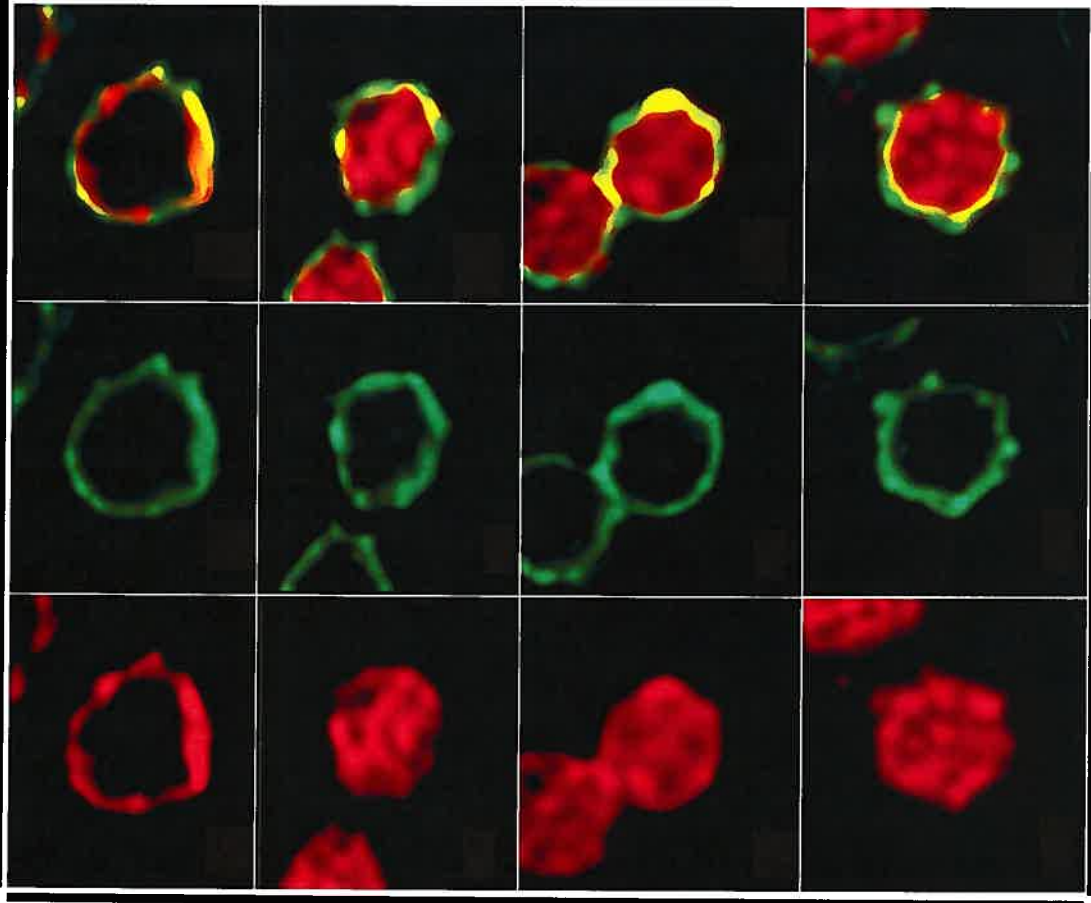
Baseline



- i* PKC δ -Alexa-555
- ii* WGA-Alexa-488
- iii* Merge

Collagen

Thrombin



Control

U73122

Rottlerin

Reopro

Figure 5A

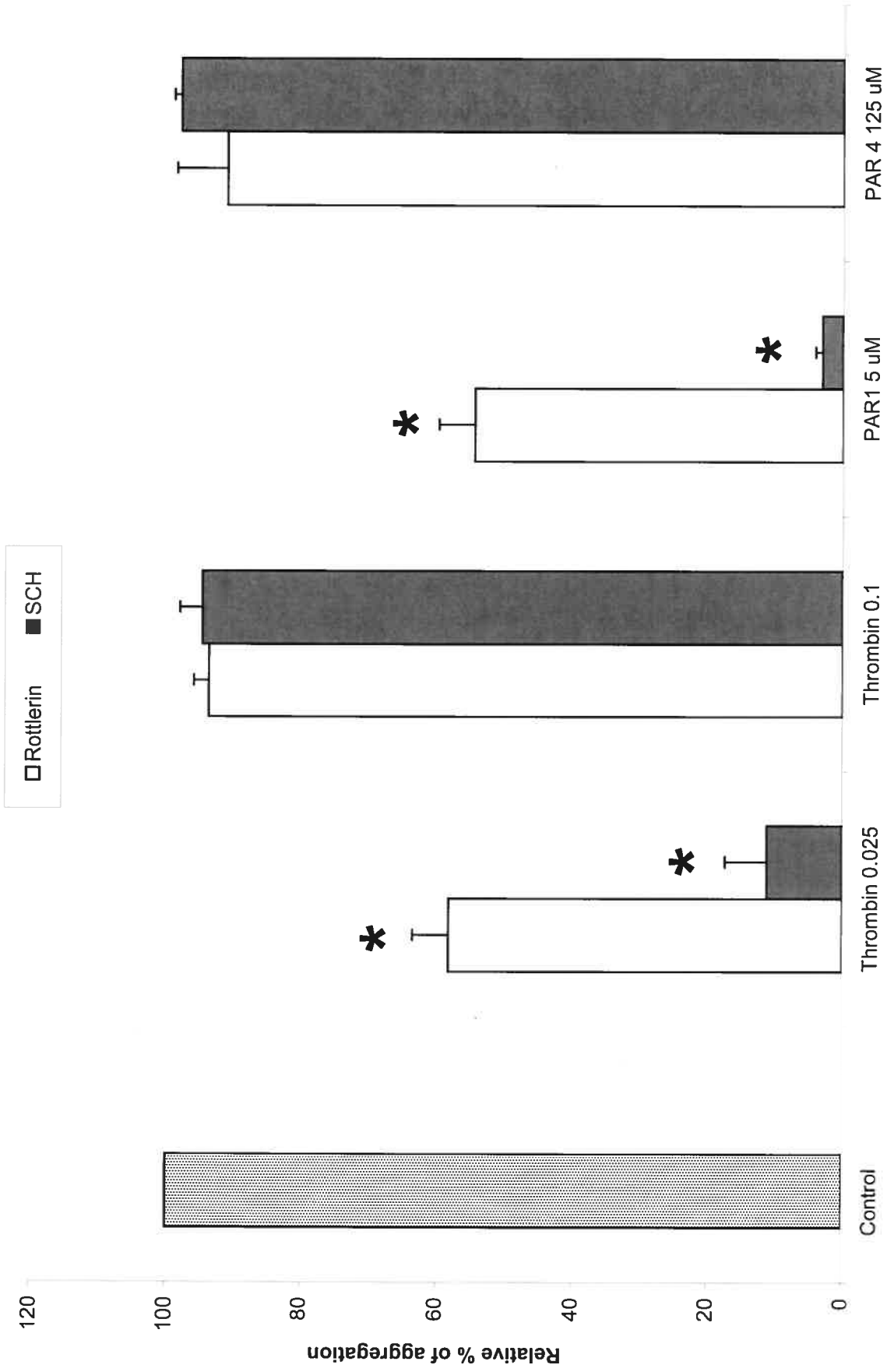


Fig 5B

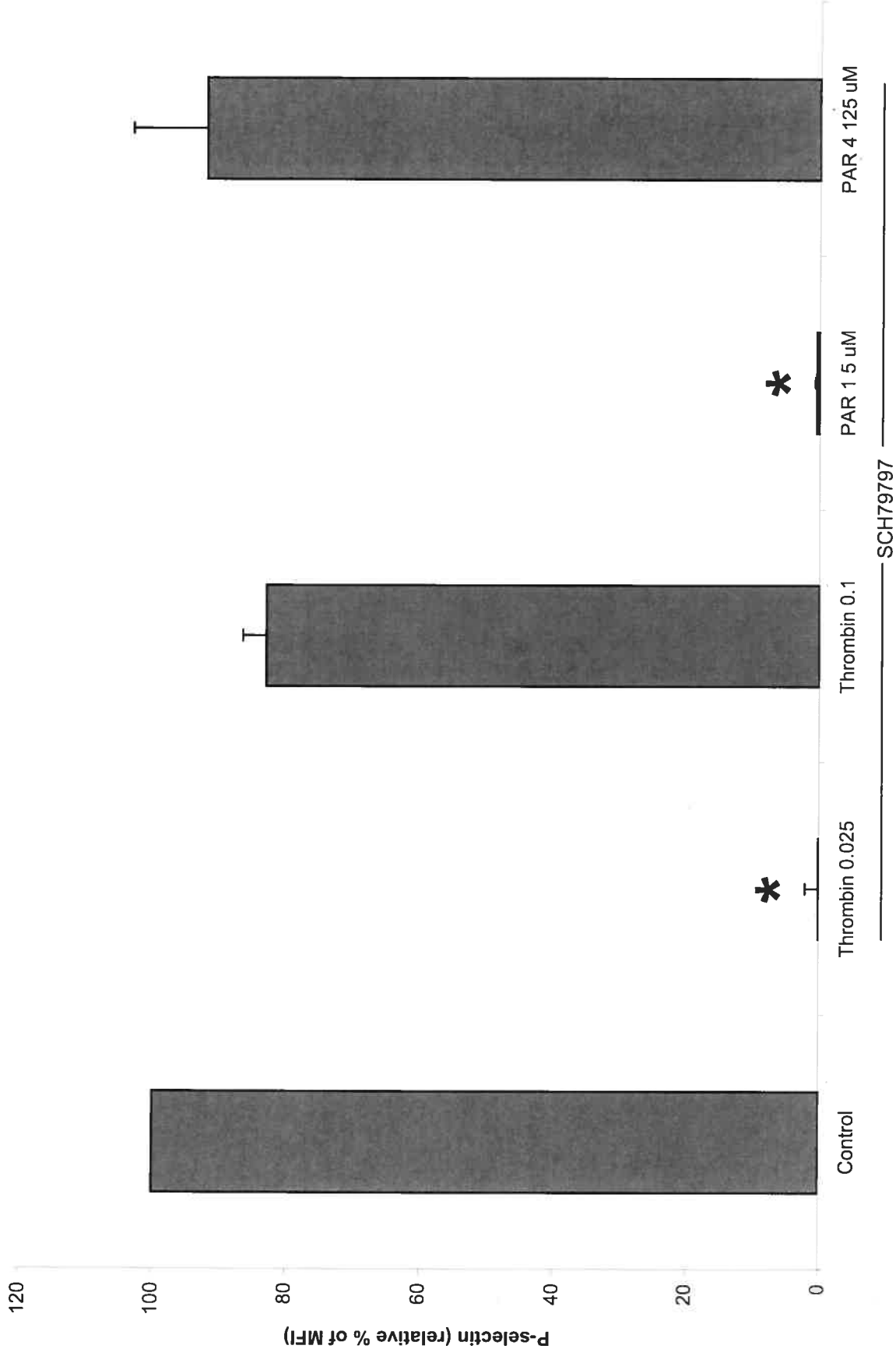


Figure 6A

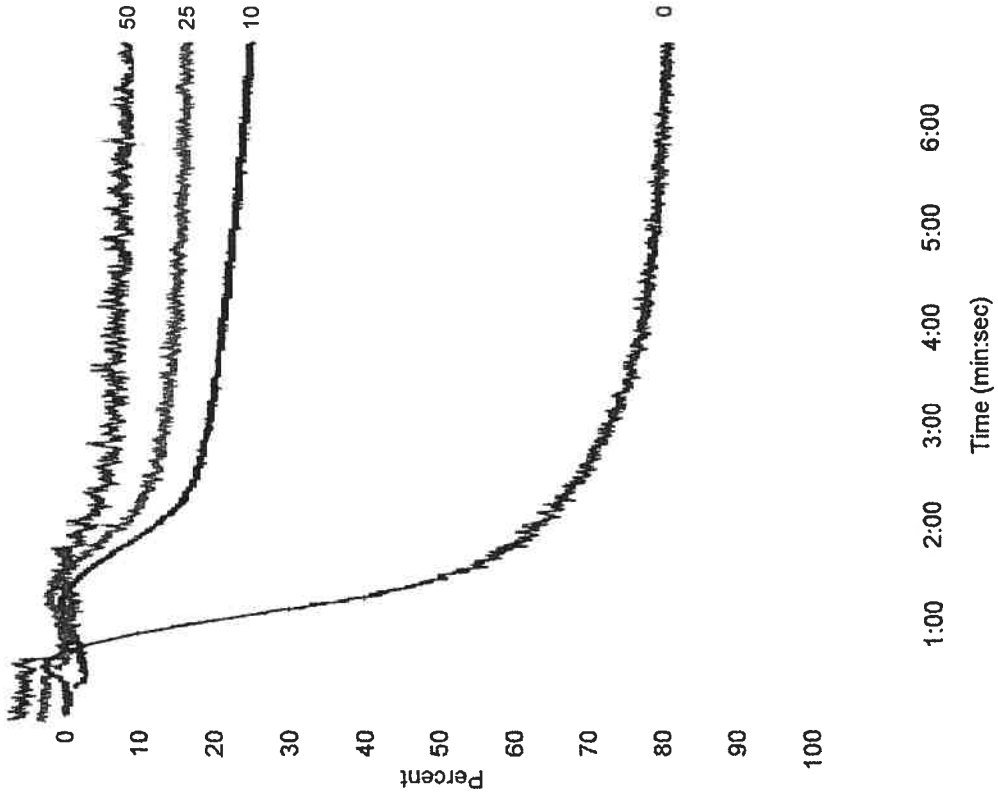


Figure 6B

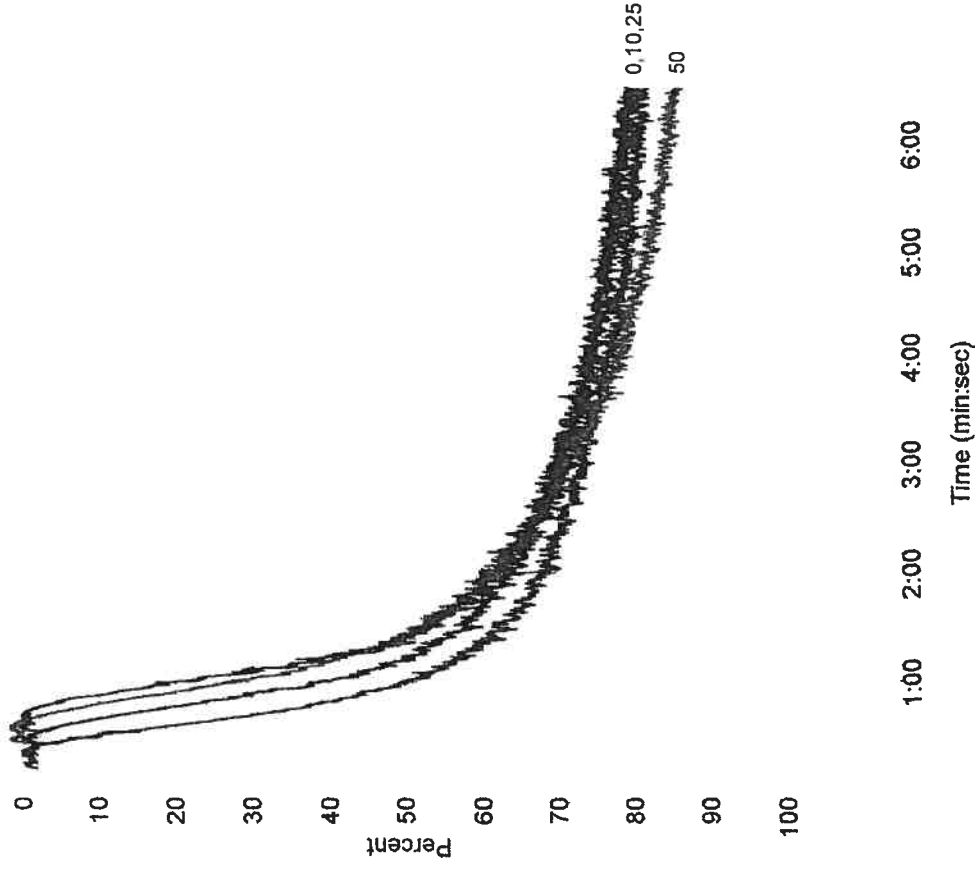


Figure 6C

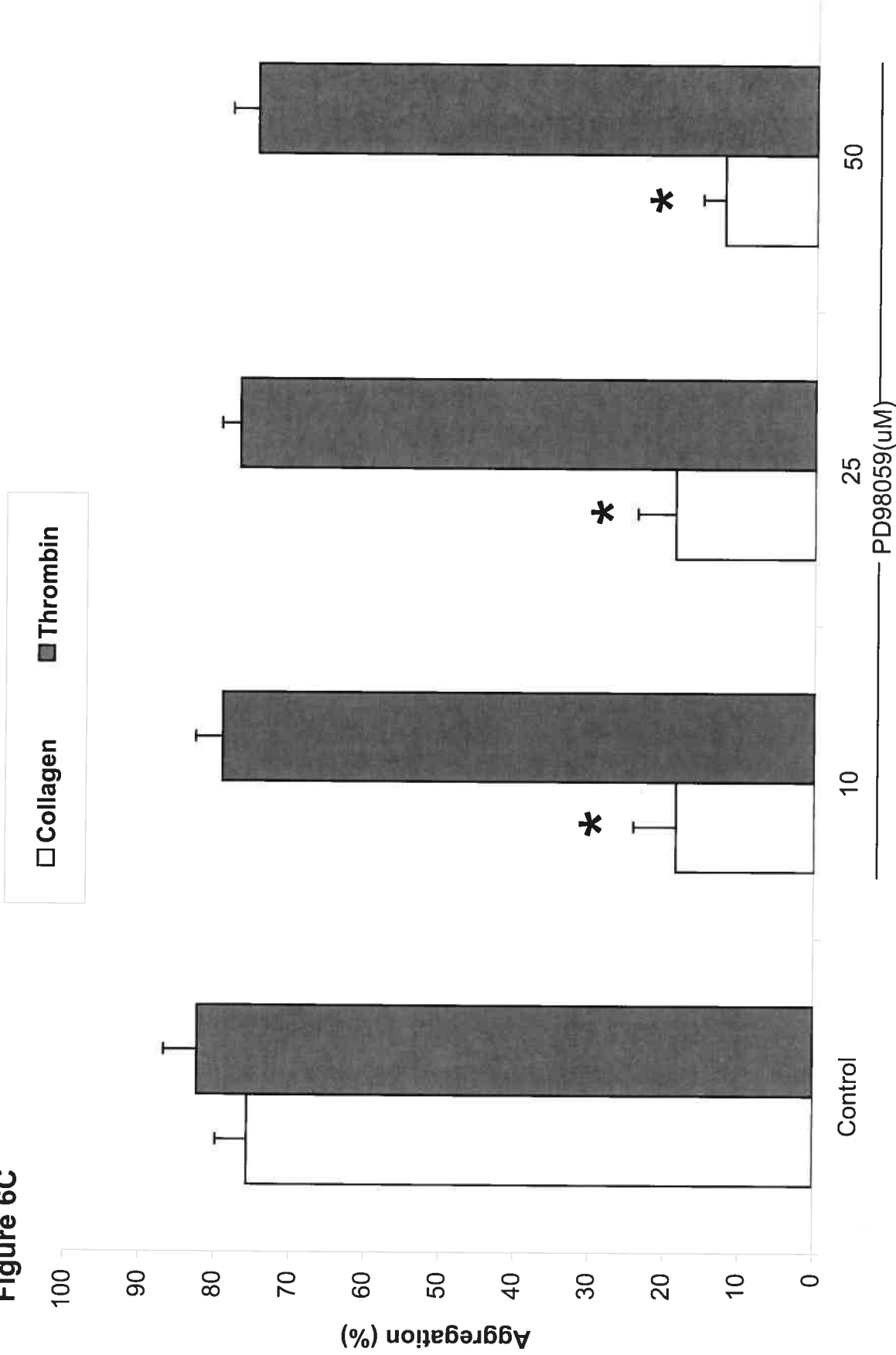


Figure 6D

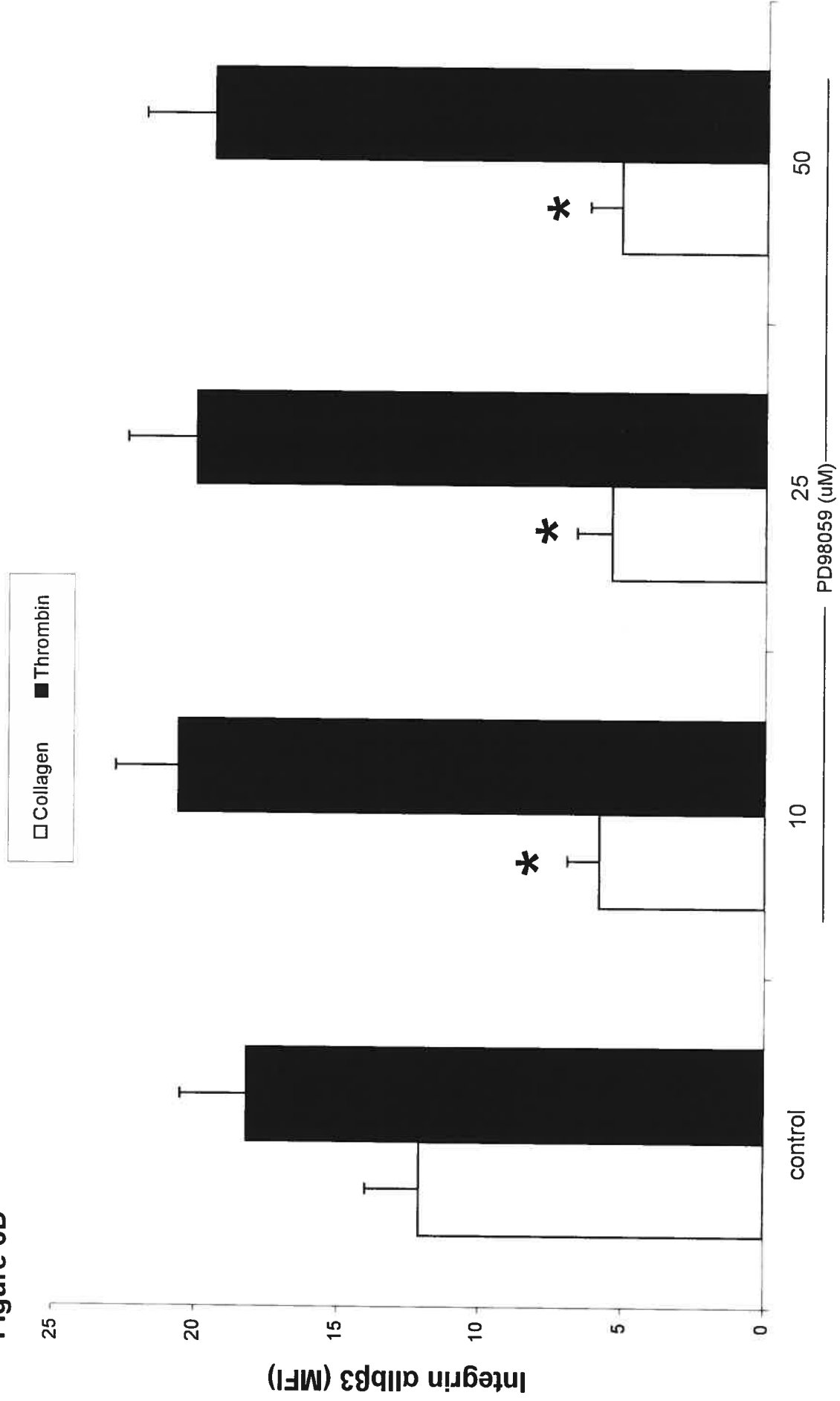


Figure 6E

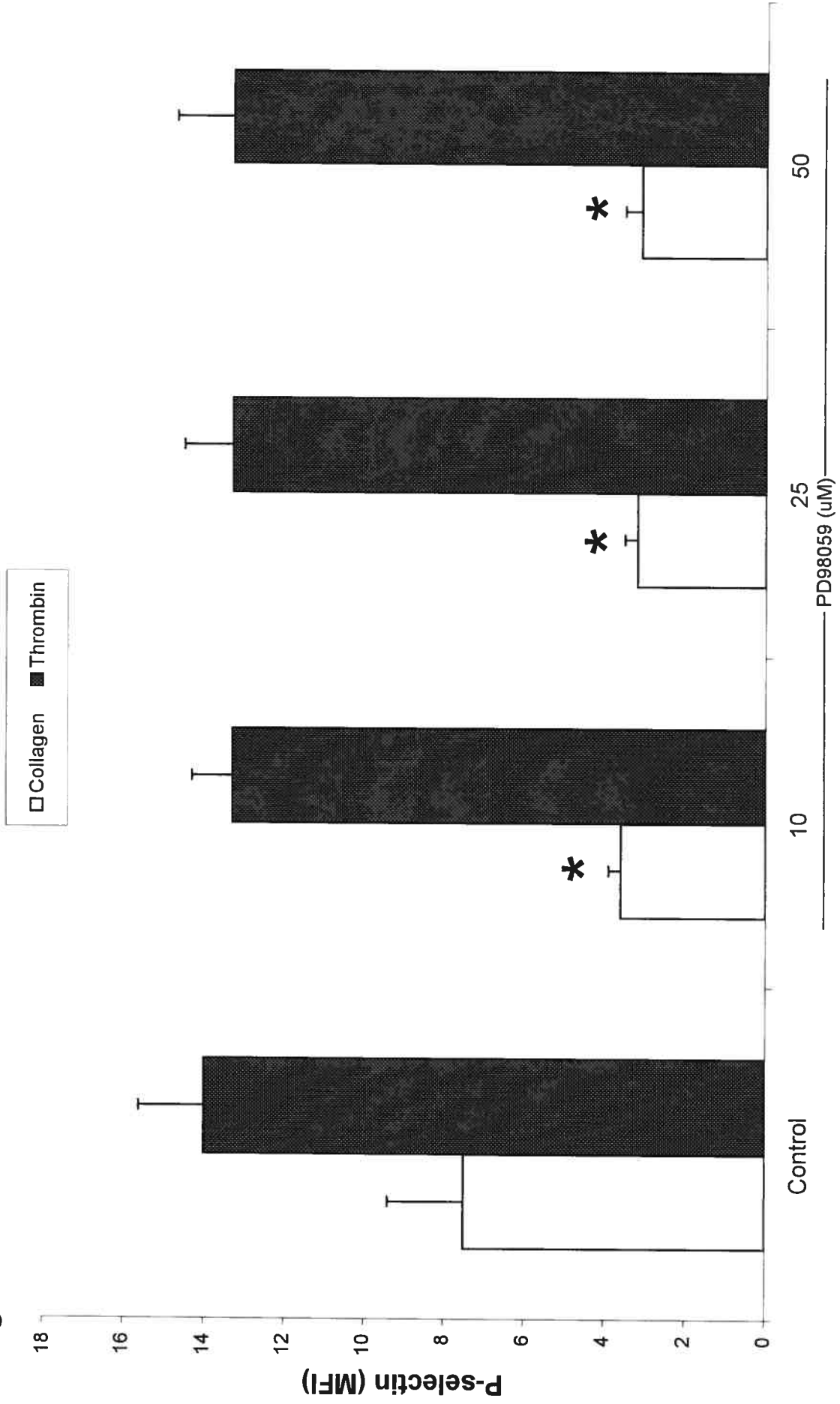


Figure 7A

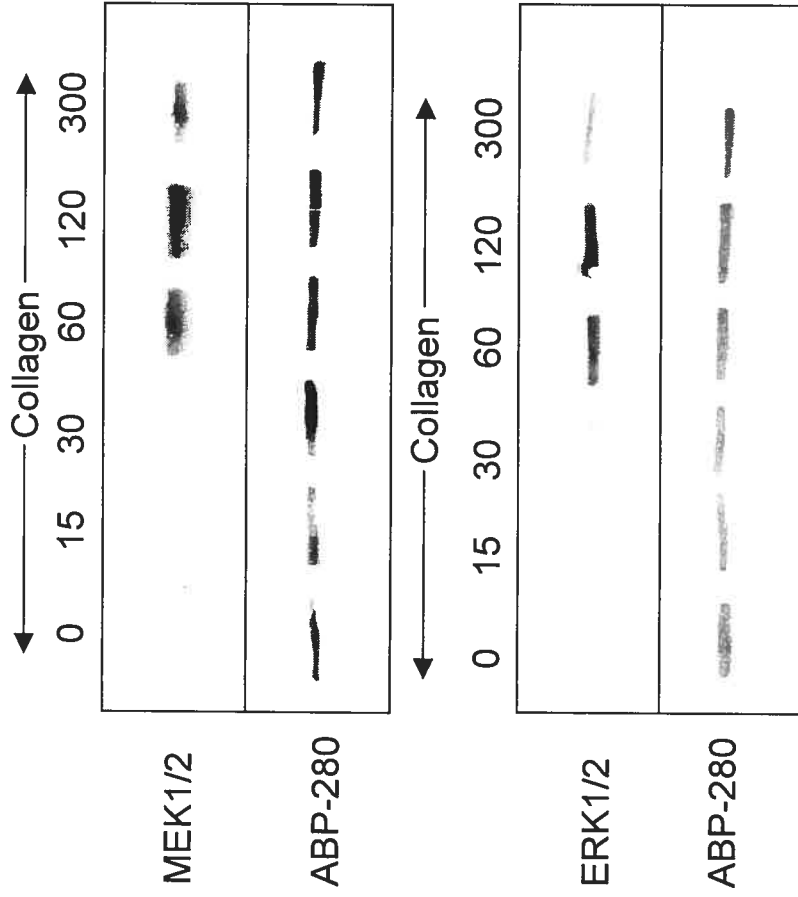


Figure 7B

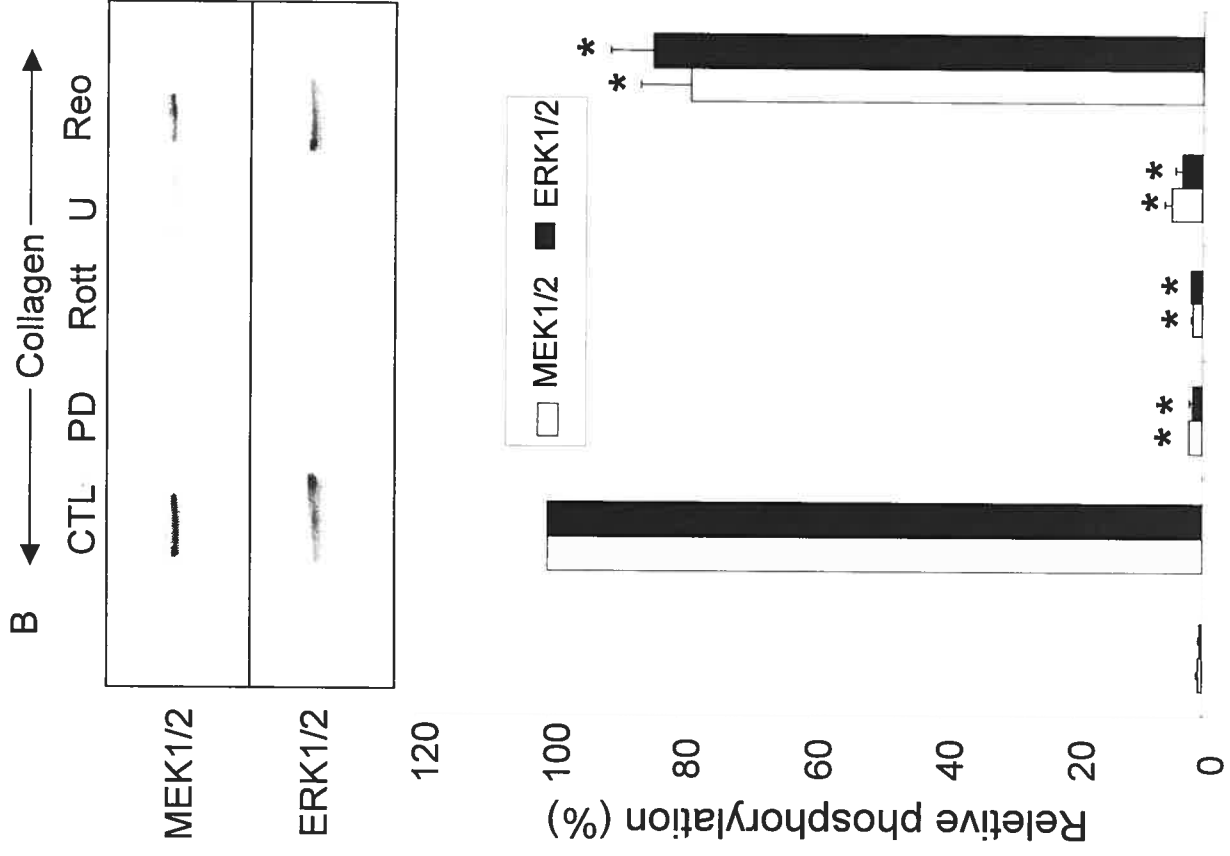
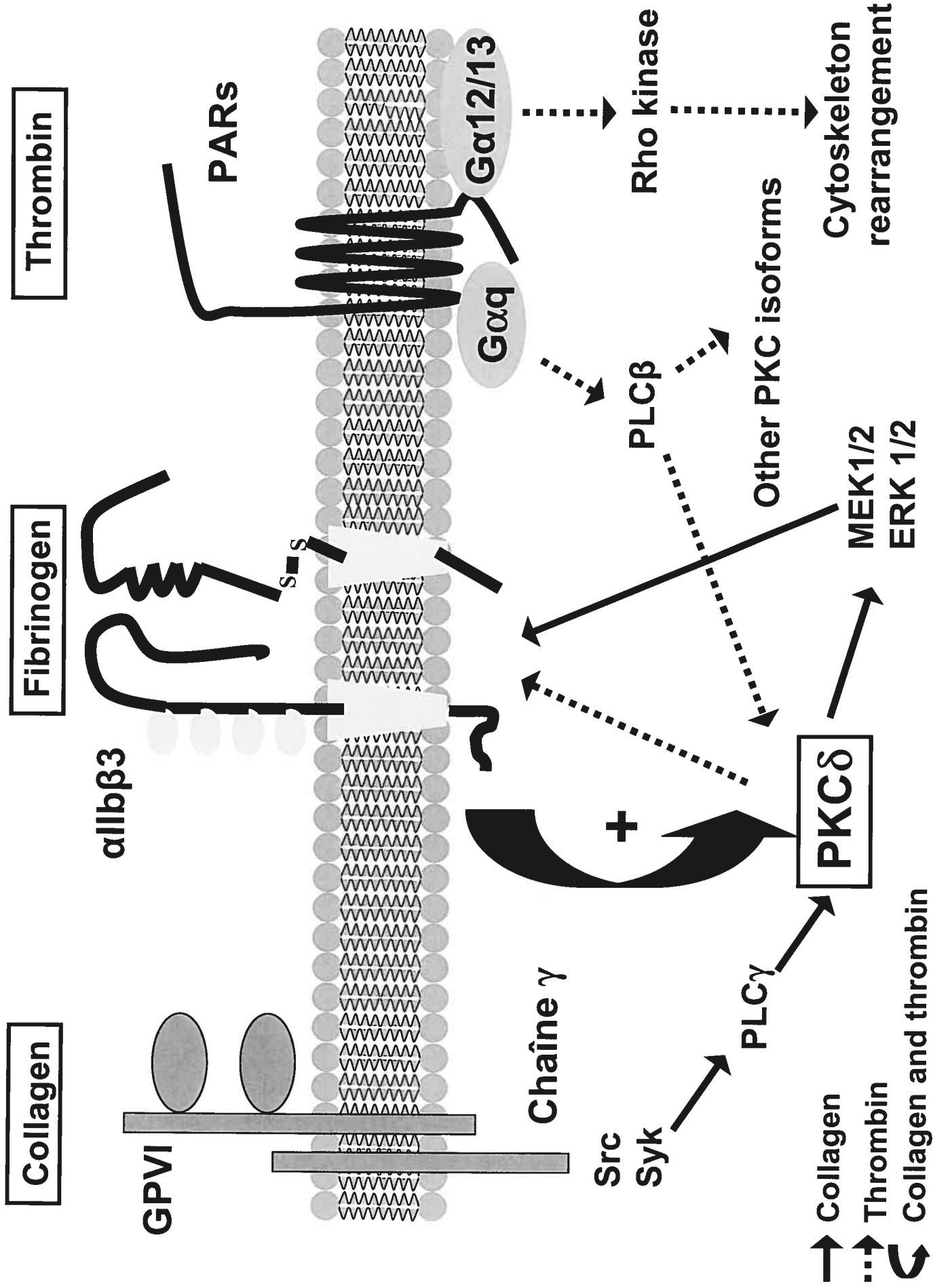


Figure 8



Discussion et conclusion

Il est bien établi aujourd'hui que les PKCs jouent un rôle primordial dans le contrôle et la régulation de divers mécanismes cellulaires. Dans les plaquettes, plusieurs isoformes de PKCs sont exprimées, mais leur implication spécifique dans la régulation de la fonction plaquettaire demeure inconnue. Cette étude avait pour but de caractériser le rôle des différentes isoformes de PKCs dans l'activation et l'agrégation plaquettaire induites par des agonistes physiologiques, tels que le collagène et la thrombine. Les principales trouvailles de cette étude sont comme suit : 1) la PKC δ est essentielle à l'activation de l'intégrine α IIb β 3 et à l'agrégation plaquettaire au collagène, tandis qu'à la thrombine, ces fonctions plaquettaires sont médiées par plus d'une isoforme de PKCs, 2) la PKC δ semble être impliquée de manière différentielle dans la signalisation à la thrombine, où elle occupe une place importante dans l'activation à PAR-1 mais non à PAR-4, 3) l'activité enzymatique de la PKC δ , telle que mesurée par sa phosphorylation et sa translocation vers la membrane plasmique suite à l'activation au collagène et à la thrombine, nous indique que cette isoforme est positivement régulée par l'intégrine α IIb β 3, et 4) la PKC δ déclenche l'activation de MEK1/2 et ERK1/2, une voie signalétique qui semble être essentielle à l'activation de l'intégrine α IIb β 3 et à l'agrégation plaquettaire au collagène.

Le collagène est une composante clé de la matrice extracellulaire qui supporte l'adhésion et l'activation des plaquettes aux sites de lésions vasculaires, via l'intégrine α 2 β 1 et la GPVI respectivement.^{128,129} La stimulation de GPVI résulte en l'activation des tyrosines kinases Src et Syk via la chaîne γ du récepteur Fc, ce qui déclenche la phosphorylation de la PLC γ et l'activation subséquente des PKCs. Ici, nous avons

confirmé l'implication des tyrosines kinases Src et Syk dans l'agrégation plaquettaire au collagène et non à la thrombine. Par ailleurs, la signalisation plaquettaire au collagène est totalement dépendante de l'activation de la PLC, tandis qu'à la thrombine, il semble exister des mécanismes signalétiques indépendants de la PLC.

Nous avons, par la suite, examiné le rôle des différentes isoformes de PKCs dans l'agrégation plaquettaire induite au collagène et à la thrombine. À l'aide d'un inhibiteur des PKCs en général, la chélerythrine, nous avons démontré que l'agrégation induite par ces deux agonites est PKC-dépendante. Plus particulièrement, au collagène, l'inhibition de la PKC δ était suffisante pour complètement prévenir l'agrégation plaquettaire, tandis qu'à la thrombine, ni l'inhibition de la PKC δ ni des isoformes des PKC conventionnelles α et β n'a affecté ce processus. Ces résultats semblent indiquer que plusieurs isoformes de PKCs sont impliquées dans la signalisation à la thrombine et que l'inhibition d'une isoforme de PKCs n'est pas suffisante pour empêcher l'agrégation plaquettaire. Il fut récemment démontré que la PKC δ interagit avec la tyrosine kinase Fyn afin de réguler négativement la sécrétion de sérotonine, le relargage du calcium intracellulaire et l'agrégation plaquettaire induite à l'alboaggégine.²² Cependant, l'alboaggégine est une enzyme capable d'activer simultanément les récepteurs GPVI et GPIb/IX/V. Dans cette étude, seuls des agonistes physiologiques plaquettaires, telle que le collagène, furent employés et, ainsi, seuls les mécanismes signalétiques via le récepteur GPVI furent étudiés. Ainsi, il semble que la PKC δ occupe une fonction dichotomique dans l'agrégation plaquettaire, possiblement via des mécanismes de régulation différents reliés au type de récepteur en question.

Ayant établi que la PKC δ est essentielle à l'agrégation plaquettaire au collagène, nous avons par la suite étudié son implication dans l'activation de l'intégrine α IIb β 3 et dans la translocation de la P-sélectine vers la membrane plasmique suite à la stimulation plaquettaire au collagène et à la thrombine. Tel que prévu, l'inhibition de la PKC δ a totalement prévenu l'activation de l'intégrine α IIb β 3, ce qui explique l'incapacité des plaquettes à agréger en présence du rottlerin. La PKC δ semble aussi être impliqué dans l'activation de l'intégrine α IIb β 3 à la thrombine, puisque son inhibition atténue considérablement l'activation de cette molécule d'adhésion. Le fait que l'inhibition de la PKC δ n'affecte aucunement l'agrégation plaquettaire à la thrombine, même en absence d'une quantité significative de molécules d' α IIb β 3, nous indique qu'il existe un seuil d'expression de ce récepteur requis pour médier l'agrégation plaquettaire et qu'au-dessus de ce seuil, les plaquettes peuvent normalement agréger. Quant à la P-sélectine, un marqueur des granules alpha, il a été démontré que sa translocation vers la membrane plasmique est dépendante des PKCs^{142,144,145}. Toutefois, l'inhibition de la PKC δ , à elle seule, ne semble pas être suffisante pour empêcher ce phénomène; l'inhibition totale de l'activation de la P-sélectine induite au collagène et à la thrombine ne fut observée qu'en présence de fortes concentrations de rottlerin (100uM), où les isoformes η , ζ , and ϵ sont affectées (*data not shown*). Ces résultats nous indiquent que l'activation de l'intégrine α IIb β 3 et la translocation de la P-sélectine vers la membrane plasmique sont des phénomènes qui sont médiés par des mécanismes signalétiques distincts.

La phosphorylation des PKCs est un mécanisme de régulation essentiel à l'activation complète de l'enzyme. Quelques études ont démontré la phosphorylation de la PKC δ suite à l'activation plaquettaire à la thrombine, à la convulxine et à

l'alboaggrégine^{22,23,387}, mais la phosphorylation de cette isoforme au collagène ne fut pas encore caractérisée. Tel que prévu, la PKC δ fut phosphorylée par le collagène et par la thrombine. Cependant, la thrombine semble activer celle-ci plus rapidement que le collagène, 30 secondes pour la thrombine comparativement à 60 secondes pour le collagène, et ces cinétiques de phosphorylation coïncident parfaitement avec le temps requis pour initier l'agrégation plaquettaire à ces deux agonistes. L'inhibition de la PLC empêcha la phosphorylation de la PKC δ au collagène, ce qui nous indique que son activation requiert la participation de la PLC. Par contre, l'inhibition de la PLC n'a pas complètement prévenu la phosphorylation de la PKC δ par la thrombine, soulignant la présence d'un mécanisme d'activation de la PKC δ indépendant de la PLC.

Effectivement, les PKCs peuvent aussi être activées par des composantes lipidiques membranaires, comme les acides gras et les lysophospholipides.²⁷⁹⁻²⁸¹ Ces produits dérivent essentiellement des membranes cellulaires et sont catalysés par la PLA₂. Le rottlerin est un inhibiteur spécifique de la PKC δ , mais il ne fut efficace qu'à inhiber la phosphorylation de la PKC δ induite au collagène et non à la thrombine. Le groupe de Murugappan et al. a récemment démontré que le rottlerin inhibe la phosphorylation de la PKC δ et il conclut que ce produit affecte la phosphorylation du domaine catalytique de la kinase.²³ Toutefois, dans cette dernière étude, le rottlerin affecte considérablement plus la phosphorylation de la PKC δ induite à la convulxine (activateur de GPVI) que celle induite par les peptides SFLLRN et AYPGKF (activateurs de PAR-1 et PAR-4 respectivement). Dans notre étude, nous concluons que le rottlerin n'affecte pas directement le site de phosphorylation de la kinase ou que cette isoforme de PKC peut être activée même en présence de cet inhibiteur. Puisque les résultats de phosphorylation

ont parfaitement corrélé avec ceux des agrégations et d'activation obtenus dans la première partie de l'étude, nous avons soulevé l'hypothèse que la PKC δ pourrait être positivement régulée par l'intégrine α Ib β 3. Afin de valider cette hypothèse, nous avons démontré que le Reopro, un anticorps qui bloque la liaison du fibrinogène et empêche ainsi toute signalisation *outside-in* qui découle de ce récepteur, prévient complètement la phosphorylation de la PKC δ par le collagène et par la thrombine, ce qui suggère que l'intégrine α Ib β 3 est activement impliquée dans la régulation de cette isoforme de PKC. L'intégrine α Ib β 3 serait donc impliquée dans le maintien et le soutien de l'activité de phosphorylation de la PKC δ . Ainsi, lorsque la PKC δ serait activée, elle déphosphorylerait rapidement, mais l'activation subséquente de l'intégrine α Ib β 3 et la liaison au fibrinogène déclencheraient des voies signalétiques impliquées dans le maintien de l'activité de la PKC δ . Puisque le rottlerin ne prévient pas complètement l'activation de l'intégrine α Ib β 3 par la thrombine, nous pouvons ainsi détecter la phosphorylation de cette isoforme de PKC. Moussazadeh et al. ont démontré que la phosphorylation de la PKC δ à la thrombine est indépendante de l'activation de l'intégrine α Ib β 3. Par contre, les investigateurs de cette étude ont travaillé avec de très fortes concentrations de thrombine (5 U/mL) et il s'avère fort possible qu'à ces concentrations, la PKC δ déphosphoryle beaucoup plus rapidement, ce qui permettrait la détection d'une quelconque phosphorylation, même en absence d' α Ib β 3 fonctionnel. Dans cette étude, nous concluons que la PKC δ est activée indépendamment de l'intégrine α Ib β 3 (l'activation de la PKC δ précède celle de l'intégrine α Ib β 3), mais qu'elle est toutefois régulée par cette dernière. Ce phénomène de régulation pourrait possiblement être impliqué dans la solidification et l'irréversibilité de l'agrégat plaquettaire.

L'activation des PKCs est généralement associée à la translocation des PKCs du cytosol à la membrane plasmique et ce phénomène peut être employé comme marqueur de l'activation des PKCs. Les résultats de translocation de la PKC δ suite à l'activation au collagène et à la thrombine ont confirmé les observations de phosphorylation obtenues antérieurement et supporte le rôle de l'intégrine α IIb β 3 dans la régulation de la PKC δ .

Puisque la PKC δ n'est pas requise pour l'agrégation plaquettaire à la thrombine, nous avons, par la suite, évalué le rôle de cette isoforme dans la signalisation à PAR-1 et à PAR-4. Les résultats obtenus nous indiquent que la PKC δ est impliquée dans l'activation plaquettaire à PAR-1 et non à PAR-4, et que lorsque les deux récepteurs sont activés, tel qu'observé par des concentrations de thrombine de 0.1 U/mL, le rôle de la PKC δ dans la signalisation à PAR-1 est masqué et devient moins important, de par la participation des autres isoformes de PKCs, soit celles impliquées dans la signalisation à PAR-4.

Puisque la voie des MAPKs est généralement impliquée dans la signalisation des PKCs, nous avons étudié le rôle des MAPKs, MEK1/2 et ERK1/2, dans l'activation et l'agrégation plaquettaire au collagène et à la thrombine. Il a été démontré que la stimulation plaquettaire à l'aide d'agonistes physiologiques, tels que la thrombine et le collagène, déclenche l'activation de cette cascade signalétique.³⁸⁸⁻³⁹⁰ Par contre, le rôle exact des MAPK dans la fonction plaquettaire demeure encore mal caractérisé. Dans cette étude, nous avons démontré que l'activation de l'intégrine α IIb β 3, la translocation de la P-sélectine et l'agrégation plaquettaire au collagène, et non à la thrombine, sont dépendants des MAPK. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente qui indique que la MEK1/2 est impliquée dans la réponse plaquettaire au collagène, sans être

importante dans celle à la thrombine ou au U46619.³⁹¹ De plus, nous avons démontré que la phosphorylation de MEK1/2 et de ERK1/2 dépend de l'activation de la PKC δ , ce qui nous indique que la voie des MAPK est en aval de la PKC δ . Par ailleurs, l'inhibition de l'intégrine α Ib β 3 ne semble pas vraiment affecter la phosphorylation de ces deux kinases, ce qui nous indique que la PKC δ peut activer ces effecteurs en aval, même en absence de l'intégrine α Ib β 3.

En conclusion, cette étude caractérise le rôle de la PKC δ dans la signalisation plaquettaire, en soulignant son importance dans l'activation et l'agrégation plaquettaire au collagène et à PAR-1. Les principaux résultats de cette étude nous indique que : 1) la PKC δ est essentielle à l'activation de l'intégrine α Ib β 3 et à l'agrégation plaquettaire au collagène, tandis qu'à la thrombine, ces fonctions plaquettaires sont médiées par plus d'une isoforme de PKCs, 2) la PKC δ semble être impliquée de manière différentielle dans la signalisation à la thrombine, où elle occupe une place importante dans l'activation à PAR-1 mais non à PAR-4, 3) l'activité enzymatique de la PKC δ , telle que mesurée par sa phosphorylation et sa translocation vers la membrane plasmique suite à l'activation au collagène et à la thrombine, nous indique que cette isoforme est positivement régulée par l'intégrine α Ib β 3, et 4) la PKC δ déclenche l'activation de MEK1/2 et ERK1/2, une voie signalétique qui semble être essentielle à l'activation de l'intégrine α Ib β 3 et à l'agrégation plaquettaire au collagène.

Directives futures

Dans l'optique que la PKC δ occupe un rôle fondamental dans la physiologie plaquettaire, il serait intéressant d'étudier son implication dans un système *in vivo*. À l'aide d'un modèle transgénique de souris déficientes en PKC δ , nous pourrions, d'une part, confirmer le rôle de cette isoforme dans les mêmes systèmes *in vitro* et, d'autre part, évaluer *in vivo* (chez ces souris) l'adhésion ferme et la formation du thrombus plaquettaire aux sites de lésions artérielles.

Par ailleurs, il serait aussi pertinent de caractériser les mécanismes signalétiques par lesquels l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ régule l'activité de la PKC δ . Ces mécanismes pourraient sensiblement ressembler à ceux impliqués dans la signalisation classique outside-in de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ou possiblement différer à certains niveaux.

Finalement, les PKCs interagissent avec plusieurs partenaires signalétiques afin d'activer leurs effecteurs en aval et il serait donc intéressant de caractériser les différentes protéines d'interaction de la PKC δ dans la signalisation et la fonction plaquettaire au collagène et à la thrombine.

Bibliographie

1. Frojmovic MM. Platelet aggregation in flow: differential roles for adhesive receptors and ligands. *Am Heart J.* 1998;135:S119-131.
2. Hynes RO. The complexity of platelet adhesion to extracellular matrices. *Thromb Haemost.* 1991;66:40-43.
3. KJ C. Platelet receptors, in platelets, Editor Alan Michelson. Academic Press. 2002:65-84.
4. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemost.* 1993;70:119-123.
5. Savage B RZ. Platelet thrombus formation in flowing blood, in platelets, Editor Alan Michelson. Academic Press. 2002:215-228.
6. Berndt MC, Shen Y, Doppeide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost.* 2001;86:178-188.
7. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost.* 2001;86:189-197.
8. Hato T GM, Shattil SJ. Integrin alphaIIb/beta3, in platelets, Editor Alan Michelson. Academic Press. 2002:105-116.
9. Brass LF, Manning DR, Cichowski K, Abrams CS. Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Thromb Haemost.* 1997;78:581-589.
10. Levy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy'? *Haemostasis.* 1999;29:4-15.
11. Woulfe D YJ, Prevost N, O'Brien PJ, Brass LF. Signal transduction during the initiation, extension, and preparation of platelet plug formation, in platelets, Editor Alan Michelson. Academic Press. 2002:197-212.
12. Tolentino AR BW. Thrombin receptors, in platelets, Editor Alan Michelson. Academic Press. 2002:117-138.
13. Morton LF, Peachey AR, Barnes MJ. Platelet-reactive sites in collagens type I and type III. Evidence for separate adhesion and aggregatory sites. *Biochem J.* 1989;258:157-163.

14. Santoro SA, Walsh JJ, Staatz WD, Baranski KJ. Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation. *Cell Regul.* 1991;2:905-913.
15. Blobe GC, Stribling S, Obeid LM, Hannun YA. Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv.* 1996;27:213-248.
16. Hofmann J. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *Faseb J.* 1997;11:649-669.
17. Jaken S. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:168-173.
18. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 1995;270:28495-28498.
19. Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci.* 2004;117:131-132.
20. Tabuchi A, Yoshioka A, Higashi T, et al. Direct demonstration of involvement of protein kinase C α in the Ca²⁺-induced platelet aggregation. *J Biol Chem.* 2003;278:26374-26379.
21. Crosby D, Poole AW. Interaction of Bruton's tyrosine kinase and protein kinase C θ in platelets. Cross-talk between tyrosine and serine/threonine kinases. *J Biol Chem.* 2002;277:9958-9965.
22. Crosby D, Poole AW. Physical and functional interaction between protein kinase C δ and Fyn tyrosine kinase in human platelets. *J Biol Chem.* 2003;278:24533-24541.
23. Murugappan S, Tuluc F, Dorsam RT, Shankar H, Kunapuli SP. Differential role of protein kinase C δ isoform in agonist-induced dense granule secretion in human platelets. *J Biol Chem.* 2004;279:2360-2367.
24. Libersan D, Merhi Y. Platelet P-selectin expression: requirement for protein kinase C, but not protein tyrosine kinase or phosphoinositide 3-kinase. *Thromb Haemost.* 2003;89:1016-1023.
25. Blake RA, Schieven GL, Watson SP. Collagen stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 but not phospholipase C-gamma 1 in human platelets. *FEBS Lett.* 1994;353:212-216.
26. Yanaga F, Poole A, Asselin J, et al. Syk interacts with tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets activated by collagen and cross-linking of the Fc gamma-IIA receptor. *Biochem J.* 1995;311 (Pt 2):471-478.

27. Sherwood L. Human Physiology. West Virginia: Third Edition; 1997.
28. Ramzi S, Cotran VK, Tucker Collins, Stanley L. Robbins. Pathologic basis of disease. New York: Sixth Edition; 1999.
29. Solomon EP DP. Anatomie et physiologie humaine. Montréal: McGraw-Hill; 1981.
30. Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev.* 1999;79:387-423.
31. Williams JK, Heistad DD. [The vasa vasorum of the arteries]. *J Mal Vasc.* 1996;21 Suppl C:266-269.
32. Robb-Smith AH. Why the platelets were discovered. *Br J Haematol.* 1967;13:618-637.
33. Bizzozero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *L'Osservatore.* 1881;17:785-787.
34. Bizzozero G. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol.* 1882;90:261-332.
35. Bizzozero G. Sul midollo delle ossa. *II Morgagni.* 1869.
36. Golde DW. The stem cell. *Sci Am.* 1991;265:86-93.
37. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1993;81:2844-2853.
38. Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel).* 1957;29:267-290.
39. Shaklai M, Tavassoli M. Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process. *J Ultrastruct Res.* 1978;62:270-285.
40. Ihzumi T, Hattori A, Sanada M, Muto M. Megakaryocyte and platelet formation: a scanning electron microscope study in mouse spleen. *Arch Histol Jpn.* 1977;40:305-320.
41. Djaldetti M, Fishman P, Bessler H, Notti I. SEM observations on the mechanism of platelet release from megakaryocytes. *Thromb Haemost.* 1979;42:611-620.

42. Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*. 1982;60:213-219.
43. Becker RP, De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat*. 1976;145:183-205.
44. Tortora GJ GS, Parent JC. *Principes d'anatomie et de physiologie*. Montréal: 7e Éd; 1993.
45. George JN. Platelets. *Lancet*. 2000;355:1531-1539.
46. Michelson AD. *Platelets*. San Diego: Academic Press; 2002.
47. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood*. 1998;91:2645-2657.
48. Boyles J, Fox JE, Phillips DR, Stenberg PE. Organization of the cytoskeleton in resting, discoid platelets: preservation of actin filaments by a modified fixation that prevents osmium damage. *J Cell Biol*. 1985;101:1463-1472.
49. Fox JE, Boyles JK, Berndt MC, Steffen PK, Anderson LK. Identification of a membrane skeleton in platelets. *J Cell Biol*. 1988;106:1525-1538.
50. Kenney DM, Linck RW. The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *J Cell Sci*. 1985;78:1-22.
51. Fox JE, Phillips DR. Inhibition of actin polymerization in blood platelets by cytochalasins. *Nature*. 1981;292:650-652.
52. Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol*. 1992;118:1421-1442.
53. Clemetson KJ. Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost*. 1995;74:111-116.
54. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1987;69:1712-1720.
55. Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest*. 1989;84:1440-1445.

56. Arai M, Yamamoto N, Moroi M, Akamatsu N, Fukutake K, Tanoue K. Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br J Haematol*. 1995;89:124-130.
57. Phillips DR, Agin PP. Platelet plasma membrane glycoproteins. Identification of a proteolytic substrate for thrombin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977;75:940-947.
58. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol Chem*. 1999;274:29019-29024.
59. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett*. 1997;413:255-259.
60. Polgar J, Clemetson JM, Kehrel BE, et al. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:13576-13583.
61. Niedergang F, Alcover A, Knight CG, et al. Convulxin binding to platelet receptor GPVI: competition with collagen related peptides. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273:246-250.
62. Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, et al. Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J Biol Chem*. 2002;277:21561-21566.
63. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, et al. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med*. 2001;193:459-469.
64. Kato K, Kanaji T, Russell S, et al. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood*. 2003;102:1701-1707.
65. Siljander PR, Munnix IC, Smethurst PA, et al. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood*. 2004;103:1333-1341.
66. Moroi M, Okuma M, Jung SM. Platelet adhesion to collagen-coated wells: analysis of this complex process and a comparison with the adhesion to matrigel-coated wells. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1137:1-9.

67. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature*. 1985;318:470-472.
68. Santoro SA. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell*. 1986;46:913-920.
69. Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG, Santoro SA. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol*. 1989;108:1917-1924.
70. Emsley J, King SL, Bergelson JM, Liddington RC. Crystal structure of the I domain from integrin alpha2beta1. *J Biol Chem*. 1997;272:28512-28517.
71. Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell*. 2000;101:47-56.
72. Santoro SA, Rajpara SM, Staatz WD, Woods VL, Jr. Isolation and characterization of a platelet surface collagen binding complex related to VLA-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;153:217-223.
73. Jarvis GE, Atkinson BT, Snell DC, Watson SP. Distinct roles of GPVI and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens. *Br J Pharmacol*. 2002;137:107-117.
74. Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. Studies with a murine monoclonal antibody that abolishes ristocetin-induced binding of von Willebrand factor to platelets: additional evidence in support of GPIb as a platelet receptor for von Willebrand factor. *Blood*. 1983;61:99-110.
75. Berndt MC, Gregory C, Kabral A, Zola H, Fournier D, Castaldi PA. Purification and preliminary characterization of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane. *Eur J Biochem*. 1985;151:637-649.
76. Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, von dem Borne AE. Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem*. 1992;267:364-369.
77. Lopez JA. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994;5:97-119.
78. Andrews RK, Fox JE. Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex that binds to purified actin-binding protein. *J Biol Chem*. 1992;267:18605-18611.

79. Du X, Fox JE, Pei S. Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib alpha. *J Biol Chem.* 1996;271:7362-7367.
80. Andrews RK, Munday AD, Mitchell CA, Berndt MC. Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood.* 2001;98:681-687.
81. Harmon JT, Jamieson GA. Thrombin binds to a high-affinity approximately 900 000-dalton site on human platelets. *Biochemistry.* 1985;24:58-64.
82. Harmon JT, Jamieson GA. The glycolicin portion of platelet glycoprotein Ib expresses both high and moderate affinity receptor sites for thrombin. A soluble radioreceptor assay for the interaction of thrombin with platelets. *J Biol Chem.* 1986;261:13224-13229.
83. De Marco L, M. Mazzucato, A. Masotti, and Z.M. Ruggeri. Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein Ib alpha. *JBiolChem.* 1994;269:6478-6484.
84. Simon DI, Chen Z, Xu H, et al. Platelet glycoprotein Ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 2000;192:193-204.
85. Romo GM, Dong JF, Schade AJ, et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med.* 1999;190:803-814.
86. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood.* 1996;88:907-914.
87. Woods VL, Jr., Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem.* 1986;261:15242-15251.
88. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood.* 1988;71:831-843.
89. Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. Regulation of vascular integrins. *Blood.* 1993;81:2827-2843.
90. Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 2000;28:311-339.
91. Bork P, Doerks T, Springer TA, Snel B. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci.* 1999;24:261-263.

92. Wippler J, Kouns WC, Schlaeger EJ, Kuhn H, Hadvary P, Steiner B. The integrin alpha IIB-beta 3, platelet glycoprotein IIB-IIIa, can form a functionally active heterodimer complex without the cysteine-rich repeats of the beta 3 subunit. *J Biol Chem.* 1994;269:8754-8761.
93. Kashiwagi H, Tomiyama Y, Tadokoro S, et al. A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the beta3 subunit activates integrins alphaIIBbeta3 and alphaVbeta3. *Blood.* 1999;93:2559-2568.
94. Du X, Gu M, Weisel JW, et al. Long range propagation of conformational changes in integrin alpha IIB beta 3. *J Biol Chem.* 1993;268:23087-23092.
95. Frelinger AL, 3rd, Du XP, Plow EF, Ginsberg MH. Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha IIB beta 3 (glycoprotein IIB-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. *J Biol Chem.* 1991;266:17106-17111.
96. Fox JE. Regulation of platelet function by the cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol.* 1993;344:175-185.
97. Fox JE, Lipfert L, Clark EA, Reynolds CC, Austin CD, Brugge JS. On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of GP IIB-IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton. *J Biol Chem.* 1993;268:25973-25984.
98. Fox JE, Shattil SJ, Kinlough-Rathbone RL, Richardson M, Packham MA, Sanan DA. The platelet cytoskeleton stabilizes the interaction between alphaIIBbeta3 and its ligand and induces selective movements of ligand-occupied integrin. *J Biol Chem.* 1996;271:7004-7011.
99. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, et al. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell.* 1991;67:233.
100. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood.* 1992;80:143-152.
101. Norcott JP, Solari R, Cutler DF. Targeting of P-selectin to two regulated secretory organelles in PC12 cells. *J Cell Biol.* 1996;134:1229-1240.
102. Yeo EL, Sheppard JA, Feuerstein IA. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood.* 1994;83:2498-2507.
103. Yuan Y, Kulkarni S, Ulsemer P, et al. The von Willebrand factor-glycoprotein Ib/V/IX interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization

- in rolling platelets and glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells. *J Biol Chem.* 1999;274:36241-36251.
104. Hsu-Lin S, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem.* 1984;259:9121-9126.
 105. McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem.* 1984;259:9799-9804.
 106. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 1989;84:92-99.
 107. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994;84:2068-2101.
 108. Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ, et al. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med.* 1992;175:1147-1150.
 109. Green SA, Setiadi H, McEver RP, Kelly RB. The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. *J Cell Biol.* 1994;124:435-448.
 110. Subramaniam M, Koedam JA, Wagner DD. Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol Biol Cell.* 1993;4:791-801.
 111. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996;88:3259-3287.
 112. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest.* 1997;100:S97-103.
 113. Moore KL. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma.* 1998;29:1-15.
 114. Bienvenu JG, Tanguay JF, Theoret JF, Kumar A, Schaub RG, Merhi Y. Recombinant soluble p-selectin glycoprotein ligand-1-Ig reduces restenosis through inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. *Circulation.* 2001;103:1128-1134.
 115. Tanguay JF, Geoffroy P, Sirois MG, et al. Prevention of in-stent restenosis via reduction of thrombo-inflammatory reactions with recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1. *Thromb Haemost.* 2004;91:1186-1193.

116. Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med*. 2004;10:179-186.
117. Freedman JE, Loscalzo J. Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation. *Circulation*. 2002;105:2130-2132.
118. Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: a modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res*. 1994;74 Suppl 1:S3-11.
119. Giesberts AN, van Willigen G, Lapetina EG, Akkerman JW. Regulation of platelet glycoprotein IIb/IIIa (integrin alpha IIB beta 3) function via the thrombin receptor. *Biochem J*. 1995;309 (Pt 2):613-620.
120. Schneider DJ, Taatjes DJ, Sobel BE. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of alpha-granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb-IIIa. *Cardiovasc Res*. 2000;45:437-446.
121. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29:91-105.
122. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood*. 1998;91:1318-1324.
123. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med*. 2000;191:1413-1422.
124. Miyata S, Goto S, Federici AB, Ware J, Ruggeri ZM. Conformational changes in the A1 domain of von Willebrand factor modulating the interaction with platelet glycoprotein Ibalpha. *J Biol Chem*. 1996;271:9046-9053.
125. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*. 1996;88:2939-2950.
126. Ruf A, Morgenstern E. Ultrastructural aspects of platelet adhesion on subendothelial structures. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21:119-122.
127. Ware JA, Heistad DD. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Platelet-endothelium interactions. *N Engl J Med*. 1993;328:628-635.
128. Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, et al. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood*. 1994;83:1244-1250.

129. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998;94:657-666.
130. Ginsberg MH, Du X, Plow EF. Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol*. 1992;4:766-771.
131. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*. 1985;260:11107-11114.
132. Shattil SJ. Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost*. 1995;74:149-155.
133. Sixma JJ, Slot JW, Geuze HJ. Immunocytochemical localization of platelet granule proteins. *Methods Enzymol*. 1989;169:301-311.
134. Baumgartner HR, Born GV. Effects of 5-hydroxytryptamine on platelet aggregation. *Nature*. 1968;218:137-141.
135. Costa JL, Reese TS, Murphy DL. Serotonin storage in platelets: estimation of storage-packet size. *Science*. 1974;183:537-538.
136. Behnke O. Degrading and non-degrading pathways in fluid-phase (non-adsorptive) endocytosis in human blood platelets. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1992;24:169-178.
137. Menard M, Meyers KM, Prieur DJ. Demonstration of secondary lysosomes in bovine megakaryocytes and platelets using acid phosphatase cytochemistry with cerium as a trapping agent. *Thromb Haemost*. 1990;63:127-132.
138. Barnes MJ, Knight CG, Farndale RW. The collagen-platelet interaction. *Curr Opin Hematol*. 1998;5:314-320.
139. Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. Lysosome-related organelles. *Faseb J*. 2000;14:1265-1278.
140. Chang JD, and J.A. Ware. Ca²⁺ and Protein Kinase C in platelets. *The platelet*, EG Lapetina, Ed, (Greenwich:JAI Press). 1997:275-310.
141. Carty DJ, Spielberg F, Gear AR. Thrombin causes subsecond changes in protein phosphorylation of platelets. *Blood*. 1986;67:1738-1743.
142. Chung SH, Polgar J, Reed GL. Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets. *J Biol Chem*. 2000;275:25286-25291.

143. Elzagallaai A, Rose SD, Trifaro JM. Platelet secretion induced by phorbol esters stimulation is mediated through phosphorylation of MARCKS: a MARCKS-derived peptide blocks MARCKS phosphorylation and serotonin release without affecting pleckstrin phosphorylation. *Blood*. 2000;95:894-902.
144. Reed GL, Houg AK, 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;93:2617-2626.
145. Tyers M, Rachubinski RA, Stewart MI, et al. Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature*. 1988;333:470-473.
146. Bernstein AM, Whiteheart SW. Identification of a cellubrevin/vesicle associated membrane protein 3 homologue in human platelets. *Blood*. 1999;93:571-579.
147. Lemons PP, Chen D, Bernstein AM, Bennett MK, Whiteheart SW. Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery. *Blood*. 1997;90:1490-1500.
148. Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood*. 2000;96:1782-1788.
149. Lemons PP, Chen D, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: requirements for alpha-granule release. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267:875-880.
150. Polgar J, Reed GL. A critical role for N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) in platelet granule secretion. *Blood*. 1999;94:1313-1318.
151. Parise LV. Integrin alpha(IIb)beta(3) signaling in platelet adhesion and aggregation. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:597-601.
152. De Marco L, Mazzucato M, Masotti A, Fenton JW, 2nd, Ruggeri ZM. Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin. *J Biol Chem*. 1991;266:23776-23783.
153. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 1993;361:315-325.
154. Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y, Yanagi S, Yamamura H, Okuma M. Cyclic AMP-insensitive activation of c-Src and Syk protein-tyrosine kinases through platelet membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem*. 1995;270:28029-28036.

155. Keely PJ, Parise LV. The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets. *J Biol Chem.* 1996;271:26668-26676.
156. Collier BS. Potential non-glycoprotein IIb/IIIa effects of abciximab. *Am Heart J.* 1999;138:S1-5.
157. Tcheng JE, Ellis SG, George BS, et al. Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb/IIIa integrin antiplatelet antibody Fab 7E3 in high-risk coronary angioplasty. *Circulation.* 1994;90:1757-1764.
158. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem.* 1997;272:23528-23531.
159. Briddon SJ, Watson SP. Evidence for the involvement of p59fyn and p53/56lyn in collagen receptor signalling in human platelets. *Biochem J.* 1999;338 (Pt 1):203-209.
160. Ezumi Y, Shindoh K, Tsuji M, Takayama H. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets. *J Exp Med.* 1998;188:267-276.
161. Asselin J, Gibbins JM, Achison M, et al. A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1. *Blood.* 1997;89:1235-1242.
162. Asazuma N, Wilde JI, Berlanga O, et al. Interaction of linker for activation of T cells with multiple adapter proteins in platelets activated by the glycoprotein VI-selective ligand, convulxin. *J Biol Chem.* 2000;275:33427-33434.
163. Gross BS, Lee JR, Clements JL, et al. Tyrosine phosphorylation of SLP-76 is downstream of Syk following stimulation of the collagen receptor in platelets. *J Biol Chem.* 1999;274:5963-5971.
164. Pasquet JM, Gross B, Quek L, et al. LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol Cell Biol.* 1999;19:8326-8334.
165. Bobe R, Wilde JI, Maschberger P, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent translocation of phospholipase Cgamma2 in mouse megakaryocytes is independent of Bruton tyrosine kinase translocation. *Blood.* 2001;97:678-684.
166. Gibbins JM, Briddon S, Shutes A, et al. The p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase associates with the Fc receptor gamma-chain and linker for activator of T

- cells (LAT) in platelets stimulated by collagen and convulxin. *J Biol Chem.* 1998;273:34437-34443.
167. Pasquet JM, Bobe R, Gross B, et al. A collagen-related peptide regulates phospholipase C γ 2 via phosphatidylinositol 3-kinase in human platelets. *Biochem J.* 1999;342 (Pt 1):171-177.
 168. Watanabe N, Nakajima H, Suzuki H, et al. Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85 α -null platelets characterized by an impaired response to GP VI stimulation. *Blood.* 2003;102:541-548.
 169. Hers I, Berlanga O, Tiekstra MJ, Kamiguti AS, Theakston RD, Watson SP. Evidence against a direct role of the integrin α 2 β 1 in collagen-induced tyrosine phosphorylation in human platelets. *Eur J Biochem.* 2000;267:2088-2097.
 170. Knight CG, Morton LF, Onley DJ, et al. Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res.* 1999;41:450-457.
 171. Sundaresan P FR. Platelet p38 MAP kinase phosphorylation is regulated by α 2 β 1 through Src family kinases and protein phosphatases (abstract). *Platelets.* 2003;13:361.
 172. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Dean WL, Frampton J, Watson SP. Integrin α 2 β 1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLC γ 2. *J Cell Biol.* 2003;160:769-780.
 173. Kuijpers MJ, Schulte V, Bergmeier W, et al. Complementary roles of glycoprotein VI and α 2 β 1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *Faseb J.* 2003;17:685-687.
 174. Kroll MH, Harris TS, Moake JL, Handin RI, Schafer AI. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *J Clin Invest.* 1991;88:1568-1573.
 175. Ramakrishnan V, DeGuzman F, Bao M, Hall SW, Leung LL, Phillips DR. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1823-1828.
 176. Satoh K, Asazuma N, Yatomi Y, et al. Activation of protein-tyrosine kinase pathways in human platelets stimulated with the A1 domain of von Willebrand factor. *Platelets.* 2000;11:171-176.

177. Andrews RK, Harris SJ, McNally T, Berndt MC. Binding of purified 14-3-3 zeta signaling protein to discrete amino acid sequences within the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Biochemistry*. 1998;37:638-647.
178. Calverley DC, Kavanagh TJ, Roth GJ. Human signaling protein 14-3-3zeta interacts with platelet glycoprotein Ib subunits Ibalpha and Ibbeta. *Blood*. 1998;91:1295-1303.
179. Falati S, Edmead CE, Poole AW. Glycoprotein Ib-V-IX, a receptor for von Willebrand factor, couples physically and functionally to the Fc receptor gamma-chain, Fyn, and Lyn to activate human platelets. *Blood*. 1999;94:1648-1656.
180. Sullam PM, Hyun WC, Szollosi J, Dong J, Foss WM, Lopez JA. Physical proximity and functional interplay of the glycoprotein Ib-IX-V complex and the Fc receptor FcgammaRIIA on the platelet plasma membrane. *J Biol Chem*. 1998;273:5331-5336.
181. Wu Y, Suzuki-Inoue K, Satoh K, et al. Role of Fc receptor gamma-chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling. *Blood*. 2001;97:3836-3845.
182. Canobbio I, Bertoni A, Lova P, et al. Platelet activation by von Willebrand factor requires coordinated signaling through thromboxane A2 and Fc gamma IIA receptor. *J Biol Chem*. 2001;276:26022-26029.
183. Canobbio I, Reineri S, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M. A role for p38 MAP kinase in platelet activation by von Willebrand factor. *Thromb Haemost*. 2004;91:102-110.
184. Francesconi M, Casonato A, Pontara E, Dalla Via L, Girolami A, Deana R. Type IIB von Willebrand factor induces phospholipase A2 activation and cytosolic Ca²⁺ increase in platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;214:102-109.
185. Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha Iib beta 3 independently of other receptors. *Blood*. 2004;103:3403-3411.
186. Munday AD, Berndt MC, Mitchell CA. Phosphoinositide 3-kinase forms a complex with platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and 14-3-3zeta. *Blood*. 2000;96:577-584.
187. Hoffmeister KM, Josefsson EC, Isaac NA, Clausen H, Hartwig JH, Stossel TP. Glycosylation restores survival of chilled blood platelets. *Science*. 2003;301:1531-1534.

188. Andrews RK, Shen Y, Gardiner EE, Dong JF, Lopez JA, Berndt MC. The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost.* 1999;82:357-364.
189. Celikel R, McClintock RA, Roberts JR, et al. Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha. *Science.* 2003;301:218-221.
190. Dumas JJ, Kumar R, Seehra J, Somers WS, Mosyak L. Crystal structure of the GpIbalpha-thrombin complex essential for platelet aggregation. *Science.* 2003;301:222-226.
191. Ganguly P. Binding of thrombin to functionally defective platelets: a hypothesis on the nature of the thrombin receptor. *Br J Haematol.* 1977;37:47-51.
192. Jamieson GA, Okumura T. Reduced thrombin binding and aggregation in Bernard-Soulier platelets. *J Clin Invest.* 1978;61:861-864.
193. Adam F, Guillin MC, Jandrot-Perrus M. Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin. *Eur J Biochem.* 2003;270:2959-2970.
194. Dubois C, Steiner B, Kieffer N, Reigner SC. Thrombin binding to GPIbalpha induces platelet aggregation and fibrin clot retraction supported by resting alphaIIbbeta3 interaction with polymerized fibrin. *Thromb Haemost.* 2003;89:853-865.
195. Hung DT, Vu TK, Wheaton VI, Ishii K, Coughlin SR. Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. *J Clin Invest.* 1992;89:1350-1353.
196. Ngaiza JR, Jaffe EA. A 14 amino acid peptide derived from the amino terminus of the cleaved thrombin receptor elevates intracellular calcium and stimulates prostacyclin production in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;179:1656-1661.
197. Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, et al. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett.* 1991;288:123-128.
198. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991;64:1057-1068.

199. Mirza H, Schmidt VA, Derian CK, Jesty J, Bahou WF. Mitogenic responses mediated through the proteinase-activated receptor-2 are induced by expressed forms of mast cell alpha- or beta-tryptases. *Blood*. 1997;90:3914-3922.
200. Nystedt S, Emilsson K, Larsson AK, Strombeck B, Sundelin J. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem*. 1995;232:84-89.
201. Cupit LD, Schmidt VA, Bahou WF. Proteolytically activated receptor-3. A member of an emerging gene family of protease receptors expressed on vascular endothelial cells and platelets. *Trends Cardiovasc Med*. 1999;9:42-48.
202. Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*. 1997;386:502-506.
203. Schmidt VA, Nierman WC, Maglott DR, et al. The human proteinase-activated receptor-3 (PAR-3) gene. Identification within a Par gene cluster and characterization in vascular endothelial cells and platelets. *J Biol Chem*. 1998;273:15061-15068.
204. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6642-6646.
205. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 1998;394:690-694.
206. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest*. 1999;103:879-887.
207. Banno Y, Yada Y, Nozawa Y. Purification and characterization of membrane-bound phospholipase C specific for phosphoinositides from human platelets. *J Biol Chem*. 1988;263:11459-11465.
208. Cockcroft S, Thomas GM. Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem J*. 1992;288 (Pt 1):1-14.
209. Rhee SG, Kim H, Suh PG, Choi WC. Multiple forms of phosphoinositide-specific phospholipase C and different modes of activation. *Biochem Soc Trans*. 1991;19:337-341.
210. Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science*. 1989;244:546-550.
211. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature*. 1997;389:183-186.

212. Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, et al. Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science*. 1998;280:2112-2114.
213. Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermanns S. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol*. 1999;144:745-754.
214. Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, et al. p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science*. 1998;280:2109-2111.
215. Barr AJ, Brass LF, Manning DR. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor.G protein coupling. *J Biol Chem*. 1997;272:2223-2229.
216. Faruqi TR, Weiss EJ, Shapiro MJ, Huang W, Coughlin SR. Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. *J Biol Chem*. 2000;275:19728-19734.
217. Bahou WF, Collier BS, Potter CL, Norton KJ, Kutok JL, Goligorsky MS. The thrombin receptor extracellular domain contains sites crucial for peptide ligand-induced activation. *J Clin Invest*. 1993;91:1405-1413.
218. Covic L, Gresser AL, Kuliopulos A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*. 2000;39:5458-5467.
219. Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function. *Nature*. 1999;401:808-811.
220. Hato T, Pampori N, Shattil SJ. Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alphaIIb beta3. *J Cell Biol*. 1998;141:1685-1695.
221. Hantgan RR, Paumi C, Rocco M, Weisel JW. Effects of ligand-mimetic peptides Arg-Gly-Asp-X (X = Phe, Trp, Ser) on alphaIIb beta3 integrin conformation and oligomerization. *Biochemistry*. 1999;38:14461-14474.
222. Stephens G, O'Luanaigh N, Reilly D, et al. A sequence within the cytoplasmic tail of GpIIb independently activates platelet aggregation and thromboxane synthesis. *J Biol Chem*. 1998;273:20317-20322.

223. Clark EA, Shattil SJ, Ginsberg MH, Bolen J, Brugge JS. Regulation of the protein tyrosine kinase pp72syk by platelet agonists and the integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem.* 1994;269:28859-28864.
224. Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, Brugge JS. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J Cell Biol.* 1992;119:905-912.
225. Gao J, Zoller KE, Ginsberg MH, Brugge JS, Shattil SJ. Regulation of the pp72syk protein tyrosine kinase by platelet integrin alpha IIb beta 3. *Embo J.* 1997;16:6414-6425.
226. Shattil SJ, Haimovich B, Cunningham M, et al. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. *J Biol Chem.* 1994;269:14738-14745.
227. Miranti CK, Leng L, Maschberger P, Brugge JS, Shattil SJ. Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol.* 1998;8:1289-1299.
228. Shattil SJ. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost.* 1999;82:318-325.
229. Oberfell A, Judd BA, del Pozo MA, Schwartz MA, Koretzky GA, Shattil SJ. The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin alphaIIbbeta3 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 2001;276:5916-5923.
230. Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR. Outside-in integrin signal transduction. Alpha IIb beta 3-(GP IIb IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *J Biol Chem.* 1996;271:10811-10815.
231. Jenkins AL, Nannizzi-Alaimo L, Silver D, et al. Tyrosine phosphorylation of the beta3 cytoplasmic domain mediates integrin-cytoskeletal interactions. *J Biol Chem.* 1998;273:13878-13885.
232. Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J.* 1993;291 (Pt 2):329-343.
233. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature.* 1988;334:661-665.
234. Parker PJ, Kour G, Marais RM, et al. Protein kinase C--a family affair. *Mol Cell Endocrinol.* 1989;65:1-11.

235. Hubbard SR, Bishop WR, Kirschmeier P, George SJ, Cramer SP, Hendrickson WA. Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science*. 1991;254:1776-1779.
236. Hurley JH, Newton AC, Parker PJ, Blumberg PM, Nishizuka Y. Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci*. 1997;6:477-480.
237. Quest AF, Bloomenthal J, Bardes ES, Bell RM. The regulatory domain of protein kinase C coordinates four atoms of zinc. *J Biol Chem*. 1992;267:10193-10197.
238. Ono Y, Fujii T, Igarashi K, et al. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:4868-4871.
239. Kaibuchi K, Fukumoto Y, Oku N, Takai Y, Arai K, Muramatsu M. Molecular genetic analysis of the regulatory and catalytic domains of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1989;264:13489-13496.
240. Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier K. PKC ϵ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem*. 1994;269:6140-6148.
241. Quest AF, Bardes ES, Bell RM. A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. High affinity binding to a glutathione-S-transferase/Cys2 fusion protein. *J Biol Chem*. 1994;269:2953-2960.
242. Quest AF, Bell RM. The regulatory region of protein kinase C gamma. Studies of phorbol ester binding to individual and combined functional segments expressed as glutathione S-transferase fusion proteins indicate a complex mechanism of regulation by phospholipids, phorbol esters, and divalent cations. *J Biol Chem*. 1994;269:20000-20012.
243. Akita Y, Ohno S, Konno Y, Yano A, Suzuki K. Expression and properties of two distinct classes of the phorbol ester receptor family, four conventional protein kinase C types, and a novel protein kinase C. *J Biol Chem*. 1990;265:354-362.
244. Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:3099-3103.
245. Schaap D, Parker PJ, Bristol A, Kriz R, Knopf J. Unique substrate specificity and regulatory properties of PKC-epsilon: a rationale for diversity. *FEBS Lett*. 1989;243:351-357.

246. Luo JH, Kahn S, O'Driscoll K, Weinstein IB. The regulatory domain of protein kinase C beta 1 contains phosphatidylserine- and phorbol ester-dependent calcium binding activity. *J Biol Chem.* 1993;268:3715-3719.
247. Luo JH, Weinstein IB. Calcium-dependent activation of protein kinase C. The role of the C2 domain in divalent cation selectivity. *J Biol Chem.* 1993;268:23580-23584.
248. Parker PJ. Inhibition of protein kinase C--do we, can we, and should we? *Pharmacol Ther.* 1999;82:263-267.
249. Way KJ, Chou E, King GL. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:181-187.
250. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 1992;258:607-614.
251. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia.* 2001;44:659-673.
252. Poole AW, Pula G, Hers I, Crosby D, Jones ML. PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:528-535.
253. Jaken S, Parker PJ. Protein kinase C binding partners. *Bioessays.* 2000;22:245-254.
254. Moscat J, Diaz-Meco MT. The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep.* 2000;1:399-403.
255. Isakov N, Altman A. Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:761-794.
256. Schechtman D, Mochly-Rosen D. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene.* 2001;20:6339-6347.
257. Pearson RB, Kemp BE. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* 1991;200:62-81.
258. Kuo JF, Schatzman RC, Turner RS, Mazzei GJ. Phospholipid-sensitive Ca²⁺-dependent protein kinase: a major protein phosphorylation system. *Mol Cell Endocrinol.* 1984;35:65-73.
259. Nairn AC, Hemmings HC, Jr., Greengard P. Protein kinases in the brain. *Annu Rev Biochem.* 1985;54:931-976.

260. Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science*. 1984;225:1365-1370.
261. Bazzi MD, Nelsestuen GL. Constitutive activity of membrane-inserted protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;152:336-343.
262. Hannun YA, Bell RM. Phorbol ester binding and activation of protein kinase C on triton X-100 mixed micelles containing phosphatidylserine. *J Biol Chem*. 1986;261:9341-9347.
263. House C, Kemp BE. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science*. 1987;238:1726-1728.
264. Orr JW, Keranen LM, Newton AC. Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J Biol Chem*. 1992;267:15263-15266.
265. Pears CJ, Kour G, House C, Kemp BE, Parker PJ. Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur J Biochem*. 1990;194:89-94.
266. Kanzaki M, Mora S, Hwang JB, Saltiel AR, Pessin JE. Atypical protein kinase C (PKCzeta/lambda) is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *J Cell Biol*. 2004;164:279-290.
267. Begum N. Stimulation of protein phosphatase-1 activity by insulin in rat adipocytes. Evaluation of the role of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*. 1995;270:709-714.
268. Huang KP, Huang FL. How is protein kinase C activated in CNS. *Neurochem Int*. 1993;22:417-433.
269. Hannun YA, Loomis CR, Bell RM. Protein kinase C activation in mixed micelles. Mechanistic implications of phospholipid, diacylglycerol, and calcium interdependencies. *J Biol Chem*. 1986;261:7184-7190.
270. Liu JP, Powell KA, Sudhof TC, Robinson PJ. Dynamin I is a Ca(2+)-sensitive phospholipid-binding protein with very high affinity for protein kinase C. *J Biol Chem*. 1994;269:21043-21050.
271. Mosior M, Epand RM. Mechanism of activation of protein kinase C: roles of diolein and phosphatidylserine. *Biochemistry*. 1993;32:66-75.

272. Newton AC, Koshland DE, Jr. High cooperativity, specificity, and multiplicity in the protein kinase C-lipid interaction. *J Biol Chem.* 1989;264:14909-14915.
273. Bazzi MD, Nelsestuen GL. Protein kinase C interaction with calcium: a phospholipid-dependent process. *Biochemistry.* 1990;29:7624-7630.
274. Besterman JM, Duronio V, Cuatrecasas P. Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: a pathway for generation of a second messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:6785-6789.
275. Bocckino SB, Blackmore PF, Exton JH. Stimulation of 1,2-diacylglycerol accumulation in hepatocytes by vasopressin, epinephrine, and angiotensin II. *J Biol Chem.* 1985;260:14201-14207.
276. Irving HR, Exton JH. Phosphatidylcholine breakdown in rat liver plasma membranes. Roles of guanine nucleotides and P2-purinergic agonists. *J Biol Chem.* 1987;262:3440-3443.
277. Kishimoto A, Takai Y, Mori T, Kikkawa U, Nishizuka Y. Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem.* 1980;255:2273-2276.
278. Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science.* 1986;233:305-312.
279. Bronfman M, Morales MN, Orellana A. Diacylglycerol activation of protein kinase C is modulated by long-chain acyl-CoA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;152:987-992.
280. Chen SG, Murakami K. Synergistic activation of type III protein kinase C by cis-fatty acid and diacylglycerol. *Biochem J.* 1992;282 (Pt 1):33-39.
281. Verkest V, McArthur M, Hamilton S. Fatty acid activation of protein kinase C: dependence on diacylglycerol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;152:825-829.
282. Khan WA, Blobe GC, Richards AL, Hannun YA. Identification, partial purification, and characterization of a novel phospholipid-dependent and fatty acid-activated protein kinase from human platelets. *J Biol Chem.* 1994;269:9729-9735.
283. Burns DJ, Bloomenthal J, Lee MH, Bell RM. Expression of the alpha, beta II, and gamma protein kinase C isozymes in the baculovirus-insect cell expression system. Purification and characterization of the individual isoforms. *J Biol Chem.* 1990;265:12044-12051.

284. Naor Z, Shearman MS, Kishimoto A, Nishizuka Y. Calcium-independent activation of hypothalamic type I protein kinase C by unsaturated fatty acids. *Mol Endocrinol*. 1988;2:1043-1048.
285. Sekiguchi K, Tsukuda M, Ase K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Mode of activation and kinetic properties of three distinct forms of protein kinase C from rat brain. *J Biochem (Tokyo)*. 1988;103:759-765.
286. Brooks G. The role of 80K/MARCKS, a specific substrate of protein kinase C, in cell growth and tumour progression. *Pigment Cell Res*. 1994;7:451-457.
287. Asaoka Y, Yoshida K, Sasaki Y, Nishizuka Y. Potential role of phospholipase A2 in HL-60 cell differentiation to macrophages induced by protein kinase C activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:4917-4921.
288. Sasaki Y, Asaoka Y, Nishizuka Y. Potentiation of diacylglycerol-induced activation of protein kinase C by lysophospholipids. Subspecies difference. *FEBS Lett*. 1993;320:47-51.
289. Cazaubon SM, Parker PJ. Identification of the phosphorylated region responsible for the permissive activation of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1993;268:17559-17563.
290. Ron D, Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *Faseb J*. 1999;13:1658-1676.
291. Orr JW, Newton AC. Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1994;269:27715-27718.
292. Taylor SS, Radzio-Andzelm E. Three protein kinase structures define a common motif. *Structure*. 1994;2:345-355.
293. Orr JW, Newton AC. Intrapeptide regulation of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1994;269:8383-8387.
294. Cazaubon S, Bornancin F, Parker PJ. Threonine-497 is a critical site for permissive activation of protein kinase C alpha. *Biochem J*. 1994;301 (Pt 2):443-448.
295. Kraft AS, Anderson WB. Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature*. 1983;301:621-623.
296. McFadden PN, Mandpe A, Koshland DE, Jr. Calcium- and lipid-independent protein kinase C autophosphorylation. Activation by low pH. *J Biol Chem*. 1989;264:12765-12771.

297. O'Flaherty JT, Jacobson DP, Redman JF, Rossi AG. Translocation of protein kinase C in human polymorphonuclear neutrophils. Regulation by cytosolic Ca²⁺(+)-independent and Ca²⁺(+)-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 1990;265:9146-9152.
298. Liu JP, Engler D, Funder JW, Robinson PJ. Evidence that the stimulation by arginine vasopressin of the release of adrenocorticotropin from the ovine anterior pituitary involves the activation of protein kinase C. *Mol Cell Endocrinol.* 1992;87:35-47.
299. Liu JP, Engler D, Funder JW, Robinson PJ. Arginine vasopressin (AVP) causes the reversible phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein in the ovine anterior pituitary: evidence that MARCKS phosphorylation is associated with adrenocorticotropin (ACTH) secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;101:247-256.
300. Hannun YA, Bell RM. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science.* 1989;243:500-507.
301. Seifert R, Schachtele C, Rosenthal W, Schultz G. Activation of protein kinase C by cis- and trans-fatty acids and its potentiation by diacylglycerol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;154:20-26.
302. Wolf M, LeVine H, 3rd, May WS, Jr., Cuatrecasas P, Sahyoun N. A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca²⁺ and phorbol esters. *Nature.* 1985;317:546-549.
303. Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J, Smith BL. Intracellular receptors for activated protein kinase C. Identification of a binding site for the enzyme. *J Biol Chem.* 1991;266:14866-14868.
304. Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:839-843.
305. Toker A, Sellers LA, Amess B, Patel Y, Harris A, Aitken A. Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1/14-3-3) from sheep brain. Amino acid sequence of phosphorylated forms. *Eur J Biochem.* 1992;206:453-461.
306. James G, Olson E. Deletion of the regulatory domain of protein kinase C alpha exposes regions in the hinge and catalytic domains that mediate nuclear targeting. *J Cell Biol.* 1992;116:863-874.
307. Abdel-Ghany M, el-Gendy K, Zhang S, Raden D, Racker E. Brain protein kinase C phosphorylating poly(arginine,serine) or lamin B is stimulated by anions and by

- an activator purified from bovine serum albumin preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:1761-1765.
308. Goss VL, Hocevar BA, Thompson LJ, Stratton CA, Burns DJ, Fields AP. Identification of nuclear beta II protein kinase C as a mitotic lamin kinase. *J Biol Chem*. 1994;269:19074-19080.
 309. Hocevar BA, Burns DJ, Fields AP. Identification of protein kinase C (PKC) phosphorylation sites on human lamin B. Potential role of PKC in nuclear lamina structural dynamics. *J Biol Chem*. 1993;268:7545-7552.
 310. Hornbeck P, Huang KP, Paul WE. Lamin B is rapidly phosphorylated in lymphocytes after activation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:2279-2283.
 311. Coussens L, Parker PJ, Rhee L, et al. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science*. 1986;233:859-866.
 312. Kemp BE, Pearson RB, House C, Robinson PJ, Means AR. Regulation of protein kinases by pseudosubstrate prototopes. *Cell Signal*. 1989;1:303-311.
 313. Parker PJ, Coussens L, Totty N, et al. The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor. *Science*. 1986;233:853-859.
 314. Hardie G. Pseudosubstrates turn off protein kinases. *Nature*. 1988;335:592-593.
 315. Drummond AH. Bidirectional control of cytosolic free calcium by thyrotropin-releasing hormone in pituitary cells. *Nature*. 1985;315:752-755.
 316. Hepler JR, Earp HS, Harden TK. Long-term phorbol ester treatment down-regulates protein kinase C and sensitizes the phosphoinositide signaling pathway to hormone and growth factor stimulation. Evidence for a role of protein kinase C in agonist-induced desensitization. *J Biol Chem*. 1988;263:7610-7619.
 317. Orellana S, Solski PA, Brown JH. Guanosine 5'-O-(thiotriphosphate)-dependent inositol trisphosphate formation in membranes is inhibited by phorbol ester and protein kinase C. *J Biol Chem*. 1987;262:1638-1643.
 318. Rhee SG, Choi KD. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem*. 1992;267:12393-12396.
 319. Woods NM, Cuthbertson KS, Cobbold PH. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature*. 1986;319:600-602.

320. Bird GS, Rossier MF, Obie JF, Putney JW, Jr. Sinusoidal oscillations in intracellular calcium requiring negative feedback by protein kinase C. *J Biol Chem.* 1993;268:8425-8428.
321. Park DJ, Min HK, Rhee SG. Inhibition of CD3-linked phospholipase C by phorbol ester and by cAMP is associated with decreased phosphotyrosine and increased phosphoserine contents of PLC-gamma 1. *J Biol Chem.* 1992;267:1496-1501.
322. Sanchez-Bueno A, Dixon CJ, Woods NM, Cuthbertson KS, Cobbold PH. Inhibitors of protein kinase C prolong the falling phase of each free-calcium transient in a hormone-stimulated hepatocyte. *Biochem J.* 1990;268:627-632.
323. Ha KS, Exton JH. Differential translocation of protein kinase C isozymes by thrombin and platelet-derived growth factor. A possible function for phosphatidylcholine-derived diacylglycerol. *J Biol Chem.* 1993;268:10534-10539.
324. Bocckino SB, Blackmore PF, Wilson PB, Exton JH. Phosphatidate accumulation in hormone-treated hepatocytes via a phospholipase D mechanism. *J Biol Chem.* 1987;262:15309-15315.
325. Huang CF, Cabot MC. Vasopressin-induced polyphosphoinositide and phosphatidylcholine degradation in fibroblasts. Temporal relationship for formation of phospholipase C and phospholipase D hydrolysis products. *J Biol Chem.* 1990;265:17468-17473.
326. Lissovitch M. Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases. *Trends Biochem Sci.* 1992;17:393-399.
327. Kishimoto A, Mikawa K, Hashimoto K, et al. Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J Biol Chem.* 1989;264:4088-4092.
328. Akita Y, Ohno S, Yajima Y, Suzuki K. Possible role of Ca²⁺(+)-independent protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, in thyrotropin-releasing hormone-stimulated signal transduction: differential down-regulation of nPKC epsilon in GH4C1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;172:184-189.
329. Kiley SC, Parker PJ, Fabbro D, Jaken S. Differential regulation of protein kinase C isozymes by thyrotropin-releasing hormone in GH4C1 cells. *J Biol Chem.* 1991;266:23761-23768.
330. Olivier AR, Parker PJ. Bombesin, platelet-derived growth factor, and diacylglycerol induce selective membrane association and down-regulation of protein kinase C isotypes in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem.* 1994;269:2758-2763.

331. Collins MK, Rozengurt E. Homologous and heterologous mitogenic desensitization of Swiss 3T3 cells to phorbol esters and vasopressin: role of receptor and postreceptor steps. *J Cell Physiol.* 1984;118:133-142.
332. Melloni E, Pontremoli S, Michetti M, Sacco O, Sparatore B, Horecker BL. The involvement of calpain in the activation of protein kinase C in neutrophils stimulated by phorbol myristic acid. *J Biol Chem.* 1986;261:4101-4105.
333. Fraser ED, Walsh MP. The major endogenous bovine brain protein kinase C inhibitor is a heat-labile protein. *FEBS Lett.* 1991;294:285-289.
334. Pearson JD, DeWald DB, Mathews WR, et al. Amino acid sequence and characterization of a protein inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem.* 1990;265:4583-4591.
335. Toker A, Ellis CA, Sellers LA, Aitken A. Protein kinase C inhibitor proteins. Purification from sheep brain and sequence similarity to lipocortins and 14-3-3 protein. *Eur J Biochem.* 1990;191:421-429.
336. Robinson K, Jones D, Patel Y, et al. Mechanism of inhibition of protein kinase C by 14-3-3 isoforms. 14-3-3 isoforms do not have phospholipase A2 activity. *Biochem J.* 1994;299 (Pt 3):853-861.
337. Kolch W, Heidecker G, Kochs G, et al. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature.* 1993;364:249-252.
338. Mauro A, Ciccarelli C, De Cesaris P, et al. PKCalpha-mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells. *J Cell Sci.* 2002;115:3587-3599.
339. Formisano P, Oriente F, Fiory F, et al. Insulin-activated protein kinase Cbeta bypasses Ras and stimulates mitogen-activated protein kinase activity and cell proliferation in muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2000;20:6323-6333.
340. Ni CW, Wang DL, Lien SC, Cheng JJ, Chao YJ, Hsieh HJ. Activation of PKC-epsilon and ERK1/2 participates in shear-induced endothelial MCP-1 expression that is repressed by nitric oxide. *J Cell Physiol.* 2003;195:428-434.
341. Brodie C, Blumberg PM. Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. *Apoptosis.* 2003;8:19-27.
342. Li L, Lorenzo PS, Bogi K, Blumberg PM, Yuspa SH. Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol Cell Biol.* 1999;19:8547-8558.

343. Majumder PK, Pandey P, Sun X, et al. Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem.* 2000;275:21793-21796.
344. Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem.* 1996;271:23512-23519.
345. Paruchuri S, Hallberg B, Juhas M, Larsson C, Sjolander A. Leukotriene D(4) activates MAPK through a Ras-independent but PKCepsilon-dependent pathway in intestinal epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002;115:1883-1893.
346. Ping P, Zhang J, Cao X, et al. PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits. *Am J Physiol.* 1999;276:H1468-1481.
347. Punj A, Mockridge JW, Farooqui S, Marber MS, Heads RJ. Sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase during recovery from simulated ischaemia mediates adaptive cytoprotection in cardiomyocytes. *Biochem J.* 2000;350 Pt 3:891-899.
348. Chen N, Ma W, Huang C, Dong Z. Translocation of protein kinase Cepsilon and protein kinase Cdelta to membrane is required for ultraviolet B-induced activation of mitogen-activated protein kinases and apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274:15389-15394.
349. Yang C, Kazanietz MG. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:602-608.
350. Saijo K, Mecklenbrauker I, Santana A, Leitger M, Schmedt C, Tarakhovsky A. Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the I kappaB kinase alpha. *J Exp Med.* 2002;195:1647-1652.
351. Su TT, Guo B, Kawakami Y, et al. PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nat Immunol.* 2002;3:780-786.
352. Baier-Bitterlich G, Uberall F, Bauer B, et al. Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol Cell Biol.* 1996;16:1842-1850.
353. Coudronniere N, Villalba M, Englund N, Altman A. NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:3394-3399.

354. Lin X, O'Mahony A, Mu Y, Geleziunas R, Greene WC. Protein kinase C-theta participates in NF-kappaB activation induced by CD3-CD28 costimulation through selective activation of IkappaB kinase beta. *Mol Cell Biol.* 2000;20:2933-2940.
355. Denning MF, Wang Y, Tibudan S, Alkan S, Nickoloff BJ, Qin JZ. Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell Death Differ.* 2002;9:40-52.
356. Garcia-Fernandez LF, Losada A, Alcaide V, et al. Aplidin induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C delta. *Oncogene.* 2002;21:7533-7544.
357. Yoshida K, Wang HG, Miki Y, Kufe D. Protein kinase Cdelta is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9. *Embo J.* 2003;22:1431-1441.
358. Mecklenbrauker I, Saijo K, Zheng NY, Leitges M, Tarakhovsky A. Protein kinase Cdelta controls self-antigen-induced B-cell tolerance. *Nature.* 2002;416:860-865.
359. Keshamouni VG, Mattingly RR, Reddy KB. Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC-delta. *J Biol Chem.* 2002;277:22558-22565.
360. Clark AS, West KA, Blumberg PM, Dennis PA. Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells: PKCdelta promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res.* 2003;63:780-786.
361. Baldassare JJ, Henderson PA, Burns D, Loomis C, Fisher GJ. Translocation of protein kinase C isozymes in thrombin-stimulated human platelets. Correlation with 1,2-diacylglycerol levels. *J Biol Chem.* 1992;267:15585-15590.
362. Crabos M, Imber R, Woodtli T, Fabbro D, Erne P. Different translocation of three distinct PKC isoforms with tumor-promoting phorbol ester in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;178:878-883.
363. Grabarek J, Raychowdhury M, Ravid K, Kent KC, Newman PJ, Ware JA. Identification and functional characterization of protein kinase C isozymes in platelets and HEL cells. *J Biol Chem.* 1992;267:10011-10017.
364. Khan WA, Blobel G, Halpern A, et al. Selective regulation of protein kinase C isoenzymes by oleic acid in human platelets. *J Biol Chem.* 1993;268:5063-5068.
365. Wang F, Naik UP, Ehrlich YH, et al. A new protein kinase C, nPKC eta', and nPKC theta are expressed in human platelets: involvement of nPKC eta' and

- nPKC theta in signal transduction stimulated by PAF. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;191:240-246.
366. Bennett JS. Novel platelet inhibitors. *Annu Rev Med.* 2001;52:161-184.
 367. Polanowska-Grabowska R, Gear AR. Activation of protein kinase C is required for the stable attachment of adherent platelets to collagen but is not needed for the initial rapid adhesion under flow conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:3044-3054.
 368. Giuliano S, Nesbitt WS, Rooney M, Jackson SP. Bidirectional integrin α IIb β 3 signalling regulating platelet adhesion under flow: contribution of protein kinase C. *Biochem J.* 2003;372:163-172.
 369. Nesbitt WS, Kulkarni S, Giuliano S, et al. Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin α IIb β 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. *J Biol Chem.* 2002;277:2965-2972.
 370. Walker TR, Watson SP. Synergy between Ca^{2+} and protein kinase C is the major factor in determining the level of secretion from human platelets. *Biochem J.* 1993;289 (Pt 1):277-282.
 371. Halenda SP, Banga HS, Zavoico GB, Lau LF, Feinstein MB. Synergistic release of arachidonic acid from platelets by activators of protein kinase C and Ca^{2+} ionophores. Evidence for the role of protein phosphorylation in the activation of phospholipase A2 and independence from the $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger. *Biochemistry.* 1989;28:7356-7363.
 372. White JG, Rao GH, Estensen RD. Investigation of the release reaction in platelets exposed to phorbol myristate acetate. *Am J Pathol.* 1974;75:301-314.
 373. Zucker MB, Troll W, Belman S. The tumor-promoter phorbol ester (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate), a potent aggregating agent for blood platelets. *J Cell Biol.* 1974;60:325-336.
 374. Geanacopoulos M, Turner J, Bowling KE, Vandenberg SR, Gear AR. The role of protein kinase C in the initial events of platelet activation by thrombin assessed with a selective inhibitor. *Thromb Res.* 1993;69:113-124.
 375. Gerrard JM, Beattie LL, Park J, et al. A role for protein kinase C in the membrane fusion necessary for platelet granule secretion. *Blood.* 1989;74:2405-2413.
 376. Knight DE, Niggli V, Scrutton MC. Thrombin and activators of protein kinase C modulate secretory responses of permeabilised human platelets induced by Ca^{2+} . *Eur J Biochem.* 1984;143:437-446.

377. Werner MH, Senzel L, Bielawska A, Khan W, Hannun YA. Diacylglycerol overcomes aspirin inhibition of platelets: evidence for a necessary role for diacylglycerol accumulation in platelet activation. *Mol Pharmacol*. 1991;39:547-556.
378. Toullec D, Pianetti P, Coste H, et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1991;266:15771-15781.
379. Watson SP, McNally J, Shipman LJ, Godfrey PP. The action of the protein kinase C inhibitor, staurosporine, on human platelets. Evidence against a regulatory role for protein kinase C in the formation of inositol trisphosphate by thrombin. *Biochem J*. 1988;249:345-350.
380. Siess W, Lapetina EG. Ca²⁺ mobilization primes protein kinase C in human platelets. Ca²⁺ and phorbol esters stimulate platelet aggregation and secretion synergistically through protein kinase C. *Biochem J*. 1988;255:309-318.
381. Kaibuchi K, Takai Y, Sawamura M, Hoshijima M, Fujikura T, Nishizuka Y. Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *J Biol Chem*. 1983;258:6701-6704.
382. Shattil SJ, Brass LF. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem*. 1987;262:992-1000.
383. Coughlin SR. Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost*. 2001;86:298-307.
384. Pula G, Crosby D, Baker J, Poole AW. Functional interaction of protein kinase Calpha with the tyrosine kinases Syk and Src in human platelets. *J Biol Chem*. 2005;280:7194-7205.
385. Caron A, Theoret JF, Mousa SA, Merhi Y. Anti-platelet effects of GPIIb/IIIa and P-selectin antagonism, platelet activation, and binding to neutrophils. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;40:296-306.
386. Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*. 2000;404:609-613.
387. Moussazadeh M, Haimovich B. Protein kinase C-delta activation and tyrosine phosphorylation in platelets. *FEBS Lett*. 1998;438:225-230.
388. Papkoff J, Chen RH, Blenis J, Forsman J. p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during

- thrombin-induced platelet activation and aggregation. *Mol Cell Biol.* 1994;14:463-472.
389. Saklatvala J, Rawlinson L, Waller RJ, et al. Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *J Biol Chem.* 1996;271:6586-6589.
390. Nadal-Wollbold F, Pawlowski M, Levy-Toledano S, Berrou E, Rosa JP, Bryckaert M. Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or B-Raf. *FEBS Lett.* 2002;531:475-482.
391. McNicol A, Philpott CL, Shibou TS, Israels SJ. Effects of the mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase inhibitor 2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one (PD98059) on human platelet activation. *Biochem Pharmacol.* 1998;55:1759-1767.
392. Theoret JF, Bienvenu JG, Kumar A, Merhi Y. P-selectin antagonism with recombinant p-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;298:658-664.

