

Université de Montréal

Effets de l'Aspirine sur la fonction de l'axe CD40L/CD40 dans les plaquettes

par Mira Mohsen

Programme de Sciences Biomédicales / Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du
grade de M.Sc. en sciences biomédicales
Option Médecine Expérimentale

Avril, 2019

© Mira Mohsen, 2019

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé :

Effets de l'Aspirine sur la fonction de l'axe CD40L/CD40 dans les plaquettes

Présenté par :
Mira Mohsen

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Eric Thorin..... Président rapporteur
Dr Yahye Merhi Directeur de recherche
Dr Arnaud Bonnefoy.....Membre du jury

Résumé

Le traitement antiplaquettaire à l'aspirine (ASA) est moins efficace chez certains patients coronariens, ce qui augmente leur risque de développer une thrombose. Des taux sanguins élevés de médiateurs thrombo-inflammatoires, tels que le sCD40L, peuvent expliquer de telles variabilités. Nous avons émis l'hypothèse que, en présence de taux élevés de sCD40L, l'efficacité de l'ASA peut être réduite. Ainsi, nous avons visé à déterminer les effets de l'ASA sur la signalisation et l'agrégation des plaquettes en présence de sCD40L.

Les effets de l'ASA sur les plaquettes humaines traitées par le sCD40L, en réponse à des concentrations sub-optimales de collagène ou de thrombine, ont été évalués sur l'agrégation, la sécrétion de thromboxane A₂ (TxA₂) et la phosphorylation de la p38- « *Mitogen-activated protein kinase* » (MAPK), le facteur nucléaire-κB (NF-κB), la kinase activée par le TGF-β 1 (TAK-1) et la chaîne légère de la myosine (MLC). Le sCD40L a significativement augmenté la sécrétion de TxA₂ dans les plaquettes, en réponse à des doses sub-optimales de collagène et de thrombine, ce qui a été inversé par l'ASA. L'ASA n'a pas inhibé la phosphorylation de p38-MAPK, NF-κB, TAK-1, que ce soit avec une stimulation par le sCD40L seul ou en présence des agonistes plaquettaires. Cependant, Le sCD40L a potentialisé l'agrégation plaquettaire, un effet complètement inversé et partiellement réduit par l'ASA en réponse au collagène et à la thrombine, respectivement. Les effets de l'ASA sur les plaquettes traitées par le sCD40L et stimulées par le collagène étaient liés à l'inhibition du changement de forme des plaquettes et la phosphorylation de la MLC.

L'ASA n'affecte pas la signalisation du sCD40L dans les plaquettes, mais empêche son effet sur la sécrétion de TxA₂ et l'agrégation plaquettaire en réponse au collagène, via un mécanisme impliquant l'inhibition de la MLC. Le ciblage de l'axe sCD40L dans les plaquettes peut

avoir un potentiel thérapeutique chez les patients, présentant des taux élevés de sCD40L, qui ne répondent pas ou moins à l'ASA.

Mots-clés : Plaquettes, ASA, CD40L, TxA₂, signalisation, agrégation

Abstract

Antiplatelet therapy with Aspirin (ASA) is less efficient in some coronary patients, which increases their risk of developing thrombosis. Elevated blood levels of thrombo-inflammatory mediators, like sCD40L, may explain such variabilities. We hypothesized that in the presence of elevated levels of sCD40L, the efficacy of ASA may be reduced. Accordingly, this study was designed to determine the effects of ASA on sCD40L signalling and aggregation of platelets.

The effects of ASA on sCD40L-treated human platelets, in response to suboptimal concentrations of collagen or thrombin, were assessed on aggregation, thromboxane A₂ (TxA₂) secretion, and phosphorylation of p38-MAPK, NF-κB, TGF-β-activated kinase 1 (TAK-1), and myosin light chain (MLC). sCD40L significantly elevated TxA₂ secretion in platelets, in response to suboptimal doses of collagen and thrombin, which was reversed by ASA. ASA did not inhibit phosphorylation of p38-MAPK, NF-κB, TAK-1, either with sCD40L stimulation alone or with platelet agonists. However, sCD40L potentiated platelet aggregation, an effect completely reversed and partially reduced by ASA in response to collagen and thrombin, respectively. The effects of ASA in sCD40L-treated platelets with collagen were related to inhibition of platelet shape change and MLC phosphorylation.

ASA does not affect platelet sCD40L signalling, but prevents its effect on TxA₂ secretion and platelet aggregation in response to collagen, via a mechanism implying inhibition of MLC. Targeting sCD40L axis in platelets may have therapeutic potential in patients with elevated levels of sCD40L that are none or less responding to ASA.

Key words: Platelets, ASA, CD40L, TxA₂, signaling, aggregation

Table des matières

Membres du jury	i
Résumé	ii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiv
Chapitre 1 : Les Plaquettes	1-21
1.1 Introduction	2
1.2 Origine et Structure des plaquettes.....	2
1.2.1 Origine des plaquettes	2
1.2.2 Structure des plaquettes	4
1.2.2.1 La zone périphérique	4
1.2.2.2 La zone sol-gel	5
1.2.2.3 Le système membranaire	6
1.2.2.4 La zone d'organelles	6
1.3 La fonction hémostatique des plaquettes	8
1.3.1 L'adhésion plaquettaire	10
1.3.2 L'activation des plaquettes	13
1.3.2.1 Les voies de signalisation via les tyrosines kinases	13
1.3.2.2 La signalisation via les récepteurs couplés aux protéines G	15
1.3.2.3 L'activation « <i>inside-out</i> » de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	17
1.3.3 L'agrégation plaquettaire.....	18
1.4 Implication des plaquettes dans la thrombose	19
1.5 Rôle des plaquettes dans les maladies inflammatoires (l'athérosclérose)	21

Chapitre 2 : Le CD40 Ligand.....	22-32
2.1 Introduction	23
2.2 L'expression du CD40L et sa configuration	23
2.3 Les récepteurs du CD40L.....	24
2.3.1 Mac-1	25
2.3.2 $\alpha 5\beta 1$	26
2.3.3 $\alpha II\beta 3$	27
2.3.4 CD40	27
2.4 Le rôle physiologique et pathologique du CD40 Ligand	28
2.4.1 Le rôle physiologique de l'axe CD40L/CD40	28
2.4.2 L'axe CD40L-CD40 dans l'athérosclérose	30
2.4.2.1 Le rôle de l'axe CD40L/CD40 dans l'initiation de la plaque	30
2.4.2.2 Le rôle de l'axe CD40L/CD40 dans la progression de la plaque	31
2.3.2.3 Le rôle de l'axe CD40L/CD40 dans la rupture de la plaque	32
 Chapitre 3 :Le CD40L plaquettaire	 33-39
3.1 Introduction	34
3.2 Le CD40L plaquettaire	34
3.3 Les récepteurs plaquettaire du CD40L	35
3.4 Le clivage du CD40L à partir de la surface plaquettaire	35
3.5 La signalisation du CD40L dans les plaquettes.....	36
3.5.1 Signalisation à travers $\alpha II\beta 3$	36
3.5.2 Signalisation à travers CD40	37
3.5.3 Signalisation à travers $\alpha 5\beta 1$	38
3.6 Effets inflammatoires et immunitaires de la signalisation de l'axe CD40L/CD40 des plaquettes	38
 Chapitre 4: Les Antiplaquettaire.....	 40-52

4.1 Introduction	41
4.2 L'aspirine	42
4.2.1 Histoire et définition	42
4.2.2 La pharmacocinétique et la pharmacodynamie de l'ASA	43
4.3 La résistance à l'aspirine	45
4.4.1 Polymorphisme de la COX-1	46
4.4.2 La régénération de la Cox-1 plaquettaire	46
4.4.2.1 La synthèse De novo de la Cox-1	46
4.4.2.2 Renouvellement rapide des plaquettes	46
4.4.3 La production de TxA2 indépendamment de la Cox-1	47
4.4.3.1 La COX-2	47
4.4.3.2 La production du thromboxane A2 plaquettaire indépendamment de la cyclooxygénase	47
4.4.4 Le TxA2 non-plaquettaire	47
4.4.5 L'interaction médicamenteuse	48
4.5 Les amorceurs des plaquettes	49
4.5.1 Gas6	49
4.5.2 Métallo-protéinase matricielle -2	50
4.5.3 Leptine	51
4.5.4 Prostaglandine E2 (PGE2)	51
4.5.5 Lipoprotéines de basse densité (LDL)	52
4.5.6 Le CD40L soluble	52
Chapitre 5 : Projet de recherche	53-90
5.1 Problématique	54
5.2 Hypothèse et Objectifs	56
5.3 Contribution scientifique	56
5.3.1 Résumé de l'article	56

5.3.2 Contributions des auteurs	57
5.3.3 <i>Aspirin reduces the potentiating effect of CD40L on platelet aggregation via inhibition of myosin light chain</i>	59
5.5 Discussion	85
5.6 Conclusion	88
5.7 Perspectives	89
Bibliographies	92-107

Liste des figures

Chapitre 1:

- Figure 1.1: Les étapes de la production des plaquettes à partir des MKs. 4
- Figure 1.2: Schéma qui résume les récepteurs plaquettaires ainsi que les voies de signalisation principales impliquées dans la fonction hémostatique des plaquettes. 9
- Figure 1.3: Schéma représentant les récepteurs plaquettaires et leurs agonistes impliqués dans la signalisation via les tyrosines kinases. 14
- Figure 1.4: Les voies de signalisation des récepteurs PARs et TP dans les plaquettes. 16
- Figure 1.5: La voie d'activation « inside-out » de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et son changement de configuration de sa forme inactive en sa forme active suite à l'activation plaquettaire. 18

Chapitre 2:

- Figure 2.1: Les quatre différents types de récepteurs du CD40L et leurs voies de signalisation subséquentes. 25

Chapitre 4:

- Figure 4.1: Schéma représentant les différentes classes d'antiplaquettaires et leur mode d'action. 42
- Figure 4.2: Le métabolisme de l'ASA. 44

Chapitre 5:

- Figure 1: *ASA inhibits sCD40L induced Thromboxane B2 formation in platelets in response to a suboptimal dose of agonists.* 76
- Figure 2: *ASA does not affect NF- κ B activation by sCD40L.* 78
- Figure 3: *ASA does not affect p38-MAPK activation by sCD40L.* 79
- Figure 4: *ASA does not affect TAK1 activation by sCD40L.* 80
- Figure 5: *Effects of sCD40L and ASA on platelet aggregation in response to suboptimal doses of agonists.* 81
- Figure 6: *Effect of Latrunculin on the potentiating action of sCD40L on platelet aggregation.* ... 82
- Figure 7: *Latrunculin has no effect on CD40L signaling.* 83

Figure 8: *ASA inhibits MLC phosphorylation of platelets stimulated with collagen but not thrombin.* 84

Liste des abréviations

AA : Acides Aminés (*Amino Acids*)

AC: Adényl cyclase (*Adenyl cyclase*)

Ac : Anti-corps

ACS: Syndrome Coronarien Aiguë (*Acute Coronary Syndrome*)

ADAM: *A disintegrin and metalloproteinase*

ADP: Adénosine Diphosphate

APCs : Cellules Présentatrices d'Antigènes (*Antigen presenting cells*)

AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux

Ca²⁺: l'ion Calcium

CD40L : *Cluster of Differentiation 40 Ligand*

CEs : Cellules Endothéliales

CMLs : Cellules Musculaires Lisses

COX : Cyclooxygénase

DAG: Diacylglycérol

DCs : Cellules Dendritiques (*Dendritiques Cells*)

DTS : Système Tubulaire Dense (*Dense Tubular System*)

ERK : *Extracellular signal Regulated kinases*

Gas6 : Gène de l'arrêt de croissance 6 (*Growth arrest-specific gene 6*)

GCs : Centres Germinatifs (*Germinal Centers*)

GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G (*G-Protein Coupled Receptors*)

ICAM-1 : *Intercellular adhesion molecule 1*

IL-1 β : Interleukine-1 β

IP3: Triphosphoinositol (*Inositol trisphosphate*)

I κ B : Inhibiteur du NF- κ B (*NF- κ B inhibitor*)

KGD : la séquence *Lysine-Glycine-Aspartate*

LDL : Lipoprotéine de basse densité (*Low Density Lipoprotein*)

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MCP : *Monocyte Chemoattractant Protein 1*

MI : Infarctus du myocarde (*Myocardial infarction*)

MKs: Mégacaryocytes

MMPs : Métalloprotéinases matricielles (*Matrix Metalloproteinases*)

MPs : Microparticules

NF- κ B: Facteur nucléaire- κ B (*Nuclear Factor- κ B*)

NSAIDs : Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens (*Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*)

PAR : *Protease-activated receptor*

PCI : Interventions Coronariennes Percutanées (*Percutaneous Coronary Interventions*)

PGE2: Prostaglandine E2

PKC: Protéine Kinase C

PLC γ 2: Phospholipase C gamma-2

PSGL-1 : *P-selectin glycoprotein ligand-1*

PtdSer: Phosphatidylsérine

Rac-1: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RGD : la séquence *Arginine-Glycine-Aspartate*

sCD40L: CD40L soluble (*soluble CD40L*)

SNAP-23: *Synaptosomal-associated protein 23*

TFH : Cellules T folliculaires (*Follicular B helper T cells*)

TNF : Facteur de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor*)

TP : Récepteur de la thromboxane (*Thromboxane Prostanoid receptor*)

TRAF : Facteurs associés au récepteur du TNF (*TNF Receptor Associated Factor*)

TXA₂: Thromboxane A₂

TXB₂: Thromboxane B₂

UL-VWF : *Ultra large- Von Willbrand Factor*

VWF: Facteur Von Willebrand (*Von Willebrand Factor*)

Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener ce mémoire à son terme.

J'adresse mes remerciements tout d'abord à mon directeur de recherche, le Dr Yahye Merhi, pour m'avoir encadré tout au long de ce projet et m'avoir fait partager ses brillantes intuitions. Je tiens également à le remercier pour m'avoir offert une solide formation scientifique et pour son soutien et sa patience au cours de l'élaboration de ce mémoire. C'est à ses côtés que j'ai compris ce que rigueur et précision voulaient dire.

J'exprime ma gratitude également au support inconditionnel de mes collègues et pour avoir créé un bel environnement de travail pendant ces deux années passées avec eux. M. Kojok, merci pour m'avoir insufflé ton sens de l'observation et de l'analyse critique ainsi que d'avoir pris le temps pour m'écouter et discuter avec moi. Vos remarques m'ont permis d'envisager mon travail sous un autre angle. Je vous souhaite le meilleur des succès dans la poursuite de vos études.

Je désire surtout dédier une attention particulière au personnel de l'équipe du Centre de prélèvements de l'Institut de Cardiologie de Montréal, ainsi qu'aux donateurs de sang et collaborateurs sans lesquels je n'aurai pu réaliser ce merveilleux travail scientifique.

À toutes et à tous un grand Merci !

Chapitre 1 :
« Les Plaquettes »

1.1 Introduction :

Malgré le développement des mesures préventives et des nouvelles technologies et appareils de diagnostic, les maladies cardiovasculaires demeurent la cause principale de mortalité à travers le monde. Celles-ci ont représenté 30% de l'ensemble des décès en 2012. L'organisme mondial de la santé a rapporté environ 17,5 millions de décès causés par des cardiopathies coronariennes et des accidents vasculaires cérébraux (AVC). Vers l'an 2030, on estime que les maladies cardiovasculaires entraîneront environ 23,6 millions de décès [1]. Ces maladies cardiovasculaires sont principalement causées par des événements thrombotiques. Les dommages et l'extravasation du système vasculaire se produisent généralement tout au long de la vie. L'hémostase est le processus qui maintient la régulation de l'intégrité vasculaire et du débit sanguin. Cependant, l'hémostase normale peut être perturbée par des facteurs pathologiques, entraînant une formation incontrôlée de caillots et une occlusion des vaisseaux dans les artères ou les veines. Les plaquettes, ainsi que les cellules endothéliales (CEs) et les facteurs de coagulation, sont des médiateurs essentiels de l'hémostase et de la thrombose vasculaires. À cet égard, les plaquettes se sont révélées des candidats intéressants dans l'étude des maladies cardiovasculaires. Ce chapitre mettra en contexte l'origine et la physiologie des plaquettes ainsi que leurs implications dans les processus physiologiques et pathologiques.

1.2 Origine et Structure des plaquettes:

Les nouvelles techniques d'imagerie ainsi que les études *in vitro* et *in vivo* ont abouti à une compréhension plus élaborée de l'origine, la structure des plaquettes, leur sécrétion, leur adhésion et leur activation, fournissant ainsi la base de la connaissance d'aujourd'hui sur leur rôle physiologique et pathologique. Néanmoins, il reste encore de nombreuses lacunes qui peuvent être des cibles prometteuses à explorer. Ainsi, les futures recherches scientifiques se focalisent sur l'étude des plaquettes dans le but d'améliorer les soins aux patients.

1.2.1 Origine des plaquettes :

Historiquement, les plaquettes étaient identifiées comme « poussières cellulaires ». Or actuellement, les études ont démontré qu'elles sont indispensables à plusieurs processus vitaux tels que l'hémostase, la cicatrisation, l'angiogenèse, l'inflammation et l'immunité innée.

Les plaquettes sont formées à partir du cytoplasme des mégacaryocytes (MKs) qui résident dans la moelle osseuse. Les MKs sont parmi les cellules les plus rares et les plus grandes (50-100 μm) de la moelle osseuse; elles constituent environ 0,01% des cellules nucléées de la moelle osseuse [2]. La production des plaquettes commence au niveau des MKs qui deviennent polyploïdes par endomitose (réplication de l'ADN sans division cellulaire) et qui subissent ensuite un processus de maturation durant lequel leur cytoplasme forme plusieurs longues branches appelé pro-plaquettes, et le noyau est ensuite expulsé et phagocyté (Figure 1.1). Un MK peut produire de 10 à 20 pro-plaquettes. Chaque pro-plaquette s'allonge au fur et à mesure, s'amincit et forme des branches à plusieurs reprises. Les plaquettes se forment sélectivement à l'extrémité des pro-plaquettes [3]. Au cours de leur développement, les plaquettes reçoivent leur contenu en granules et organelles à partir du corps cellulaire des MKs [4]. La formation des plaquettes peut être divisée en deux phases. La première phase implique la maturation des MKs et leur développement qui dure des jours et qui nécessite des facteurs de croissance spécifiques aux MKs. Au cours de ce processus, les MKs subissent une prolifération nucléaire massive durant laquelle leurs cytoplasmes s'élargissent et se remplissent de protéines de cytosquelette, de granules spécifiques aux plaquettes et une membrane suffisante pour compléter le processus d'assemblage des plaquettes. La deuxième phase est relativement rapide et peut durer quelques heures. Durant cette phase, les MKs produisent des plaquettes en remodelant leur cytoplasme tout d'abord en pro-plaquettes puis en pré-plaquettes, qui subissent ensuite des événements de fission pour générer des plaquettes discoïdes. Le temps requis pour que les MKs complètent la polyploïdisation, la maturation et la libération des plaquettes est de 5 jours chez les humains et de 2 à 3 jours chez les rongeurs [5-7]. Une fois libérés dans le sang, les plaquettes humaines survivent de 7 à 10 jours, alors que les plaquettes des rongeurs survivent entre 4 et 5 jours [8, 9].

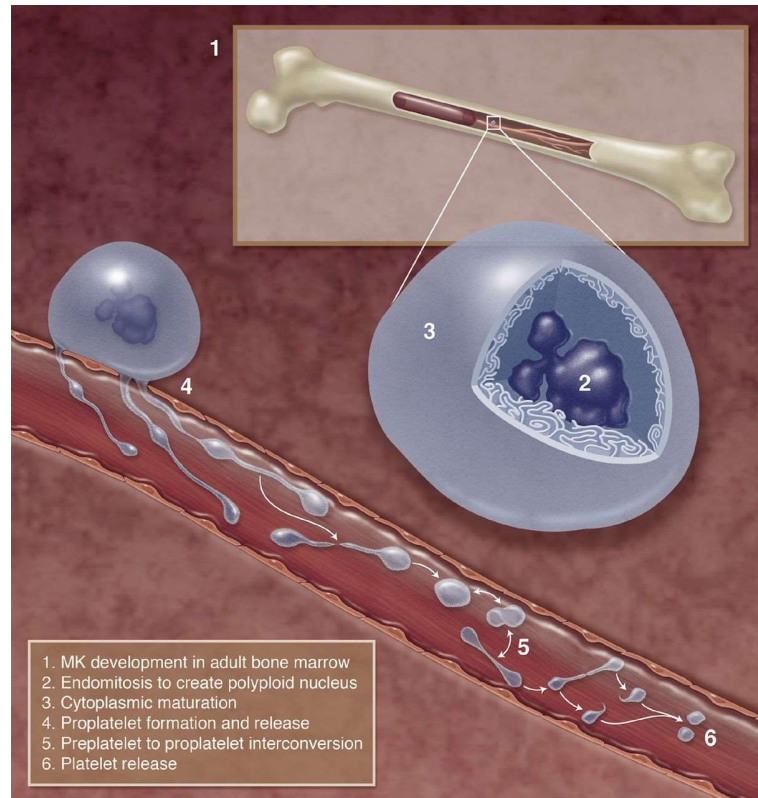


Figure 1.1: Les étapes de la production des plaquettes à partir des MKs. (1) Développement des MKs dans la moelle osseuse, (2) L'endomitose des MKs qui aboutit à la formation de cellules polyploïdes, (3) Maturation du cytoplasme des MKs, (4) Formation et sécrétion des pro-plaquettes, (5) Conversion des pro-plaquettes en pre-plaquettes, (6) Sécrétion des plaquettes.[10]

1.2.2 Structure des plaquettes:

Les plaquettes sont les plus petites composantes du sang, leur diamètre est en moyenne de 2 à 5 μm , leur épaisseur est de 0,5 μm , et leur volume cellulaire moyen est de 6 à 10 fl. [11] Quant à sa structure, la plaquette peut être divisée en : une zone périphérique, une zone sol-gel, une zone d'organelle et le système membranaire [12].

1.2.2.1 La zone périphérique :

La membrane plasmique des plaquettes est relativement lisse et contient un glycocalyx plus épais que les autres cellules sanguines. Le glycocalyx est une structure dynamique et un site de contact avec le milieu environnant. Il contient les glycoprotéines de surface nécessaires à l'interaction des plaquettes avec les structures sous-endothéliales de la paroi du vaisseau lésé, à

l'activation des plaquettes, à l'adhésion et à l'agrégation des plaquettes, ainsi qu'à la rétraction du caillot [13]. Au-dessous du glycocalyx se trouve la bicouche lipidique [14] qui contient des facteurs tissulaires (TFs) qui, suite à l'activation des plaquettes, sont exposés à la surface des plaquettes sous leurs formes inactives avec une phosphatidylsérine (PtdSer) chargée négativement [15]. Ainsi, les plaquettes activées libèrent des microparticules (MPs) portant des TFs, capables de lier aux facteurs de coagulation Va, VIIa et Xa à leur PtdSer de surface. Grâce à cette interaction, la génération de thrombine est augmentée à la surface des plaquettes activées ainsi que sur les MPs dérivées des plaquettes [12]. Sous la bicouche lipidique se situe la sous-membrane des plaquettes qui contient un système de filaments d'actine (le cytosquelette contractile) qui est nécessaire au changement de forme des plaquettes et à la translocation des récepteurs et des particules à la surface des plaquettes [16]. Dans le compartiment sous-membranaire, les domaines cytoplasmiques de tous les récepteurs transmembranaires interagissent avec des protéines, dont beaucoup sont associées aux filaments de calmoduline, de myosine et d'actine [17]. Ainsi, ils régularisent les signalisations nécessaires à l'activation des plaquettes.

1.2.2.2 La zone sol-gel :

La zone sol-gel constitue la matrice transparente visqueuse à l'intérieur des plaquettes. Elle contient des microtubules, des microfilaments, du glycogène, quelques vésicules lisses et d'autres recouvertes de clathrine, ainsi que des organelles sécrétrices. Les microtubules sont disposés à proximité de la paroi cellulaire formant ainsi un système de support du cytosquelette contractile de la membrane [18, 19]. Plusieurs études suggèrent fortement que les microtubules sont nécessaires au maintien de la forme discoïde des plaquettes humaines [20]. Les microfilaments d'actine dans la zone sol-gel forment le cytosquelette à filament d'actine cytoplasmique. Celui-ci constitue la matrice dans laquelle toutes les organelles sont en suspension et c'est le cytosquelette qui maintient les organelles séparées les unes des autres et de la paroi cellulaire des plaquettes au repos [12]. Suite l'activation des plaquettes, le système d'actine cytoplasmique resserre les microtubules déplaçant ainsi les granules α et les granules denses vers le centre des plaquettes [21], ceci peut entraîner la sécrétion de leur contenu dans le système canaliculaire ouvert [22, 23].

1.2.2.3 Le système membranaire :

Le système membranaire des plaquettes humaines comprend : les complexes de Golgi, le système canaliculaire ouvert, le système tubulaire dense (DTS), le réticulum endoplasmique rugueux et la membrane plasmique externe. Le système canaliculaire ouvert fait partie de la membrane plasmique des plaquettes et s'étend vers l'intérieur formant ainsi une structure tubulaire [24-26]. Ses canaux servent au transport des différentes composantes plasmatiques telles que le fibrinogène jusqu'aux granules α [27-29]. Ils peuvent également servir de route pour la sécrétion granulaire pendant l'activation plaquettaire [23]. De plus, grâce à leurs invaginations, ces canaux fournissent des parties de membrane nécessaires pour favoriser l'adhésion des plaquettes aux vaisseaux lésés [30]. Ce mécanisme permet aux plaquettes activées d'augmenter leur surface de contact de quatre fois par rapport aux plaquettes discoïdes au repos [31]. Le DTS est un résidu du réticulum endoplasmique lisse du mégacaryocyte et constitué de canaux dispersés aléatoirement dans le cytoplasme plaquettaire. Les canaux sont séparés des canalicules du système canaliculaire ouvert et - contrairement à eux - contiennent une substance amorphe ressemblant au cytoplasme environnant au niveau de l'opacité [24].

1.2.2.4 La zone d'organelles :

Il existe trois principaux types de granules dans les plaquettes : les granules α , les granules denses et les lysosomes. De plus, les plaquettes contiennent des mitochondries (importantes pour leur métabolisme énergétique), des glycosomes [32] et des inclusions tubulaires [33].

Les granules plaquettaires ont été découvertes pour la première fois à la fin du 19ème siècle, mais c'est à partir de l'année 1966 qu'on a commencé à différencier entre les granules denses et les granules- α [34]. Ensuite, une année plus tard, on a pu distinguer entre ces derniers et les lysosomes grâce à la microscopie électronique nouvellement développée [35]. La formation des granules est initiée dans les MKs, mais leur maturation continue dans les plaquettes circulantes [36]. Elles sont transférées vers les plaquettes sur des pistes de microtubules au cours de la formation des pro-plaquettes [36].

I. Les granules α :

Les protéines emmagasinées dans les granules α sont soit synthétisées soit internalisées par endocytose. Les protéines synthétisées sont transportées du réticulum endoplasmique au réseau trans-Golgi et sont ensuite conservées dans des granules immatures [37, 38]. Alors que les autres protéines sont internalisées par les MKs via l'endocytose et cette internalisation continue dans les plaquettes matures [36]. Les vésicules qui transportent ces protéines sont recouvertes de clathrine et sont formées à partir de l'invagination de la membrane sous l'influence des protéines adaptatrices [36]. Ces vésicules sont ensuite déplacées vers des corps multi-vésiculaires, qui représentent des structures transitoires dans la production de granules dans les MKs [39]. Ces corps subissent ensuite une maturation pour former les granules α [36].

Quant à leur contenu, les granules α contiennent des protéines membranaires et solubles, qui sont impliqués dans divers processus, y compris l'adhésion cellulaire, la coagulation, l'inflammation, la croissance cellulaire et l'immunité. La plupart des protéines membranaires sont déjà présents sur la surface des plaquettes au repos [40], telles que l' α Ib β 3, le GPVI...[41, 42]. Cependant, d'autres protéines membranaires, comme la P-sélectine, sont exclusivement exprimées à la surface des plaquettes activées, plutôt qu'à celle des plaquettes au repos [41]. Ainsi, la P-sélectine exprimée à la surface des plaquettes est largement utilisée comme un marqueur de l'activation plaquettaire [43-45]. Les analyses protéomiques ont identifié plus de 300 protéines solubles libérées par les granules α [41, 46].

II. Les lysosomes :

Les lysosomes plaquettaires contiennent :

- Des protéinases telles que : les cathepsines, l'élastase et la collagénase.
- Des enzymes qui dégradent les glucides telles que : la glucosidase et la galactosidase.
- Des enzymes qui clivent les esters phosphatés telles que la phosphatase d'acide.

III. Les granules denses :

Les granules denses sont des granules apparentés aux lysosomes; elles proviennent ainsi de l'endosome plutôt que du réseau trans-Golgi [47]. Au cours de la mégacaryopoïèse, les granules denses apparaissent simultanément avec les granules α . Comme les granules α , les granules denses précoces sont également triés dans des corps multi-vésiculaires et leur contenu devient plus dense au fur et à mesure qu'elles mûrissent [36]. Les granules denses des plaquettes contiennent de fortes

concentrations de nucléotides d'adénine, comme l'adénosine di-phosphate (ADP) et l'adénosine triphosphate (ATP) [48], des nucléotides d'uracile et de guanine, du calcium et du potassium. Elles contiennent également des polyphosphates et des amines bioactives telles que la sérotonine et l'histamine [49, 50].

1.3 La fonction hémostatique des plaquettes :

Le rôle fondamental des plaquettes dans l'hémostase a d'abord été identifié par le pathologiste et le chercheur médical italien Bizzozzero en 1882 [51]. Ensuite, pendant plus de 120 ans, les recherches scientifiques se sont concentrées sur le rôle central des plaquettes comme composantes clés de la thrombose et l'hémostase. Ces rôles classiques des plaquettes sont actuellement bien acceptés. Cependant, au cours des deux dernières décennies, la littérature a évolué reliant les plaquettes à une fonction pro-inflammatoire majeure, à la défense de l'hôte et une variété de maladies auto-immunes, de maladies inflammatoires et malignes. Ainsi, les plaquettes jouent un rôle important tant au niveau inflammatoire qu'au niveau hémostatique et thrombotique.

La fonction hémostatique des plaquettes est pertinente afin de maintenir l'intégrité d'un système circulatoire fermé à haute pression [52]. A l'état basal, les plaquettes circulent sous une forme inactive, près des CEs qui tapissent les vaisseaux sanguins sans adhérer à ces dernières. Cependant, suite à une lésion vasculaire, certaines protéines de la matrice sous-endothéliale deviennent exposées, y compris le facteur Von Willebrand (VWF), le collagène, le fibrinogène et la fibronectine. Cela est suivi par l'adhésion plaquettaire médiée par les récepteurs plaquettaires comme les glycoprotéines, y compris GPVI et GPIb α qui interagissent avec le collagène et le VWF, respectivement [53, 54]. L'adhésion plaquettaire déclenche ensuite une cascade de signalisation intracellulaire médiée par des tyrosines kinases et des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), qui guident l'activation des plaquettes qui à leur tour recrutent et activent des plaquettes supplémentaires. Ceci entraîne une amplification de l'activation plaquettaire à travers la sécrétion d'agonistes, y compris le TXA₂ et l'ADP. Ces agonistes plaquettaires lient leurs récepteurs aboutissant ainsi à l'augmentation du calcium intracellulaire, le changement de forme des plaquettes, la sécrétion des granules et l'activation de la fonction adhésive de l'intégrine α IIb β 3. L'intégrine α IIb β 3 active, se lie alors au fibrinogène avec une haute affinité permettant la formation

et la stabilisation d'un agrégat plaquettaire [55] (Figure 1.2). Le rôle fondamental du VWF, GPIb α et α IIb β 3 dans les réponses hémostatiques est mis en évidence par la coagulopathie observée chez les patients atteints de la maladie de von Willebrand, le syndrome de Bernard-Soulier [56], et la thrombasthénie de Glanzmann [57], qui ont des anomalies quantitatives ou qualitatives du VWF, GPIb α et α IIb β 3, respectivement. L'activation et l'agrégation plaquettaire nécessite un contrôle pour empêcher la formation exagérée et anormale d'agrégat plaquettaire qui finirait par obstruer le vaisseau. Cela explique le fait que les CEs produisent des agents inhibiteurs tels que la prostacycline (PGI₂) et le monoxyde d'azote (NO) qui limitent la croissance du thrombus plaquettaire sur la zone du vaisseau endommagé.

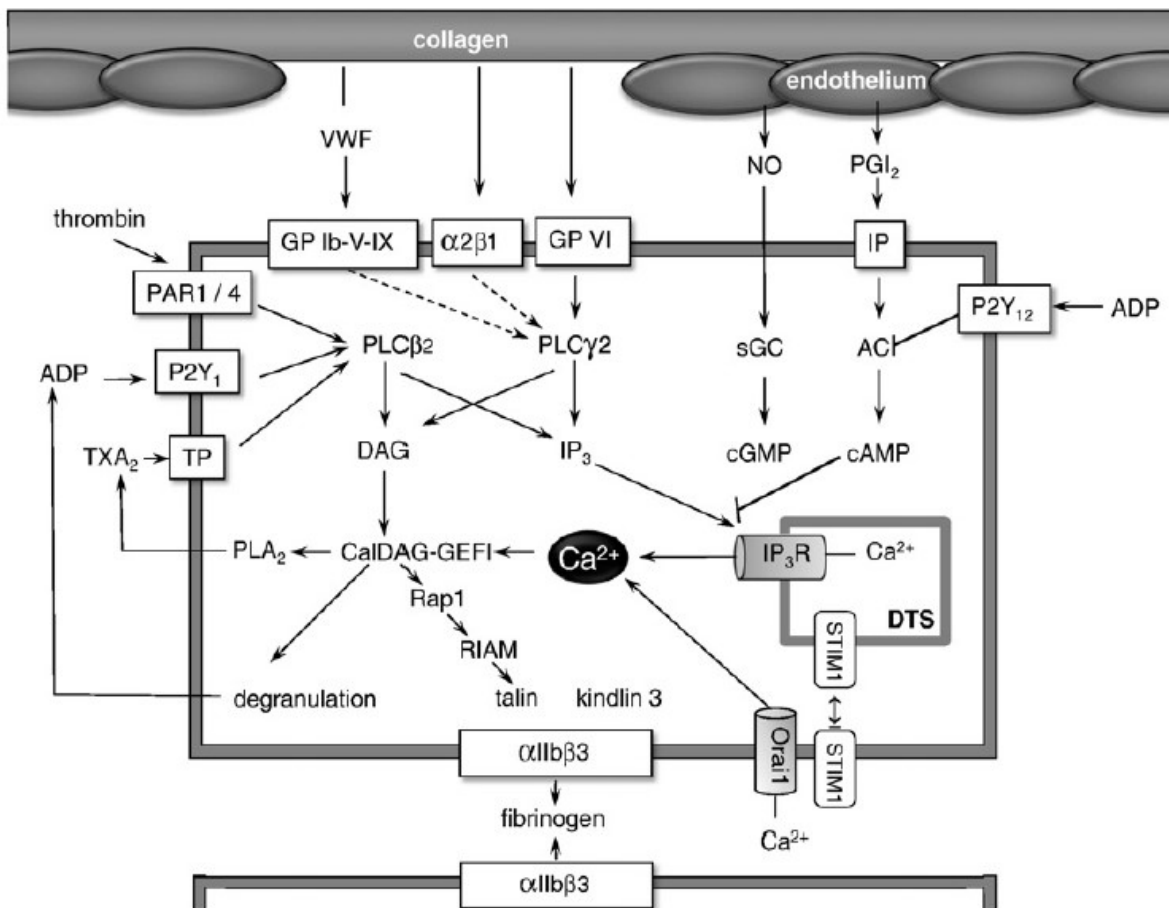


Figure 1.2 : Schéma qui résume les récepteurs plaquettaires ainsi que les voies de signalisation principales impliquées dans la fonction hémostatique des plaquettes.[58]

1.3.1 Le roulement et l'adhésion des plaquettes :

1.3.1.1 Le roulement des plaquettes :

Il devient de plus en plus évident que la dénudation endothéliale causé par une lésion vasculaire n'est pas une condition préalable absolue pour permettre l'adhésion des plaquettes à la paroi artérielle. Comme on l'a déjà mentionné, l'endothélium intact, non activé, empêche normalement l'adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire. Cependant, en cas d'inflammation, les CEs inflammées développent des propriétés adhésives envers les plaquettes. Des études *in vitro* ont montré que les plaquettes adhèrent à la monocouche des CEs humaines intactes mais activées (inflammées) [59-61]. Les résultats de ces études fournissent la preuve que, similaire à l'interaction des plaquettes avec les protéines de la matrice extracellulaire au site des lésions vasculaires, l'adhésion des plaquettes à l'endothélium intact mais activé est coordonnée selon un processus de plusieurs étapes qui implique le recrutement des plaquettes, suivi de leur roulement et leur adhésion ferme à la paroi vasculaire. Ces processus impliquent deux types de récepteurs, les sélécines et les intégrines, qui induisent des signaux d'activation spécifiques aux récepteurs plaquettaires ainsi qu'au type de cellule adhésive. Le contact initial entre les plaquettes en circulation et l'endothélium vasculaire (roulement des plaquettes) est assuré par les sélécines, présentes à la fois sur les CEs et les plaquettes [62]. La P-sélécine est rapidement exprimée à la surface endothéliale en réponse à des stimuli inflammatoires en effectuant une translocation à partir des granules, comme le corps de Weibel-Palade, vers la membrane plasmique. Il a été démontré que la P-sélécine endothéliale est responsable du roulement des plaquettes dans les artérioles et les veinules dans les processus inflammatoires aigus [63, 64]. La E-sélécine, qui est également exprimée sur les CEs inflammées, assure un contact léger entre les plaquettes et l'endothélium *in vivo* [64]. Le processus de roulement des plaquettes ne nécessite pas leur activation préalable, car les plaquettes des souris dépourvues de P- et / ou E-sélécine roulent aussi efficacement que les plaquettes de type sauvage [65]. On a identifié le GPIb/IX/V riche en leucine, également connu sous le nom de « complexe récepteur du VWF » en tant que contre-récepteur potentiel de la P-sélécine plaquettaire. Romo et al. [66] ont récemment démontré que les cellules exprimant la P-sélécine roulent sur du GPIb α immobilisé. Les plaquettes roulant sur l'endothélium activé peuvent être inhibées par des anticorps (Ac) contre la P-sélécine et le GPIb α , indiquant que le complexe récepteur du VWF induit à la fois l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-

endothéliale et à l'endothélium activé [66]. De plus, le « *P-selectin glycoprotein ligand-1* » PSGL-1, une glycoprotéine qui se lie à la P-sélectine, est présente sur les plaquettes et intervient dans le roulement des plaquettes sur la monocouche endothéliale sous des forces de cisaillement élevées [67, 68]. L'interaction entre la P-sélectine et le PSGL-1 ou le GPIb/ IX /V est cependant rapidement réversible et insuffisante pour une adhésion stable. La conversion rapide en adhésion stable nécessite des contacts supplémentaires entre les plaquettes et l'endothélium. Les intégrines sont reconnues comme la principale classe de récepteurs de surface induisant une adhésion stable à forte force de cisaillement dans les cellules hématopoïétiques [69]. Bien que le rôle des intégrines dans la médiation de l'adhésion des plaquettes aux protéines de la matrice extracellulaire au site de la lésion soit bien établi, leur rôle dans l'adhésion, in vivo, des plaquettes à l'endothélium n'est pas encore complètement compris. In vitro, il a été démontré que les deux intégrines $\beta 3$ ($\alpha \text{IIb}\beta 3$ et $\alpha \nu \beta 3$) induisent une adhésion ferme des plaquettes à l'endothélium dans des conditions statiques [60, 61]. In vivo, l'adhésion ferme des plaquettes à l'endothélium peut être inhibée par l'Ac monoclonal anti- $\alpha \text{IIb}\beta 3$ et les plaquettes défectueuses en $\alpha \text{IIb}\beta 3$ n'adhèrent pas fermement aux CEs activées [70]. Ainsi, bien que nous commençons tout juste à comprendre les exigences moléculaires de l'adhésion des plaquettes à l'endothélium dans des conditions dynamiques, il semble s'agir d'un processus à plusieurs étapes bien contrôlé impliquant une interaction entre la PSGL-1 ou le GPIb α plaquettaire et la P-sélectine endothéliale (roulement), suivie d'une adhésion plaquettaire ferme médiée par l'intégrine $\beta 3$. Ces interactions plaquettes-CE permettent la communication transcellulaire via des médiateurs solubles et pourraient donc jouer un rôle important dans l'initiation et la progression de l'inflammation vasculaire.

1.3.1.2 L'adhésion des plaquettes :

Suite à une lésion vasculaire, la matrice sous-endothéliale est exposée causant ainsi l'adhésion immédiate des plaquettes afin de limiter l'hémorragie et de promouvoir la guérison des tissus. Cette matrice est composée de plusieurs macromolécules telles que le collagène, le VWF, la laminine, la fibronectine et la thrombospondine, qui servent de ligands pour différents récepteurs plaquettaires. Parmi ces composants sous-endothéliaux, le collagène de type I et III sont les médiateurs thrombotiques les plus puissants de l'adhésion plaquettaire grâce à leur fort potentiel d'activation et leur affinité pour le VWF [71]. L'adhésion initiale entre les plaquettes et la matrice extracellulaire est fortement dictée par les forces de cisaillement locales. Ainsi, à faible

cisaillement ($<1000 \text{ s}^{-1}$, comme dans les veines et les grandes artères) l'adhésion plaquettaire implique principalement la liaison au collagène, la fibronectine et la laminine. Cependant, à des forces de cisaillement plus élevées ($>1000 \text{ s}^{-1}$, comme dans les petites artères, les micro-vaisseaux ainsi que les vaisseaux athérosclérotiques/sténosés), l'interaction entre le récepteur GPIIb/IIIa des plaquettes et le VWF (soit dans la matrice extracellulaire ou immobilisée sur du collagène exposé) devient extrêmement importante afin de ralentir les plaquettes. Ce ralentissement de mouvement permet l'établissement de liens supplémentaires, conduisant ainsi à l'arrêt définitif des plaquettes et la formation du thrombus. Donc dans des conditions physiologiques, le VWF constitue un élément clé qui assure le maintien de l'équilibre hémostatique. En fait, le VWF est une grande glycoprotéine multimérique très adhésive qui se trouve principalement dans le plasma et qui est produite par les CEs et les MKs [72-74]. Il est essentiel pour l'hémostase et la formation de thrombus car il joue un rôle important dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaire sur les sites de lésions vasculaires [75, 76]. Le VWF synthétisé par les CEs est soit sécrété directement dans le plasma via la voie constitutive, soit emmagasiné dans les corps de Weibel –Palade [77]. En revanche, le VWF synthétisé par les MKs est emmagasiné dans les granules- α des plaquettes jusqu'à l'activation plaquettaire et sa sécrétion ultérieure. Ce VWF plaquettaire a une forte composante de multimères de haut poids moléculaire [78]. La contribution du VWF provenant des CEs ou des plaquettes dans l'hémostase fait actuellement l'objet d'investigations [79, 80]. Le VWF existe sous différentes tailles, appelées les multimères du VWF, et comprend le multimère de VWF de faible poids moléculaire (L), de poids moléculaire intermédiaire (I), de poids moléculaire élevé (H) et de poids moléculaire ultra-grand (UL). Le VWF emmagasiné dans les corps de Weibel – Palade des CEs ou dans les granules- α des MKs est riche en multimères extrêmement volumineux appelés les multimères UL-VWF. Alors que les multimères de VWF sécrétés de manière constitutive sont plus courts, mais ont toujours un poids moléculaire élevé [81-85]. Les multimères UL-VWF ne circulent généralement pas dans le plasma en raison de la protéolyse rapide qui les réduit en petits multimères peu après leur sécrétion. Parmi tous les multimères du VWF, ceux de grand poids moléculaires jouent le plus grand rôle dans l'hémostase (capacité supérieure de liaison au collagène et aux récepteurs plaquettaires GPIIb et IIIa et de stimulation de l'agrégation plaquettaire dans des conditions de fortes forces de cisaillement) [86-90]. Toute anomalie de quantité ou de qualité des multimères du VWF, en particulier ceux de grand poids moléculaire, peut entraîner une hémostase défectueuse. Les multimères UL-VWF libérés des corps de Weibel

– Palade forment les liens les plus forts avec les plaquettes et la matrice extracellulaire [81, 91]. Suite à la sécrétion du VWF emmagasiné, certains multimères de VWF dérivés de l'endothélium restent ancrés à la surface des cellules endothéliales, formant des structures longitudinales qui, dans des conditions normales subissent un changement de forme, exposant ainsi le site de clivage de la métalloprotéinase ADAMTS13 (une désintégrine et une métalloprotéinase avec une thrombospondine de type 1 motif, élément 13) [92-94]. Dans des conditions de fortes forces de cisaillement, les chaînes UL-VWF liées à l'endothélium sont clivées plusieurs fois par ADAMTS13 en multimères plus courts, dont la taille est encore très grande. Ainsi, le VWF subit une protéolyse supplémentaire par ADAMTS13 dans la circulation [94-96]. Ce traitement ultérieur des multimères UL-VWF par ADAMTS13 contribue à la production des multimères de VWF de différentes tailles qui forment la plage de VWF en circulation, allant du VWF à un seul dimère jusqu'au VWF à 20 dimères (10 000 kDa) [97-99]. La régulation de la taille des multimères du VWF par ADAMTS13 est essentiel pour la fonction hémostatique. Ainsi, en cas de protéolyse excessive du VWF par ADAMTS13, l'hémostase est gravement compromise en raison de l'absence de VWF à grand poids moléculaire, ce qui entraîne le type classique de VWD 2A. Cependant, un déficit d'ADAMTS13 entraîne une accumulation anormale des multimères de grand poids moléculaire UL-VWF, qui peuvent provoquer une agrégation plaquettaire spontanée, conduisant à la condition critique du purpura thrombocytopénique thrombotique (TTP) [100].

1.3.2 L'activation des plaquettes :

Comme toute autre cellule, les plaquettes sont activées par différentes voies de signalisation; les voies des tyrosines kinases, celles des GPCRs et la signalisation « *Inside-out* » qui active l'intégrine α IIb β 3.

1.3.2.1 Les voies de signalisation via les tyrosines kinases :

La liaison du VWF au GPIb [101], des complexes d'Ac au récepteur « *Fragment crystallizable receptor gamma II* », du Gas6 (*Growth arrest-specific gene 6*) aux récepteurs « *Tyrosine-protein kinase receptor 3* » [102], du collagène au GPVI [103] et de la podoplanine au « *C-type lectin-like receptor 2* » initient une cascade de tyrosine kinase qui finalement entraîne

l'activation de la Phospholipase C gamma-2 (PLC γ 2) via la phosphorylation de l'acide aminé Tyrosine de ses domaines SH2 [104] (Figure 1.3).

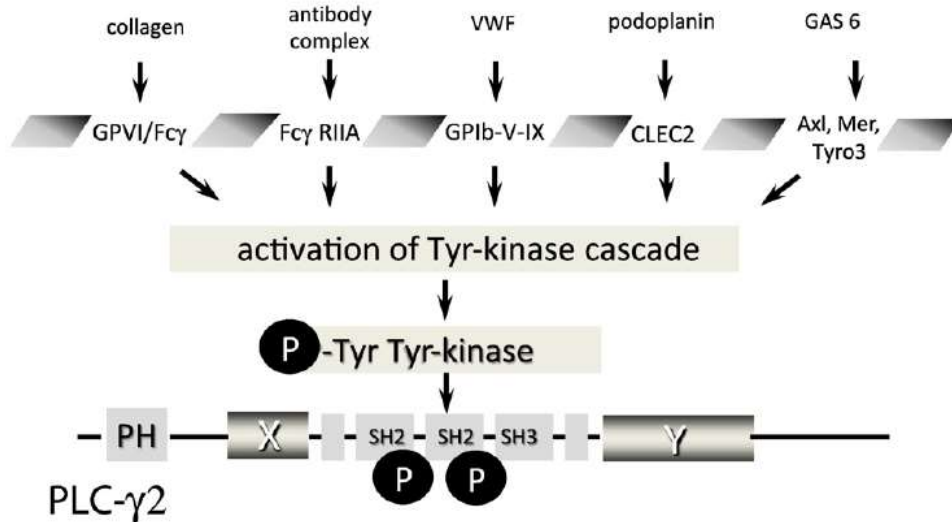


Figure 1.3 : Schéma représentant les récepteurs plaquettaire et leurs agonistes impliqués dans la signalisation via les tyrosines kinases.[58]

La PLC γ 2 à son tour hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate pour produire le triphosphoinositol (IP3) et le 1,2- diacylglycérol (DAG) membranaire. L'IP3, une petite molécule hydrosoluble à diffusion rapide, joue le rôle d'un second messager qui se lie au récepteur de l'IP3 sur le DTS des plaquettes. Ce dernier est un canal sélectif au calcium qui permet l'efflux du Ca $^{2+}$ du DTS, entraînant une augmentation du taux de l'ion calcium (Ca $^{2+}$) cytoplasmique (Figure 1.2).

En outre, le DAG membranaire avec le Ca $^{2+}$, lié à la PtdSer, jouent un rôle en tant que récepteur interne de la sérine/thréonine de la protéine kinase C (PKC). En conséquence, la PKC se déplace du cytosol à la membrane où elle s'active.

L'augmentation des concentrations cytosoliques du Ca $^{2+}$ et du DAG entraînent l'activation de la phospholipase A2, le changement de forme plaquettaire, ainsi que la sécrétion des granules et finalement l'agrégation des plaquettes. Par contre, la libération du Ca $^{2+}$ est contrecarré par un ensemble de CA $^{2+}$ -ATPases de la membrane plasmique qui font sortir le Ca $^{2+}$ cytosolique vers le milieu extracellulaire et les CA $^{2+}$ -ATPases du réticulum sarcoplasmique pompent le Ca $^{2+}$ dans le DTS [105].

L'augmentation du niveau de Ca^{2+} cytosolique déclenche également l'exposition de la PtdSer à la surface des plaquettes les rendant plus chargée négativement [106]. La PtdSer exposée avec le Ca^{2+} lié constitue une surface pro-coagulante pour les facteurs de coagulation dépendants de la vitamine K dépendante, de leurs cofacteurs ainsi que leurs substrats, ce qui accélère la cascade de la coagulation. Ce processus est accompagné par la libération de MPs qui présentent également la PtdSer et la libération de facteurs tissulaires qui déclenchent la coagulation sanguine [107]. L'importance de la contribution de la surface pro-coagulante est reflétée dans le syndrome de Scott où les patients souffrent de saignement en raison d'un défaut de translocation de la PtdSer, provoquant l'arrêt prématuré de la protéine [106].

1.3.2.2 La signalisation via les GPCRs :

Les plaquettes expriment un nombre assez élevé de récepteurs transmembranaires GPCRs, dont l'activation génère des signaux à la fois stimulateurs et inhibiteurs. L'équilibre entre ces signaux se traduit par la formation d'un agrégat plaquettaire. Un des agonistes plaquettaires qui agit à travers ces récepteurs est le TxA_2 . Le TxA_2 libéré par les plaquettes activées entraîne la contraction des cellules musculaires lisses (CMLs) et génère une boucle d'amplification de l'activation des plaquettes en agissant d'une manière autocrine et paracrine sur son récepteur « *Thromboxane Prostanoid receptor* » (TP). Le TP est un membre des GPCRs et un récepteur hétéro-trimérique qui est composé de sous-unités α , β et γ . Au repos, la sous-unité α contient un GDP et est associée aux sous-unités β et γ . Lors son activation, le GDP de la sous-unité α est échangé avec un GTP et par la suite α -GTP se dissocie du dimère $\beta\gamma$. Les deux complexes activent leurs effecteurs (PLC, l'adényl cyclase (AC), les canaux ioniques...). Le processus s'achève suite à la l'hydrolyse de GTP par l'activité intrinsèque de la GTP-ase de la sous-unité α , suite à laquelle l' α -GDP se réassocie aux sous-unités β et γ pour reformer le complexe de repos de TP. Le récepteur TP est couplé à la protéine Gq dont PLC β 2 constitue la molécule effectrice principale. Les récepteurs de la thrombine « *Protease-activated receptor* » PAR-1 et PAR-4, le récepteur de l'adénosine diphosphate (ADP); P2Y1 et celui de la sérotonine (5-hydroxytryptamine) 5HT2A, sont tous également couplés à Gq et activent ainsi PLC β 2 (Figure 1.2). La PLC β 2, comme la PLC γ 2, génère l'IP3 et DAG et augmente ainsi davantage le Ca^{2+} cytosolique [108].

Contrairement à tous les autres ligands impliqués dans l'activation plaquettaire qui agissent en se liant de manière réversible à leurs récepteurs, la thrombine active ses récepteurs PAR en coupant une partie du N-terminale à une séquence de consensus. Le nouveau N-terminal ainsi généré sert maintenant de ligand qui induit l'activation du récepteur [109]. Afin de contrôler son activation, PAR-1 est rapidement découplé de la signalisation et internalisé par des mécanismes dépendants de la phosphorylation [110] et il est ensuite dégradé par les lysosomes [111]. En outre, certaines protéases extracellulaires clivent le N-terminal de PAR-1 pour rendre le récepteur inactif [112]. Les récepteurs PAR activés, un peu comme les récepteurs β -adrénergiques, deviennent également phosphorylés et inactivés par la kinase-2 du récepteur β -adrénergique.

Les récepteurs TP et PAR sont en outre couplés à G13 qui active les facteurs d'échange nucléotidiques de guanine Rho (Figure 1.4), qui déclenchent la voie Rho/Rho-kinase régulant la phosphatase de myosine, entraînant ainsi la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC). La stimulation de la voie Rho/Rho-kinase et la phosphorylation de la MLC augmentent la contractilité de l'actine et de la myosine ainsi que la régulation dynamique des microtubules au cours du changement de forme des plaquettes [113, 114].

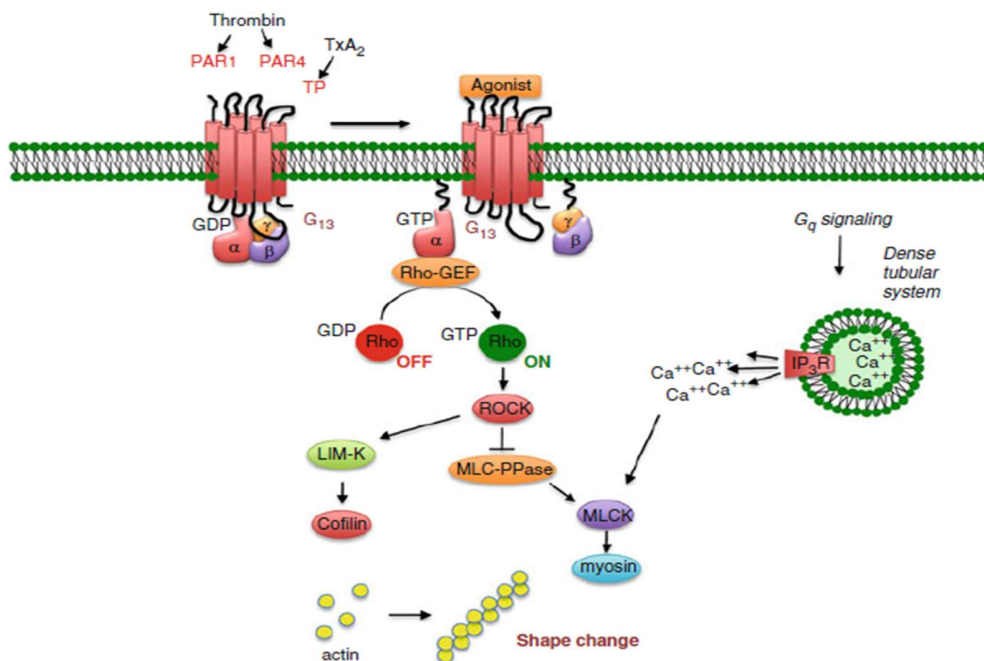


Figure 1.4 : Les voies de signalisation des récepteurs PARs et TP dans les plaquettes.[115]

L'ADP, libéré lors de la sécrétion des granules denses de plaquettes, génère une seconde boucle d'amplification de l'activation plaquettaire via P2Y1 également couplé à Gq. L'ADP se lie aussi à P2Y12 qui est un autre GPCR qui interagit cependant avec la protéine G α i2, qui inhibe l'AC. L'AC activée génère de l'AMP cyclique à partir de l'ATP, et l'AMP cyclique diminue les taux élevés cytosoliques de Ca²⁺. L'activation de l'AC est neutralisée par la protéine Gi inhibitrice, qui est également couplée aux récepteurs de la thrombine PAR-1 et PAR-4. La Gi inhibe non seulement l'AC, mais stimule également la phosphoinositide 3-kinase β produisant du phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, qui active la protéine kinase B, la « *Extracellular signal Regulated kinase 2* » (ERK2), Rac (GTPase appartenant à la famille de Rho GTPases) et finalement contribue à plus de mobilisation de Ca²⁺ [116]. Malgré sa réponse relativement faible [117], le P2Y1 est nécessaire pour l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP et son déficit génétique ou son inhibition pharmacologique diminue l'agrégation plaquettaire et protège contre la thrombose [118, 119].

1.3.2.3 L'activation « Inside-out » de l'intégrine α IIb β 3 :

La dernière étape de l'activation plaquettaire est l'agrégation plaquettaire causée par la liaison de l'intégrine α IIb β 3, qui se trouve à la surface des plaquettes, au fibrinogène. Au repos, l'intégrine α IIb β 3 présente une faible affinité pour ses ligands ; le fibrinogène et le VWF. Cette affinité augmente considérablement suite à l'activation plaquettaire. La conformation de l' α IIb β 3 à faible affinité est maintenue par l'interaction entre les régions proximales de la partie cytosolique des sous-unités α et β de l'intégrine, stabilisée par la liaison entre l'aspartate 723 de la sous-unité β 3 et l'arginine 995 de la sous-unité α IIb ainsi que par les résidus hydrophobes aux N-terminaux de ces acides aminés (AA).

L'augmentation des niveaux de Ca²⁺ résultant de la stimulation des plaquettes, induit également l'activation du facteur d'échange de guanine I régulé par Ca²⁺ et DAG [120, 121], qui à son tour active Rap1b, une petite protéine de liaison au GTP (Figure 1.5). Le Rap1b est un régulateur critique de la fonction plaquettaire ainsi que l'activation des intégrines [122]. Il agit en réarrangeant le cytosquelette par son interaction avec la protéine adaptatrice interagissant avec Rap1 ; « *Rap1-interacting adaptor molecule* » [123]. De plus, l'activation de Rap1 entraîne la formation d'un « complexe d'activation » contenant Rap 1, « *Rap1-interacting adaptor molecule* » et talin (une protéine du cytosquelette qui se co-localise avec et se lie aux intégrines,

à l'actine et aux protéines liées à l'actine telles que vinculin [124]) qui active $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (Figure 1.5). La formation du complexe d'activation de l'intégrine démasque le site de liaison aux intégrines sur talin [125], qui peut maintenant se lier à la queue de la sous-unité β_3 de l'intégrine. Par conséquent, la liaison entre les sous-unités α et β est perturbée [126], induisant un changement de conformation entraînant un étirement du domaine extracellulaire de l'intégrine et par la suite l'exposition du site de liaison de l'intégrine pour ses ligands [127]. Le rôle de l' $\alpha\text{IIb}\beta_3$ est démontré à travers la thrombasthénie de Glanzmann où les patients atteints souffrent d'hémorragie sévère causée par l'absence ou la dysfonction de l' $\alpha\text{IIb}\beta_3$.

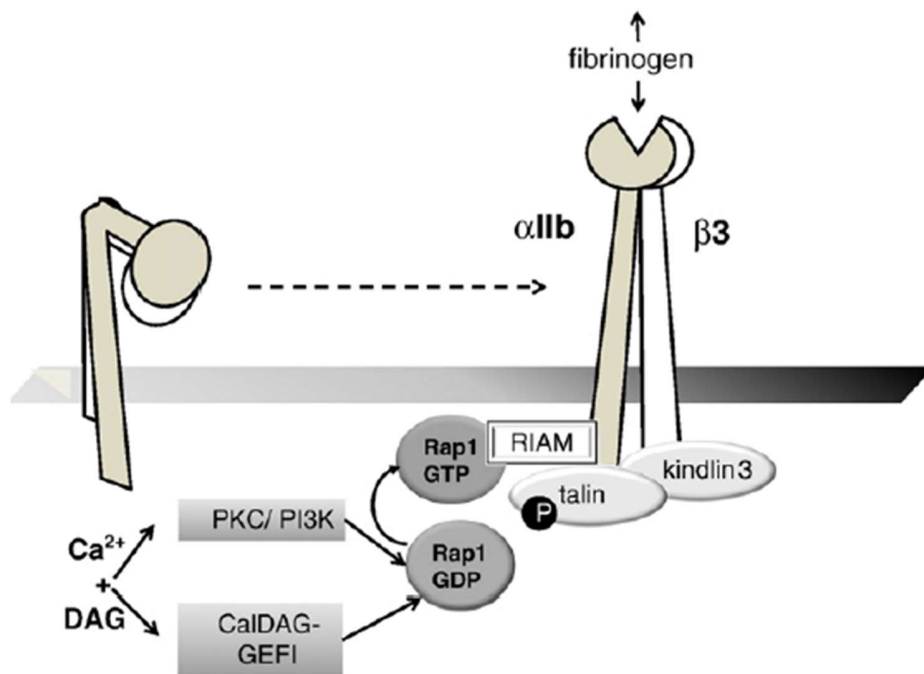


Figure 1.5 : La voie d'activation « Inside-out » de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ et son changement de configuration de sa forme inactive en sa forme active suite à l'activation plaquettaire.[58]

1.3.3 L'agrégation plaquettaire:

L'agrégation plaquettaire est un processus complexe et dynamique qui implique de nombreux ligands (tels que le fibrinogène, la fibronectine et le VWF), des récepteurs (tels que le GPIIb et l' $\alpha\text{IIb}\beta_3$) et des plaquettes dans différents états d'activation [53, 128, 129]. Ce processus mène à la formation d'un thrombus riche en fibrinogène au site de la lésion vasculaire.

Des études récentes identifient trois mécanismes distincts qui initient l'agrégation plaquettaire sur la première couche de plaquettes adhérentes [128]. À faible forces de cisaillement ($<1000 \text{ s}^{-1}$), l'agrégation plaquettaire est principalement médiée par les interactions $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -fibrinogène. À des forces de cisaillement comprises entre 1000 et 10000 s^{-1} , l'agrégation se produit en 2 étapes. La première étape dépend de la fonction adhésive du GPIIb α et de l' $\alpha\text{IIb}\beta_3$ et est médiée par la formation d'agrégats réversibles de plaquettes. La deuxième étape mène à la formation d'agrégats plaquettaires stables, dépend de la génération d'agonistes des plaquettes et implique l'activation irréversible de l' $\alpha\text{IIb}\beta_3$. À des forces de cisaillement $>10\ 000 \text{ s}^{-1}$, l'agrégation plaquettaire est exclusivement médiée par les interactions VWF-GPIIb α et peut se produire en absence de l'activation de l' $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ou même de l'activation plaquettaire [53, 54].

1.4 Implication des plaquettes dans la thrombose :

La thrombose est la formation d'un caillot sanguin fibrino-plaquettaire -thrombus- dans le vaisseau sanguin, qui peut induire son occlusion partielle ou complète. La thrombose peut être artérielle ou veineuse. La thrombose veineuse est causée par une perturbation du flux sanguin telle que la stagnation et est composée principalement de globules rouges dans un filament de fibrine (Thrombus rouge). Alors que la thrombose artérielle est causée par une perturbation du flux sanguin causée par une sténose au niveau d'une plaque athéromateuse, dont la définition détaillée est indiquée dans la section 2.4.2, qui joue un rôle dans le déclenchement de la formation de thrombus, mais la rupture de la plaque athérosclérotique est plus importante [130, 131]. La formation d'un thrombus occlusif suite à l'adhésion, l'activation et l'agrégation des plaquettes, aux sites de rupture ou d'érosion d'une plaque d'athérosclérose, dans la circulation coronaire ou cérébrale peut provoquer respectivement un infarctus aigu du myocarde ou un AVC. Ces affections cardiovasculaires constituent maintenant la cause la plus commune de morbidité et de mortalité dans le monde et implique à la fois une activation aggravée des plaquettes ainsi qu'une activation de la cascade de coagulation. La thrombo-résistance des vaisseaux sanguins est assurée par les CEs qui sécrètent activement une gamme de molécules anti-thrombotiques qui inhibent les fonctions plaquettaires (comme la PGI₂, le NO...) et la cascade de la coagulation. Suite à la rupture de la plaque, l'endommagement de l'endothélium expose la matrice sous-endothéliale ainsi que le noyau nécrotique hautement thrombogène à la circulation et cause une adhésion et une activation

des plaquettes sur les composants de la matrice sous-endothéliale (VWF et collagène), ainsi que le recrutement et l'activation subséquente des plaquettes en circulation par des médiateurs secondaires sécrétés (comme l'ADP et le TxA₂). Ces réactions sont ensuite suivies par les agrégats plaquettes-plaquettes stables médiés par les interactions de l'intégrine α IIb β 3 avec ses ligands principaux, tels que le fibrinogène et le VWF, induisant ainsi la propagation du thrombus.

Les plaquettes activées favorisent aussi l'assemblage des complexes de coagulation sur leur membrane plasmique, soit par le recrutement direct d'un TF exprimé à la surface des leucocytes ou via une liaison indirecte à des MPs portant un facteur tissulaire, dérivés des monocytes/macrophages et des lymphocytes T activés ou apoptotiques, et des leucocytes médiées par des interactions entre la P-sélectine et son récepteur sur les leucocytes (le « *P-selectin glycoprotein ligand-1* ») [132, 133]. Le TF initiateur de la voie extrinsèque de la coagulation, mène à formation de la prothrombine qui est transformé en thrombine, qui est le plus puissant activateur plaquettaire. La thrombine, à son tour, catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine, qui constitue une composante essentielle pour la croissance et la stabilité du thrombus [134]. Des altérations spécifiques du flux sanguin, notamment l'accélération du flux au sommet de la sténose suivie d'un ralentissement du flux, favorisent le dépôt de plaquettes sur les surfaces thrombogènes [135].

Les patients cardiovasculaires présentant un syndrome métabolique, telles que les patients diabétiques souffrant d'hypertension et d'hypercholestérolémie, ont un risque de thrombose plus grand car leurs plaquettes sont hyperactives et sont également résistantes au traitement antiplaquettaire régulier, ce qui nécessitent par conséquent un schéma thérapeutique antiplaquettaire plus intensif [136-138]. En outre, le traitement antiplaquettaire, tel que l'aspirine, le clopidogrel ou les inhibiteurs de la thrombine, n'empêche pas le dépôt des plaquettes sur les surfaces réactives induit par des forces de cisaillement [135]. Par conséquent, une compréhension plus approfondie des réactions plaquettaires et le rôle des médiateurs thrombo-inflammatoires dans l'initiation et la propagation de la thrombose pourraient être bénéfiques pour la gestion optimale de la maladie athéro-thrombotique chez les patients avec ACS.

1.5 Rôle des plaquettes dans les maladies inflammatoires (l'athérosclérose) :

La fonction pro-inflammatoire des plaquettes a émergé à partir de plusieurs études expérimentales sur la pathogenèse de l'athérosclérose. Ainsi, le rôle des plaquettes dans l'athérogenèse a fait l'objet de nombreuses recherches [139-142].

L'adhésion des plaquettes aux sites de l'endothélium lésé et artérioscléreux accélère la progression des plaques athéromateuses. En fait, les plaquettes adhérentes libèrent un certain nombre de chimiokines comme les chimiokines appelés « *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted* », cytokines (l'interleukine-1 β ; IL-1 β), et d'autres molécules inflammatoires qui augmentent le recrutement des monocytes au site de la plaque. En outre, les plaquettes adhérentes peuvent libérer des facteurs de croissance, tels que les facteurs de croissance dérivés des plaquettes, qui peuvent améliorer l'angiogenèse et la prolifération des CMLs dans les plaques athérosclérotiques. De plus, les plaquettes peuvent également contribuer à l'athéromatose en augmentant l'instabilité de la plaque via le « *Cluster of differentiation 40 Ligand* » (CD40L) qui se lie aux CMLs, aux CEs et aux monocytes, et induit l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMPs) [143]. Ces MMPs possèdent une activité de collagénase et peuvent ainsi causer la dégradation du collagène de la matrice extracellulaire aboutissant alors à l'amincissement de la couche fibreuse et ils rendent par la suite la plaque instable. Une teneur accrue en collagène a été observée dans la matrice extracellulaire de la lésion athérosclérotique des modèles murins dans lesquelles la signalisation du CD40L a été interrompue [144, 145]. En outre, le CD40L joue un rôle important dans la formation du noyau nécrotique de la plaque athéromateuse par son induction des voies de signalisation pré-apoptotiques [143]. Par conséquent, les plaquettes à travers leur sécrétion de CD40L peuvent induire l'instabilité des plaques les rendant plus susceptibles à la rupture.

Chapitre 2 :
« Le CD40 Ligand »

2.1 Introduction :

Le CD40L, également connu sous le nom de CD154 ou gp39 [146], est une protéine transmembranaire de type II de 33 kDa appartenant à la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF). Le gène du CD40L code pour une protéine de 261 AA dont 22 AA forment le domaine cytoplasmique, 24 AA forment le domaine transmembranaire et 215 AA forment le domaine extracellulaire [146]. Le CD40L a été identifié en 1992 en tant que ligand du CD40 [143, 146]. Cette molécule a été initialement définie comme étant uniquement un modulateur immunitaire. En fait, l'interaction du CD40L avec CD40 était impliquée dans plusieurs processus immunitaires y compris la prolifération des cellules B, leur différenciation, la commutation isotypique, la régulation des molécules co-stimulatrices, l'activation des cellules présentatrices de l'antigène (APCs) ainsi que la modulation de l'amorçage des cellules T [147]. Cependant, d'autres études ont identifié un rôle plus large du CD40L. En effet, il s'est révélé que le CD40L et son récepteur CD40 sont exprimés sur les cellules immunitaires et non immunitaires et présentent également des propriétés biologiques importantes sur différents niveaux cellulaires, permettant ainsi à l'axe du CD40L de jouer un rôle dans le système immunitaire et inflammatoire. En outre, plus récemment, d'autres récepteurs du CD40L ont été identifiés, comme les intégrines α IIb β 3 et α 5 β 1 ainsi que le Mac-1 [148-150]. Ces récepteurs soulignent le rôle important du CD40L en tant que modulateur inflammatoire et vasculaire. Par conséquent, le CD40L est considéré, aujourd'hui, une molécule thrombo-inflammatoire due à son rôle important dans le système vasculaire et inflammatoire. Ce chapitre mettra en contexte l'expression du CD40L, ses différents récepteurs ainsi que son rôle physiologique et pathologique.

2.2 L'expression du CD40L et sa configuration

Le CD40L est constitutivement exprimé par une panoplie de cellules hématopoïétique et non-hématopoïétiques [146, 151-153]. Il peut être exprimé davantage suite à l'activation des cellules. Il est principalement exprimé par les lymphocytes T et les plaquettes exclusivement sous leur forme activée. Comme tout autre membre de la famille du TNF, le CD40L a été détecté sous une forme soluble (sCD40L), dont la principale source est les plaquettes activées [154]. En fait, le CD40L lié à la membrane cellulaire est clivé à la méthionine 113 du domaine extracellulaire et

libéré sous sa forme soluble [155-157]. Ce mécanisme de clivage est décrit en détail dans la section 3.4. Dans le système vasculaire, le CD40L est également exprimé par les CEs, les CMLs et les macrophages. En effet, ces dernières expriment le CD40L d'une façon constitutive. Cette expression est augmentée lorsque ces cellules sont stimulées par l'interféron- γ , l'IL-1 ou le TNF- α . Le CD40L est également exprimé par les neutrophiles. Cependant, son expression n'est pas augmentée dans les neutrophiles même lorsqu'elles sont activées [146, 151, 152, 158]. Le CD40L exprimé par les macrophages induit l'expression de B7.2 par les cellules B [159]. Les macrophages, les cellules B et les cellules dendritiques (DCs) expriment le CD40L sous sa forme membranaire, ainsi il n'est pas clivé à partir de ces cellules. Il est faiblement exprimé par les macrophages non activés, les neutrophiles et les CEs [158].

Quant à sa configuration, le CD40L actif, à la surface de la cellule ou sous sa forme soluble, est composé d'homo-trimères [160]. Cette conformation multimérique du CD40L est d'une importance cruciale pour une interaction efficace avec son récepteur, le CD40, et pour la signalisation intracellulaire subséquente [161]. De plus, les formes solubles du CD40L conservent leur capacité à former des trimères, qui lient le CD40 et déclenchent des signaux [161].

2. 3 Les récepteurs du CD40L:

Jusqu'à présent, on a identifié quatre différents récepteurs du CD40L: trois intégrines et son récepteur "classique"; CD40 (Figure 2.1). Les trois intégrines sont : la glycoprotéine plaquettaire α IIb β 3 (ou GPIIb/IIIa), connue comme étant le récepteur du fibrinogène et du VWF [162, 163]; l' α 5 β 1 (ou CD49e/CD29), une intégrine qui se lie aux macromolécules matricielles et aux protéinases et qui stimule ainsi l'angiogenèse [149, 150, 164]; et le Mac-1, une intégrine (également connue sous le nom de « *Complement Receptor 3* », CD11b/CD18 ou α M β 2), principalement exprimée par les neutrophiles, les cellules tueuses naturelles et les macrophages, qui déclenche des cascades de signalisation et qui joue un rôle dans l'inflammation [165].

L'interaction du CD40L avec l' α 5 β 1 est indépendante de sa liaison à l' α IIb β 3 et au CD40 [149, 164]. Les interactions entre le CD40L et l' α 5 β 1 ne sont pas pertinentes dans la physiologie et la physiopathologie plaquettaire [165]. Les quatre récepteurs du CD40L se distinguent par leurs différentes expressions cellulaires, leurs voies de signalisation, et leurs fonctions cellulaires.

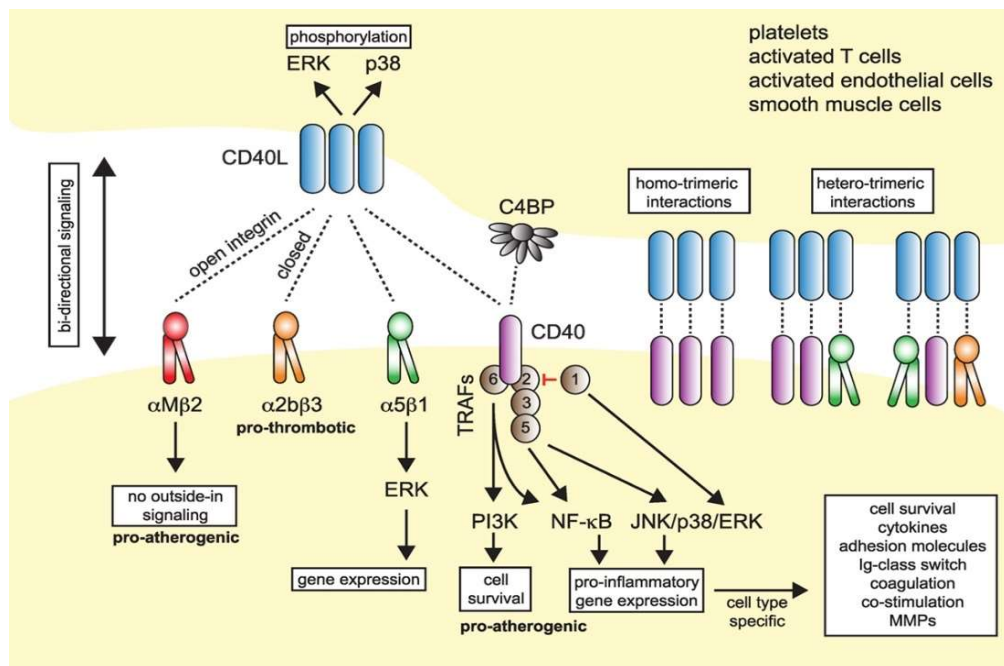


Figure 2.1 : Les quatre différents types de récepteurs du CD40L et leurs voies de signalisation subséquentes.[166]

2.3.1 Mac-1:

Mac-1 est un membre de la famille des $\beta 2$ -intégrines. C'est un hétérodimère qui est constitué de deux sous-unités: l'intégrine αM (CD11b) et l'intégrine $\beta 2$ (CD18). Mac-1 est exprimé par une variété de cellules incluant les cellules tueuses naturelles, certains sous-types des lymphocytes B, mais il est surtout exprimé par les cellules myéloïdes, telles que les monocytes, les macrophages et les neutrophiles [167, 168]. Cette intégrine interagit avec une large répertoire de ligands, y compris la glycoprotéine ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*) [167], le fibrinogène [169], la fibronectine [170], l'héparine [171], la GPIb α [172], et beaucoup d'autres ligands [173].

Mac-1 est impliqué dans l'inflammation, la défense de l'hôte, et la cicatrisation des plaies [174]. Cette intégrine joue également un rôle au niveau de l'interaction entre l'endothélium et les leucocytes et la promotion de la l'adhésion et la transmigration de ces derniers, favorisant ainsi le développement de l'athérosclérose [175]. La liaison du Mac-1 des macrophages favorise l'activation cellulaire, l'expression des gènes inflammatoires et participe à la phagocytose [174, 176, 177].

Intéressamment, il a été récemment démontré que le Mac-1 interagit avec le CD40L à travers un site spécifique de la sous-unité α M, qui diffère de ses autres sites de liaison et, par conséquent, est très sélectif pour le CD40L [150, 178]. Par contre, il existe toujours des résidus communs du CD40L impliqués dans la liaison de Mac-1 et de CD40 [179]. Bien que la plupart des ligands du Mac-1 induisent l'activation cellulaire, le CD40L peut se lier à l'intégrine sans induire une activation cellulaire [173]. Des études ont révélé que l'interaction CD40L/Mac-1 sert principalement d'adhésif; ainsi le CD40L exprimé sur les CEs activées se lie au Mac-1 des leucocytes roulants favorisant leur ferme adhésion [159, 176, 178].

2.3.2 α 5 β 1:

L'intégrine α 5 β 1 (ou VLA-5) est un hétérodimère constitué des sous-unités : α 5 (CD49e) et β 1 (CD29). Il sert de récepteur primaire pour la fibronectine et la vitronectine à travers la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) [180, 181]. α 5 β 1 est exprimé par les monocytes, les macrophages, les CEs ainsi que par les cellules stromales telles que les fibroblastes, les chondrocytes et les cellules synoviales [149]. La liaison de cette intégrine stimule la survie des cellules, la prolifération et l'expression des gènes inflammatoires [182]. Les CEs ont besoin d'un α 5 β 1 fonctionnel pour s'attacher, se propager, et proliférer dans la matrice extracellulaire [183]. De plus, α 5 β 1 joue un rôle dans l'angiogenèse [184].

Leveille et al. ont démontré que le CD40L est un ligand d' α 5 β 1, et que contrairement à la plupart des ligands de cette intégrine, le CD40L se lie à la conformation inactive d' α 5 β 1. La liaison du CD40L à l' α 5 β 1 induit les voies de signalisation ERK et l'expression de l'IL-8 par les monocytes humaines [149], similairement à la réponse provoquée par la liaison de la fibronectine à cette intégrine. En plus, des études récentes ont démontré que l'interaction CD40L/ α 5 β 1 est impliquée dans la production des cytokines et l'adhésion du CD40L exprimé par les cellules T avec les fibroblastes [185] et l'inhibition de l'apoptose dans les lymphocytes T [186]. Les sites de liaison du CD40 et d' α 5 β 1 avec le CD40L sont différents, permettant ainsi aux deux récepteurs de se lier simultanément aux trimères CD40L [149, 164]. Les inhibiteurs spécifiques de l'interaction CD40L/ α 5 β 1 et leur impact spécifique sur les pathologies cardiovasculaires n'ont pas encore été rapportées.

2.3.3 α IIb β 3 :

L'expression de l'intégrine α IIb β 3 (aussi nommée CD49b/CD61 ou GPIIbIIIa) est exclusive à la lignée mégacaryocytaire. Les plaquettes expriment α IIb β 3 sur leur surface et elles en emmagasinent d'autres dans leur granules- α et denses. Ceux-ci sont transférés à la surface cellulaire pendant l'activation plaquettaire et la dé-granulation [187]. La liaison du fibrinogène soluble et du VWF à l' α IIb β 3 favorise l'adhésion et l'agrégation des plaquettes [188]. La liaison de l' α IIb β 3 à son ligand se produit à travers un site spécifique dans la sous-unité α et β de l'intégrine [189]. L' α IIb β 3 constitue une cible pharmacologique importante afin de bloquer l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus ; parmi les antagonistes d' α IIb β 3 on peut citer l'abciximab, le tirofiban et l'eptifibatide [188]. Le site de liaison principal à l' α IIb β 3 dans le fibrinogène comprend un motif RGD. Ce motif est imité par le tirofiban et l'eptifibatide [190]. La liaison entre l' α IIb β 3 et son ligand est régulée par des changements de conformation qui résultent de l'activation des sous-unités α et β de l'intégrine et qui augmentent l'affinité de la liaison [127, 191]. Intéressamment, Andre et al. ont défini le CD40L comme étant un autre ligand de l' α IIb β 3. Celui-ci se lie à l' α IIb β 3 à travers son motif de liaison Lys-Gly-Asp (KGD) [148]. Cette liaison induit des cascades de signalisation dans les plaquettes qui impliquent p38 MAPK et ERK1/2 [148, 179, 192].

2.3.4 CD40 :

Le récepteur principal du CD40L est le CD40. C'est une protéine transmembranaire de type I de 48 kDa et un membre de la superfamille des récepteurs du TNF. Outre les cellules B, le CD40 est exprimé de manière constitutive et inductible par les cellules T, les DCs, les monocytes, les plaquettes, les macrophages, les CMLs, les CEs et les fibroblastes [193-195]. L'expression du CD40 est la plus élevée dans les DCs alors qu'elle est intermédiaire dans les cellules B et les plaquettes. Son expression est régulée par des signaux inflammatoires, notamment par les TNF- α , IL-1, IFN- γ , CD40L et d'autres [147, 165].

Il existe cinq isoformes distinctes du CD40 dont deux sont prédominantes chez l'homme et la souris [196-198]. L'isoforme 1 est un isoforme membranaire, mais qui peut être clivé en une forme soluble par la MMP, ADAM-17 (*a disintegrin and metalloproteinase-17*) [199]. En revanche, l'isoforme 2 est produit sous forme soluble résultante d'un épissage alternatif [200]. Bien

que le CD40 soit une protéine transmembranaire qui peut exister sous forme de monomère, dimère et trimère, seule cette dernière forme active complètement les cellules [201-203]. Parmi tous les récepteurs qui lient le CD40L, le CD40 présente la plus grande affinité pour le CD40L dans sa forme monomère, environ $\sim 0,5-7\text{nM}$ [204, 205]. Cependant son affinité est supérieure pour le CD40L dans sa forme trimère [206].

Suite à leur liaison au CD40L, les monomères de CD40 présents à la surface des cellules sont regroupés en trimères ; ce processus est supposé se produire plus fréquemment dans les radeaux lipidiques [201, 207]. Par conséquent, les facteurs associés au récepteur du TNF (TRAF), un groupe de protéines adaptatrices intracellulaires qui s'associent également aux récepteurs du TNF, aux récepteurs « *Toll-like receptors* » et aux récepteurs de l'IL-1, sont recrutés au domaine cytoplasmique du CD40 [208]. Ils activent ainsi des voies canoniques et non canoniques pouvant entraîner un engagement du NF- κ B, des MAPKs, de la PI3K, ainsi que de la PLC γ [143]. Les effets biologiques de la liaison du CD40 à son ligand incluent la survie cellulaire, la prolifération et l'expression inflammatoire des cytokines et des chimiokines [152, 209, 210].

Le CD40 peut avoir des effets distincts sur différents types de cellules. Ainsi, la liaison du CD40 sur les cellules B induit la prolifération, l'activation et la commutation isotopique de la classe IgG. Alors que l'effet de cette liaison dans les CEs et les fibroblastes est l'augmentation de l'expression des facteurs d'adhésion « *Vascular cell adhesion molecule-1* », ICAM-1 et E-sélectine [147]. Suite à sa liaison sur les CMLs et les CEs, le CD40 induit la libération des MMP-1, -2, -3 et -9 ; des molécules qui participent à la déstabilisation des plaques athérosclérotiques [147, 211]. En revanche, le CD40 semble avoir un rôle inhibiteur dans les cellules T puisqu'il empêche la libération de cytokines et l'activation des cellules T [212].

2.4 Le rôle physiologique et pathologique du CD40 Ligand :

2.4.1 Le rôle physiologique de l'axe CD40L/CD40 :

Le CD40 a été identifié pour la première fois comme étant un marqueur des cellules carcinomes. Il s'est ensuite révélé qu'il constitue une molécule clé exprimée par les CEs et la plupart des APCs, y compris les lymphocytes B, les monocytes et les DCs [213]. Son interaction avec le CD40L est nécessaire pour la réponse des cellules B aux antigènes dépendantes des

lymphocytes T [214]. En fait, des études sur des patients présentant une immunodéficience en Ac primaire ciblant le CD40 ou le CD40L ont montré que ces interactions sont nécessaires pour la formation des centres germinatifs (GCs) et la production des cellules B mémoires et des plasmocytes à longue vie [215]. Des données plus récentes sur les réactions des GCs et des cellules T folliculaires (TFH) montrent que la transformation des cellules T CD4⁺ en TFH est initiée par le contact avec les DCs à la périphérie des follicules des cellules B et maintenue par les GCs des cellules B [216]. De plus, l'expression de la protéine « *B-Cell Lymphoma 6* », le régulateur principal des TFHs, dépend des interactions CD40L/CD40 en dehors des follicules et au sein des GCs [217]. En fait, la signalisation du CD40L induite par CD40 dans les cellules B est cruciale pour induire l'expression de la protéine « *B-Cell Lymphoma 6* » dans les cellules B, permettant la prolifération de ces dernières et l'expression de la « désaminase de cytidine induite par activation », un facteur de transcription requis pour l'hypermutation somatique et le changement de classe des Ac. Les interactions CD40L/CD40 sont également nécessaires pour la sélection des clones de lymphocytes B exprimant une haute affinité au récepteur des cellules B qui a lieu dans les GCs. Dans des conditions physiologiques, seulement certains clones des cellules B se différencient en cellules B effectrices (cellules mémoires et plasmiques).

Le CD40 est également exprimé constitutivement par les DCs et les macrophages, et son activation induit l'expression d'autres molécules co-stimulatrices ainsi que la libération des cytokines modulant les réponses des lymphocytes T et B [218]. L'activation du CD40 sur les macrophages induit également la libération d'oxyde nitrique et des espèces réactifs à l'oxygène, contribuant à la destruction des agents pathogènes intracellulaires. Intéressamment, la signalisation de l'axe CD40L/CD40 dans les lymphocytes T-CD8⁺ les protège contre l'épuisement observé lors des infections virales chroniques. Cette signalisation est aussi importante pour maintenir la polyvalence des lymphocytes T-CD8⁺ [219]. Puisque le CD40 est exprimé sur divers lymphomes de types B et divers carcinomes (nasopharynx, vessie, col utérin, rein et ovaire), l'axe CD40L/CD40 semble être impliqué dans le contrôle de la croissance tumorale, et ainsi il peut être une cible thérapeutique intéressante [220].

2.4.2 L'axe CD40L-CD40 dans l'athérosclérose :

Actuellement, l'athérosclérose est connue comme étant une maladie inflammatoire dont les composantes étiologiques sont multifactorielles. Cette maladie se développe habituellement en réponse à l'activation de l'endothélium vasculaire en présence des facteurs de risque et aboutit à la formation d'une plaque athéromateuse dans la couche sous-endothéliale de la paroi vasculaire [221]. Cette plaque athéromateuse est caractérisée par l'accumulation de débris cellulaires, de lipides, de cellules, du calcium et des protéines matricielles extracellulaires [222]. Des études ont démontré que les CE vasculaires, les CMLs et les macrophages participent de manière importante à l'athérogenèse puisque l'expression de leurs molécules d'adhésion et/ou de la sécrétion de leurs cytokines au sein de l'athérome est augmentée [221]. Intéressamment, des preuves ont montré que l'axe CD40L/CD40 semble s'impliquer dans tous les stades de l'athérosclérose ; l'initiation de la plaque, sa progression et sa rupture. Cependant, la plupart des études ont mis l'accent sur l'interaction du CD40L avec son récepteur principal, CD40, alors que le rôle de ses autres récepteurs n'a pas été étudié d'une façon significative dans le système vasculaire.

2.4.2.1 Le rôle de l'axe CD40L/CD40 dans l'initiation de la plaque :

Au cours des premières étapes de l'athérosclérose, les études ont montré que l'expression du CD40 est augmentée dans les CE suite à leur exposition aux TNF- α , à l'IL-1, à l'IFN- β ou à l'IFN- γ sécrétés par les monocytes ou les cellules T activés [143]. En outre, il a été montré que la lipoprotéine de basse densité (LDL) oxydée induit l'expression du CD40 et du CD40L par les CE [223]. Des études ont montré également que les facteurs de transcription, NF- κ B, les activateurs de transcription-1 (« *Signal transducer and activator of transcription 1* »), les kinases activées par Janus 1 et 2, le facteur de régulation de l'interféron-1 et la PKC sont impliqués dans l'augmentation de l'expression du CD40 par les CE stimulées [223-225].

De plus, des études ont montré que la liaison du CD40 à son ligand augmente l'expression des molécules d'adhésion sur les CE, comme la E-sélectine, « *Vascular cell adhesion molecule-1* ou *VCAM-1* », et la ICAM-1 [143]. Les monocytes et les lymphocytes T sont ensuite recrutés à l'espace sous-endothélial pour initier la lésion athérosclérotique. Le CD40L membranaire ou celui libéré par les lymphocytes T ou par les plaquettes activées stimule la production de plusieurs chimiokines pro-inflammatoires par les CE, tels que l'IL-8, MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant*

Protein) et -3, *Macrophage Inflammatory Protein-3a*, les chimiokines « *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted* », IL-6, et IL-15 [143, 226-228]. L'IL-8 et les MCPs sont plus impliqués dans la transmigration des monocytes circulants et des neutrophiles à travers la couche endothéliale [228, 229]. Le processus inflammatoire induit dans les CEs via l'axe CD40/CD40L pourrait être médié par plusieurs familles de facteur de transcription telles que le NF- κ B, la protéine activatrice-1 et les STATs [226, 228]. En outre, des études ont montré que la liaison du CD40, avec la coopération du récepteur-1 de la lipoprotéine de basse densité exprimé par les CEs, induit la production de l'endothéline-1, un facteur vasoactif et mitogénique hautement impliqué dans l'athérosclérose [230]. Une découverte récente montre également que les interactions CD40L/CD40 sur les CEs contribuent à la dysfonction endothéliale [228].

2.4.2.2 Le rôle de l'axe CD40L/CD40 dans la progression de la plaque :

Dans l'espace sous-endothélial, le CD40 exprimé à la surface des macrophages interagit avec le CD40L exprimé sur les cellules T infiltrées, induisant la production d'une panoplie de molécules inflammatoires, telles que l'IL-1 β , IL-6, IL-12 et le TNF α [231], en plus de plusieurs MMPs, y compris MMP-1 et MMP-3. Les macrophages sous-endothéliaux expriment également le CD40L, induisant ainsi une activation autocrine [143]. En outre, l'interaction entre les CMLs CD40+, ayant migré du média à l'intima du vaisseau, et le CD40L membranaire ou soluble libéré dans la lésion, amplifie davantage la réponse inflammatoire. En effet, les CMLs stimulées par le CD40L produisent le MCP-1 et l'IL-8, via la voie de signalisation Src-MAPK, ainsi que l'IL-1 α et l'IL-6 [231, 232]. Tout cela contribue à la progression de la plaque athéromateuse. En outre, des études ont démontré que la stimulation des fibroblastes avec le CD40L augmente l'expression de leur molécule d'adhésion [233], contribuant ainsi à l'interaction entre les fibroblastes et les cellules immunitaires au niveau des sites de lésion [234]. De plus des études ont démontrées que les interactions CD40L/CD40 induisent la prolifération des fibroblastes et leur production de cytokines comme l'IL-6 et l'IL-8 [234], promouvant ainsi le développement de la plaque athéromateuse [235]. Cette plaque se développe en une plaque constituée de leucocytes infiltrés, de cellules spumeuses (macrophages activés contenant des LDL oxydées phagocytés), des CMLs proliférées et des protéines de la matrice extracellulaire [221].

2.3.2.3 Le rôle de l'axe CD40L/CD40 dans la rupture de la plaque :

Les plaques athéromateuses ont tendance à se rompre, dans les zones où l'équilibre entre les produits de la matrice extracellulaire et la sécrétion des MMPs sont perturbées [236, 237]. À ce niveau, le CD40L induit la production des MMPs à partir des CMLs, ainsi que des CEs et des macrophages dans la plaque athéromateuse [238]. En outre, il a été montré que le CD40L lié aux lymphocytes T ainsi que le sCD40L étaient capables d'induire une synthèse de novo et une expression des MMP-1, MMP-3 et MMP-9, et une activation de MMP-2, dans des CMLs humaines cultivées [239]. En plus, cette étude a également montré une co-localisation de MMP-1 et MMP-3 avec le CD40 dans les lésions fibreuses des artères carotides athérosclérotiques humaines [239]. De plus, le CD40L membranaire exprimé à la surface des plaquettes activées induit une augmentation de l'expression des MMPs par les CEs [240]. De même, il a été démontré que le CD40L lié aux monocytes/macrophages et le CD40L recombinant augmentent l'expression de l'ARNm, la production des MMPs et leurs activités protéolytiques [221].

Chapitre 3 :
“Le CD40L plaquettaire”

3.1 Introduction :

En 1998, on a découvert que les plaquettes expriment le CD40L sur leurs surfaces suite à leur activation. Cette découverte a été surprenante puisqu'on pensait que le CD40L caractérisait uniquement les cellules immunitaires, et que les plaquettes n'avaient pas de fonction immunitaire [241]. Le CD40L a ensuite été localisé dans le cytoplasme des plaquettes [242]. Des années plus tard, il a été démontré que cette molécule est emmagasinée, plus précisément, dans les granules- α des plaquettes [243]. Malgré le fait que les plaquettes sont des cellules anucléées dépourvues d'ADN [244], elles sont quand même capables de retro-transcrire l'ARN en utilisant le spliceosome [245]. Cela a mis en doute la possibilité que le CD40L soit produit de novo par les plaquettes activées. Or, récemment, certaines études montrent qu'on n'a pas trouvé l'ARNm du CD40L dans les plaquettes [246, 247]. Ces résultats suggèrent que cette protéine est synthétisée par les MKs et emmagasinée dans les granules- α avant la fragmentation des plaquettes [78, 248]. Dans ce chapitre, seront abordées une revue du CD40L plaquettaire, ses récepteurs et leurs voies de signalisation, son mode de clivage ainsi que l'effet inflammatoire et immunitaire de l'axe CD40L/CD40 spécifiquement.

3.2 Le CD40L plaquettaire :

Les plaquettes, au repos, expriment une très faible quantité de CD40L à leur surface, mais peuvent en exprimer des quantités importantes après leur activation. Suite à leur stimulation par différents agonistes, les plaquettes subissent un processus de dé-granulation. Ainsi, leurs granules- α fusionnent avec la membrane plaquettaire et présentent leur contenu de CD40L sur la surface. Ce processus a lieu durant les quelques minutes qui suivent la stimulation [241]. Le CD40L est donc exprimé à la surface des plaquettes uniquement après leur activation. Le CD40L ne reste pas longtemps à la surface des plaquettes. Celui-ci est clivé et libéré sous sa forme soluble et peut également être transporté à la surface des MPs dérivées des plaquettes [249]. En fait, les plaquettes constituent la source majeure du sCD40L dans la circulation [154, 250]. La concentration normale du sCD40L dans le sérum d'un adulte en bonne santé est estimé entre 0,79 et 4,7 ng/mL, mesuré par les techniques d'immunodosage [251].

Le CD40L des plaquettes est identique en termes de structure et de fonction physiologique au CD40L membranaire exprimé par les lymphocytes T activés et par les autres cellules. Ainsi, il

induit le recrutement et l'extravasation des leucocytes. A travers son récepteur principal CD40, il induit également la sécrétion des chimiokines ainsi que l'expression des récepteurs d'adhésion dans les CEs [241]. De plus, il induit la maturation des cellules dendritiques, la commutation isotypique des lymphocytes B et renforce aussi les réponses des lymphocytes T CD8+ [252-255]. Par conséquent, le CD40L plaquettaire constitue un lien puissant entre les plaquettes et le système immunitaire.

3.3 Les récepteurs plaquettaires du CD40L :

Les intégrines α II β 3, α 5 β 1 [149], et le récepteur principal CD40 [256] ont été identifiés comme les récepteurs plaquettaires du CD40L (Voir section 2.3). Il n'est pas tout à fait clair si le CD40L des plaquettes implique simultanément ces trois récepteurs identifiés ou pas. En revanche, le quatrième récepteur du CD40L, Mac-1 [150], n'est pas exprimé par les plaquettes. Les plaquettes expriment constitutivement le CD40 sur leurs surfaces [256]. Ceci est surprenant, car le CD40 a longtemps été considéré comme étant une caractéristique des APCs.

3.4 Le clivage du CD40L à partir de la surface plaquettaire:

Les connaissances concernant le clivage du CD40L, que ce soit à partir des lymphocytes T ou des plaquettes, restent incomplètes. En fait, le clivage du CD40L à partir des cellules CD40L+ semble dépendre du type de la cellule. Ainsi, les plaquettes et les lymphocytes T, par exemple, utilisent différentes protéases pour cliver le CD40L de leurs surfaces.

Le clivage du CD40L se fait par les MMPs. En fait, les MMPs constituent une grande famille de plus de 25 endopeptidases qui sont impliquées dans le clivage protéolytique de la plupart des protéines matricielles, ainsi que plusieurs protéines non matricielles y compris les cytokines, les chimiokines, les molécules d'adhésion et les récepteurs de surface [257].

Le clivage du CD40L de la surface des lymphocytes T a été attribué à deux types de MMPs. ADAM10 a été proposé comme un des candidats [258]. Ensuite, ADAM17 a été identifié comme un autre candidat dans un modèle in vitro de cellules T Jurkat E6.1, où l'inhibition des deux ADAM10 et ADAM17 a presque complètement inhibé le clivage du CD40L et sa libération des

cellules T, suggérant ainsi qu'aucun autre MMP, autre qu'ADAM10 et ADAM17, n'est impliqué dans ce processus [259].

Quant au mécanisme de clivage du CD40L plaquettaire, il semble être très différent. Non seulement les MMPs sont différentes mais aussi l'implication de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est nécessaire [260, 261]. Ainsi, les patients atteints de la thrombasthénie de Glanzmann (maladie hémorragique héréditaire rare due à un déficit en Glycoprotéine IIb/IIIa) ne sont pas capable de libérer correctement le sCD40L après une activation plaquettaire [260]. La MMP2 semble être le candidat principal, selon différentes approches expérimentales [260, 262]. De plus, plusieurs études ont confirmé l'implication d'une nouvelle MMP, la MMP9, dans un modèle de sepsis murin où elle était impliquée dans le clivage du CD40L suite à l'interaction plaquette-neutrophile [263-265]. Ainsi, le CD40L est clivé par les MMP2 et MMP9 de la surface des plaquettes alors qu'il est clivé par les ADAM10 et ADAM17 de la surface des lymphocytes T.

3.5 La signalisation du CD40L dans les plaquettes:

Le sCD40L active les plaquettes surtout à travers deux récepteurs indépendants ; le CD40 et l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$.

3.5.1 Signalisation à travers $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$:

Comme on l'a déjà mentionné, la formation et la stabilisation du thrombus se produit principalement suite à la liaison du sCD40L à l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et la phosphorylation subséquente de la tyrosine du domaine cellulaire de cette intégrine [148, 192]. Ces effets étaient absents lorsque les plaquettes étaient activées par un CD40L recombinant dépourvu du motif de reconnaissance KGD- β3 indiquant que la liaison du sCD40L à l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ se fait à travers ce motif. Cette liaison induit la formation du thrombus ainsi que l'étalement des plaquettes via la signalisation « *outside-in* » de l'intégrine suivant une boucle d'auto-amplification [154, 192]. Le sCD40L favorise le développement du thrombus en absence du CD40, suggérant que le sCD40L induit la thrombose et l'agrégation des plaquettes par sa liaison à l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ou l' $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, mais pas via le CD40. La liaison du sCD40L à l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ induit également la génération des MPs, notamment par la phosphorylation de la tyrosine-759 du domaine cytoplasmique de la chaîne β3 de l'intégrine [192]. De plus, cette liaison induit la phosphorylation de l'Akt et l'agrégation plaquettaire déclenchée par la

glycoprotéine VI d'une manière dépendante de la PI3K mais qui ne nécessite pas la sous-unité α de l'« *Inhibitor of NF- κ B Kinase* » [266].

3.5.2 Signalisation à travers CD40 :

Le sCD40L peut également activer les plaquettes via le récepteur CD40, présent sur la membrane des plaquettes [241, 256]. Dans ce cas, le mécanisme est indépendant de la signalisation « *outside-in* ». En fait, au sein de notre laboratoire, on a trouvé que l'activation de l'axe sCD40L/CD40 implique la voie de signalisation : TRAF2/Rac-1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)/p38 MAPK qui est dépendante du CD40 et qui déclenche la phosphorylation de I κ B- α (*NF- κ B inhibitor*) [267, 268]. Ainsi, l'interaction sCD40L/CD40 déclenche également l'activation de la voie de NF- κ B dans les plaquettes. Dans ce cas, le NF- κ B agit comme une molécule de signalisation et pas comme un facteur de transcription. I κ B phosphoryle le « *Synaptosomal-associated protein-23* » (SNAP-23), une protéine clé pour la fusion des granules- α avec la membrane plasmique [269]. Ainsi, le blocage de l'IKK- β inhibe la phosphorylation de SNAP-23 et prévient la formation du complexe récepteur de SNAP et la dé-granulation des plaquettes [269].

Le sCD40L induit l'activation des plaquettes, la sécrétion des granules- α et des granules denses [256], ainsi il augmente l'agrégation des plaquettes d'une manière dépendante du CD40 [267]. Par conséquent, un CD40L recombinant muté, dépourvu de son site de liaison au CD40 n'induit pas une activation plaquettaire [267]. De plus, la liaison du CD40 plaquettaire est responsable de la régulation de l'expression de la chimiokine plaquettaire ; le facteur plaquettaire 4 [270]. Un Ac inhibiteur du CD40 prolonge le temps de saignement [271]. Les études liées au CD40L plaquettaires suggèrent que le CD40 plaquettaire est nécessaire pour l'activation plaquettaire complète, alors que l' α II β 3 peut être dispensable de l'activation plaquettaire [256], bien que les preuves expérimentales sont contradictoires à cet égard [272]. Une explication potentielle de cela peut être que le blocage de l' α II β 3 peut annuler le clivage du CD40L et la libération du sCD40L [260]. Par la suite, les niveaux réduits du sCD40L limiteraient l'autostimulation possible des plaquettes par le sCD40L auto-exprimé [252, 256]. Donners et al. ont trouvé que chez les souris avec une inhibition génétique de l'axe CD40/TRAF-6, la formation du thrombus n'a pas été affecté [273], suggérant ainsi une participation des TRAF-2/3/5. En effet,

au sein de notre laboratoire, on a trouvé que la liaison du CD40 plaquettaire active TRAF-2, la GTPase Rac1, et p38 MAPK [267].

3.5.3 Signalisation à travers $\alpha 5\beta 1$:

Certaines études plus récentes suggèrent également l'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'activation plaquettaire médiée par le sCD40L. En fait, une étude a montré que les Ac bloquant l' $\alpha 5\beta 1$ empêchent l'activation plaquettaire induite par le sCD40L et diminuent l'expression de la P-sélectine et « *Procaspase Activating Compound-1* », l'épitope d'activation de l' $\alpha II\beta 3$ dans les plaquettes humaines [272]. Ceci augmente la possibilité qu'au moins $\alpha 5\beta 1$ et CD40, et peut-être partiellement $\alpha II\beta 3$, coopèrent dans l'activation plaquettaire induite par le sCD40L. Certaines observations ont soulevé la possibilité que la liaison du CD40L ne soit peut-être pas exclusive à certains récepteurs mais qu'elle se produise plutôt d'une manière hétérotrimérique, par laquelle le CD40L se lie simultanément à deux récepteurs ou plus [179].

3.6 Effets inflammatoires et immunitaires de la signalisation de l'axe CD40L/CD40 des plaquettes :

Dans le passé, il a été difficile d'attribuer aux CD40 et CD40L exprimés par les plaquettes un rôle dans l'athérosclérose à cause de la disponibilité limitée des modèles knock-out. Cependant, deux études récentes ont abordé cette question. En fait, suite au transfert des plaquettes CD40 -/- aux souris ApoE -/-, Gerdes et al. ont remarqué une inhibition, jusqu'à deux fois, de l'athérosclérose chez les souris ApoE -/- récipients comparé à ceux qui ont subi un transfert de plaquettes sauvages. Cet effet a été accompagné d'une réduction du nombre des macrophages et des neutrophiles dans les aortes athérosclérotiques des animaux ayant reçu les plaquettes CD40 -/-. Les auteurs ont douté du fait que cette diminution de l'accumulation des cellules myéloïdes dans la lésion était causée par une incapacité des plaquettes déficientes en CD40 à adhérer à l'endothélium et à recruter des leucocytes et/ou par la réduction des agrégats plaquettes-leucocytes. En effet, on a remarqué dans la même étude qu'un manque de CD40 diminue effectivement l'adhésion plaquettaire à l'endothélium carotidien ainsi que la formation des agrégats plaquettes-leucocytes [270].

Les souris déficientes en CD40 ont également démontré des complexes leucocytes-plaquettes réduits dans une autre étude [274]. La formation d'agrégats leucocytaires-plaquettaires (vraisemblablement par un mécanisme dépendant de la P-sélectine) a déjà été montrée pour améliorer le recrutement des leucocytes dans la plaque d'athérosclérose [139, 275, 276]. En outre, un transfert de plaquettes CD40L *-/-* a protégé contre l'athérosclérose par rapport aux plaquettes sauvages «ou *wild type* WT» dans une autre étude [277]. En conclusion, les deux études soulignent un rôle important de l'axe CD40L/CD40 dans les interactions leucocytes-plaquettes.

Au-delà de la promotion de l'agrégation leucocytaire-plaquettaire, Henn et al. ont démontré que le CD40L exprimé par les plaquettes active les CEs et stimule la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, tels que TNF- α et IL-1 β , ainsi qu'il augmente l'expression des molécules d'adhésion qui vont ultimement recruter les leucocytes [241, 252]. Intéressamment, d'autres études ont révélé que beaucoup d'effets pro-inflammatoires qui résultent des interactions plaquettes-endothélium durant l'inflammation dépendent de la signalisation CD40L/CD40 [278, 279].

Comme on l'a déjà mentionné, l'athérosclérose est partiellement entraînée par l'immunité adaptative, qui initie et maintient une réponse des cellules T aux autoantigènes dans la plaque [280]. Le CD40L est une molécule co-stimulante puissante qui est requise dans l'activation des lymphocytes B dépendante des cellules T. En effet, il a été montré que le CD40L plaquettaire est suffisant pour fournir un signal de co-stimulation pour induire l'immunité des cellules T et B dans le rejet de l'allogreffe, l'infection virale et bactérienne [253, 281, 282]. Cependant, l'impact spécifique du CD40L plaquettaire dans l'athérosclérose est largement inconnu.

Chapitre 4:

« Les Antiplaquettaires »

4.1 Introduction :

La thrombose artérielle constitue la cause principale du syndrome coronarien aiguë (ACS) et des événements athéro-thrombotiques qui suivent les interventions coronariennes percutanées (PCI) [283, 284]. En fait, l'adhésion, l'activation et l'agrégation des plaquettes au site de lésions vasculaires jouent un rôle central dans la formation des thrombus artériels. Par conséquent, la thérapie antiplaquettaire est à la base du traitement des patients atteints d'ACS ou qui ont subi des PCI [284] [285]. Ce processus implique ainsi plusieurs voies de signalisation plaquettaire, y compris la voie du TxA₂, de l'ADP et de la thrombine qui représentent des cibles pharmacologiques importantes (Figure 4.1) [284, 285].

Actuellement, on reconnaît quatre classes principales de traitements antiplaquettaires cliniquement disponibles par administration orale et intraveineuse [286, 287] :

1. L'inhibiteur de la cyclooxygénase (COX-1)
2. Les antagonistes des récepteurs de l'ADP (P2Y₁₂ et P2Y₁)
3. Les inhibiteurs de la glycoprotéine GPIIb/IIIa
4. L'inhibiteur du récepteur de la thrombine (PAR-1)

La figure ci-dessous résume les classes principales d'antiplaquettaires ainsi que leur mode d'action.

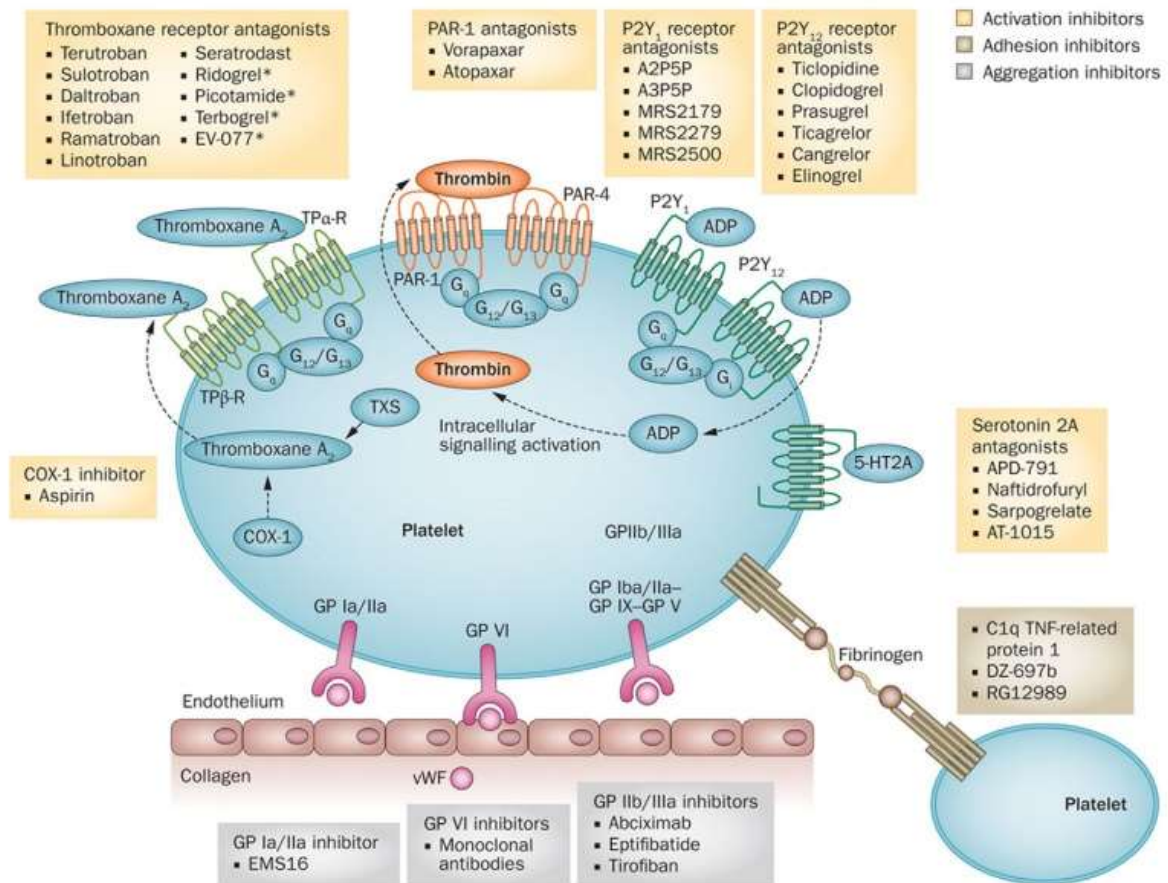


Figure 4.1 : Schéma représentant les différentes classes d'antiplaquettaires et leur mode d'action.[288]

Ce chapitre passera en revue l'ASA qui a été l'objet de notre étude. On s'attardera surtout sur sa pharmacocinétique et pharmacodynamie ainsi que sur le phénomène de la « résistance à l'aspirine » et les différents facteurs à la base de ce processus. On terminera avec une discussion sur les différents amorceurs plaquettaires qu'on pense qu'ils peuvent causer ce phénomène de résistance.

4.2 L'aspirine :

4.2.1 Histoire et définition :

L'ASA a été développée dans le 19ème siècle et a ensuite été commercialisée comme un traitement prophylactique. Au cours du 20ème siècle, on a découvert que cette drogue a également un effet anti-inflammatoire qui a été démontré à travers son inhibition de la COX affectant ainsi la synthèse de la prostaglandine [289]. Cependant, son effet cardio-protecteur n'a pas été établi qu'à

partir des années 1980s, lorsqu'on a découvert qu'il a démontré un taux de survie important suite à son administration après un infarctus du myocarde (MI) [290]. Ainsi, l'ASA s'est révélée très efficace dans la prévention secondaire des maladies cardiovasculaires [291].

Actuellement, l'ASA est l'antiplaquettaire le plus utilisé dans le monde entier comme prévention primaire et secondaire contre le MI et les AVCs [290, 292-294]. Une méta-analyse récente a indiqué que les patients vasculaires à haut risque traités avec de l'ASA ont eu une réduction de 34% du MI non fatal, une réduction de 25% des AVC et une réduction de 18% de la mortalité de toutes causes [294].

L'ASA est un inhibiteur non sélectif et irréversible de la COX. Elle empêche la production du TXA₂ des plaquettes à travers l'acétylation d'un résidu de sérine à la position 529 de l'isoforme COX-1 [295]. La COX-1 est l'enzyme qui catalyse la conversion de l'AA aux prostaglandines G₁/G₂, qui sont ensuite converti par le TX synthase en TXA₂ [296]. Une fois synthétisé et libéré par les plaquettes en réponse à différents stimuli, le TXA₂ se lie à son récepteur couplé à la protéine G (le récepteur TP) induisant ainsi l'activation de la PLC et donc l'agrégation plaquettaire [297]. Le TXA₂ induit un signal qui amplifie celui des autres agonistes plaquettaires, et donc l'inhibition de la COX-1 affecte plusieurs voies d'activation dans les plaquettes [298].

4.2.2 La pharmacocinétique et la pharmacodynamie de l'ASA :

Suite son administration orale, l'ASA traverse la muqueuse de l'estomac et de l'intestin grêle dans son état lipophile avec une biodisponibilité de 40 à 50% [299]. Avant d'entrer dans la circulation systémique, il subit une hydrolyse par les estérases du plasma et de l'endothélium pour produire l'acide salicylique [300]. Il a une demi-vie plasmatique d'environ 15-20 minutes (Figure 4.2) [301]. La circulation portale est l'endroit principal où l'inhibition de la COX-1 plaquettaire se manifeste; cela est démontré par une chute des taux sériques de thromboxane B₂ (TXB₂) détectable avant la détection de l'ASA dans la circulation systémique [299].

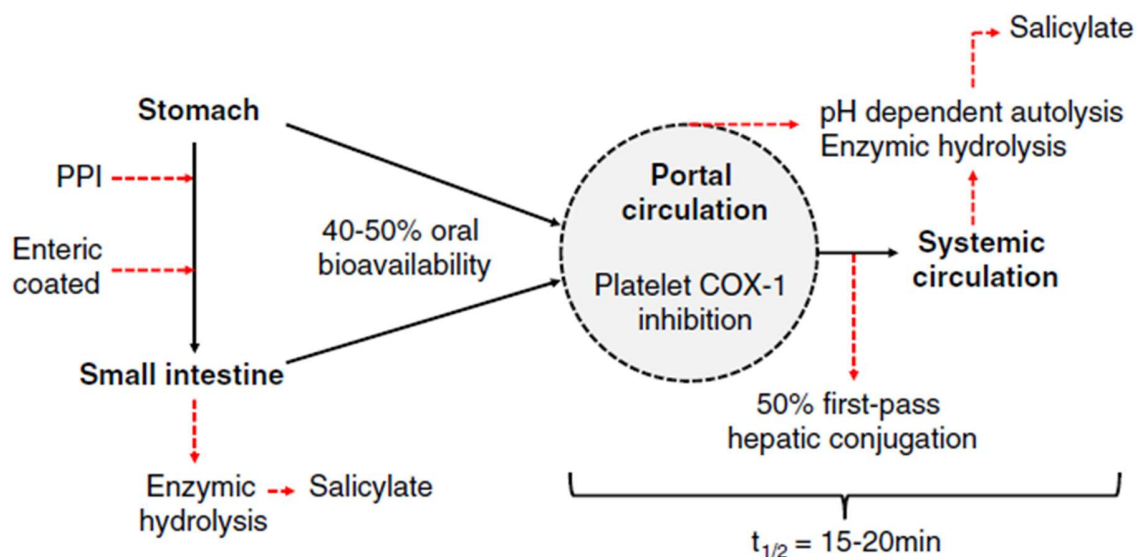


Figure 4.2: Le métabolisme de l'ASA : L'ASA est absorbée par l'estomac et l'intestin grêle, avec une biodisponibilité orale de 40 à 50%. La circulation portale est le lieu principal où l'inhibition de la COX-1 plaquettaire apparaît avant le métabolisme hépatique et l'inactivation du salicylate. [IPP = inhibiteur de la pompe à protons; $t_{1/2}$ = demi-vie].[302]

Une prise quotidienne de l'ASA a permis de réaliser une inhibition adéquate de la COX-1 plaquettaire chez les individus sains sensibles à l'ASA et chez ceux qui souffrent de maladies cardiovasculaires [303]. C'est peut-être surprenant puisque le temps normal de survie des plaquettes est de 10 jours et donc devrait théoriquement aboutir à environ 10% des plaquettes circulantes étant dépourvues d'ASA avant chaque dose quotidienne [304]. Cependant, la capacité de l'ASA à inhiber la COX-1 dans les MKs [305] est susceptible de causer la production de plaquettes dont la COX-1 est déjà inhibée, puisque les pro-plaquettes sont peu susceptibles de pouvoir régénérer la COX-1 normale avant leur libération dans la circulation [306].

La mesure dans laquelle la synthèse de la COX-1 plaquettaire et donc celle de TXA2 doit être inhibée avant que l'agrégation plaquettaire soit altérée reste un sujet de débat. Une observation indique que la capacité des plaquettes à générer le TXA2 in vitro dépasse largement la production systémique de TXA2 mesurée in vivo. Cette observation a suggéré que même s'il y a une inhibition importante de la COX-1 plaquettaire, il existe toujours une agrégation complète médiée par le TXA2 [307]. Des études plus avancées dans lesquelles on mesure les métabolites urinaires in vivo de TXA2 et on dose la réactivité plaquettaire ex-vivo ont conduit au développement de

‘l’hypothèse 95%’, qui indique qu’une inhibition de 95% de TXA2 dérivée de la COX-1 est nécessaire pour inhiber l’agrégation [308]. Cependant, un travail plus récent a révélé qu’il existe une relation linéaire entre l’inhibition de la génération de TXA2 plaquettaire et la suppression d’agrégation plaquettaire médiée par le TXA2 [309]. Ces résultats sont compatibles avec l’observation qui montre que la résistance à l’ASA n’est généralement pas un phénomène de « tout ou rien », mais c’est plutôt un spectre de réponse variable à l’ASA.

4.3 La résistance à l’aspirine :

Malgré son effet cardio-protecteur, l’ASA ne prévient qu’environ 25% des événements coronaires et des accidents ischémiques quand elle est utilisée comme prévention secondaire [310]. Ainsi, il est estimé qu’entre 5 et 60% des patients traités par l’ASA en prévention secondaire ne répondent pas de manière appropriée au traitement; un phénomène hétérogène qui est connu sous le nom de « résistance à l’aspirine » [311].

Le terme « résistance à l’aspirine » n’a pas été universellement accepté pour décrire l’échec de l’ASA à prévenir les événements athéro-thromboemboliques, car la majorité des mécanismes à la base de ce phénomène ne correspondent pas au modèle classique de résistance aux médicaments. Plus précisément, la cible pharmacologique COX-1 reste souvent sensible à l’ASA mais sa capacité à empêcher la production du TXA2 et réduire la réactivité plaquettaire est atténuée par de nombreux autres facteurs. Des termes alternatifs, tels que la « non-réponse à l’aspirine » et « l’échec du traitement par l’aspirine », sont donc favorisés par certains, mais ils sont aussi critiqués. En plus du désaccord sur la nomenclature, il y a également une discordance sur la classification de la résistance à l’ASA. Ainsi, celle-ci est classifiée entre « la résistance clinique » et « la résistance de laboratoire » [312] où cette dernière est définie comme étant l’échec de l’ASA à empêcher la production de TXA2 dérivé de la COX-1 plaquettaire. La résistance de laboratoire est généralement évaluée soit par la mesure des métabolites, comme le TXB2, ou par le test de la fonction plaquettaire. Dans ce qui suit on décrira quelques facteurs fréquents qui sont à la base de la « résistance à l’aspirine ».

4.4.1 Polymorphisme de la COX-1 :

La COX-1 est très polymorphe ; on lui a identifié 10 variations naturelles qui résultent de substitutions ponctuelles d'un seul nucléotide. Le polymorphisme le plus largement étudié est le « C50T » ; sa fréquence allélique est d'environ 20% [313]. Plusieurs études ont été menées afin de vérifier s'il existe une association entre la résistance à l'ASA et le polymorphisme de la COX-1, mais une méta-analyse a conclu qu'il n'y avait pas d'association significative [314]. Cette méta-analyse a également suggéré une association génétique possible entre la résistance à l'ASA et le polymorphisme P1A1/A2 de la GPIIIa, dont la fréquence dans la population de race blanche est de 0,15 [315]. Une analyse statistique de dix études sur 19 a démontré que le polymorphisme de la COX-1 était associé de manière significative à la résistance à l'ASA chez les sujets sains mais pas lorsque ces études ont été combinées avec ceux des personnes ayant une maladie cardiovasculaire [314]. De plus, la présence et l'ampleur de la corrélation dépend de la méthode utilisée pour définir la résistance à l'ASA. Cependant, le mécanisme par lequel le polymorphisme P1A1/A2 peut contribuer à la résistance de l'ASA demeure pas clair [316].

4.4.2 La régénération de la COX-1 plaquettaire :

4.4.2.1 La synthèse De novo de la COX-1 :

La liaison irréversible de l'ASA à la COX-1 et l'incapacité des plaquettes anucléées à régénérer l'enzyme constituent les éléments principaux de l'effet cardio-protecteur de l'ASA. Cependant, on a découvert que les plaquettes ont non seulement la capacité de synthétiser des protéines de novo, mais elles le font en réponse à des stimuli externes dans le cadre de leur fonctionnement normale [3]. Ainsi, la régénération de la COX-1 plaquettaire a été observé in vitro en réponse à une stimulation par la thrombine et le fibrinogène [317]. Donc, on suppose que la synthèse de novo de la COX-1 pourrait être l'un des contributeurs à la résistance à l'ASA.

4.4.2.2 Renouvellement rapide des plaquettes :

Un renouvellement rapide des plaquettes peut résulter d'une mégacaryocytopoïèse anormale (comme la thrombocytémie essentielle) ou d'une inflammation. Ainsi, on remarque une certaine résistance à l'ASA chez les patients qui ont un renouvellement rapide des plaquettes. Dans le cas de la TE, deux prises par jour de 100 mg d'ASA se sont révélées plus efficaces qu'une fois par jour de 100 mg ou 200 mg [318]. Dans une population de patients atteints d'athérosclérose, le

nombre des plaquettes immatures est proportionnel à la réduction de l'efficacité de l'ASA [319], avec une posologie de deux fois par jour d'ASA semblant améliorer le test de la fonction plaquettaire chez les patients atteints de diabète sucré de type 2 [320].

4.4.3 La production de TxA_2 indépendamment de la COX-1 :

4.4.3.1 La COX-2 :

À part la COX-1, qui est exprimée de manière constitutive dans la plupart des tissus et qui domine la production des prostanoides, l'isoforme inducible de la COX ; la COX-2 contribue également à la production des prostanoides en période de stress (durant l'inflammation par exemple). Il y a une homologie de 63% entre la séquence des deux isoformes [321]. La COX-2 peut se lier à une plage plus large de substrats d'acide gras que celle de la COX-1 qui est largement limitée à l'AA [322]. Cette différence de séquence a fait en sorte que la COX-2 est environ 170 fois moins sensible que la COX-1 à l'action de l'ASA [323].

4.4.3.2 La production du TxA_2 plaquettaire indépendamment de la COX :

La PGH₂ plaquettaire peut être utilisé par les CEs [324], les CMLs vasculaires [325] et les lymphocytes [326] pour synthétiser des concentrations physiologiquement pertinentes de la prostanoid inhibitrice PGI₂. On pensait que ce transport était unidirectionnel jusqu'à ce qu'on a découvert que les plaquettes peuvent également utiliser l'AA dérivé des lymphocytes [327] ainsi que la PGH₂ dérivée des CMLs en comme substrats pour la synthèse du TxA_2 [328]. Ainsi, les plaquettes peuvent obtenir du PGH₂ via un mécanisme indépendant de la COX, et par la suite l'action de l'ASA peut être efficacement contournée. Les mécanismes à la base de cette résistance à l'ASA restent incertains jusqu'à présent.

4.4.4 Le TxA_2 non-plaquettaire :

Les plaquettes ne sont pas la seule source de TxA_2 dans la circulation, puisqu'une observation a démontré que chez les sujets sains environ 30% des métabolites urinaires de TxA_2 proviennent des sources qui ne sont pas inhibé par le traitement à l'ASA [329]. En fait, les monocytes produisent également le TxA_2 en réponse à différents stimuli [330] dans un processus dépendant de la COX-1 et qui est peu sensible à l'inhibition de l'ASA [331]. De même, la COX-1 est exprimée constitutivement dans les CEs ainsi que les CMLs des vaisseaux sanguins [332]. Ainsi la diminution de l'efficacité de l'ASA dans ces cellules peut être due à la courte demi-vie de

l'ASA dans le plasma et la capacité de ces cellules nucléées à régénérer l'enzyme, ainsi que la faible biodisponibilité systémique de l'ASA (surtout les faibles doses actuellement utilisées comme cardio-protection) suite à son administration par voie orale.

Il existe également une contribution potentielle de la COX-2 extra-plaquettaire à la synthèse du TXA₂, étant donné que la COX-2 est exprimée au sein des plaquettes [333] et que l'expression de la COX-2 est augmentée dans les monocytes circulants des individus ayant des facteurs de risque cardiovasculaires [334]. Comme dans les plaquettes, les COX-1 et COX-2 des monocytes semblent s'associer préférentiellement avec le TX synthase et la prostaglandine synthase respectivement [331]. Les personnes qui fument mais qui sont autrement en bonne santé sont considérés un bon modèle pour étudier la contribution relative des isoformes de la COX à la synthèse systémique du TXA₂, car ils ont des métabolites urinaires supérieurs aux témoins non-fumeurs [335]. Cette augmentation est principalement abolie par l'ASA à faible dose, ce qui suggère que ceci est largement dérivés des plaquettes [335]. Mais après l'inhibition *in vivo* de la COX-2, on observe une réduction de 21% des métabolites [336]. Ces résultats mettent en évidence la difficulté d'attribuer d'une manière exacte les mesures, *in vivo*, de la synthèse de TXA₂ à l'action de l'ASA sur la COX-1 des plaquettes.

4.4.5 L'interaction médicamenteuse :

L'action antiplaquettaire de l'ASA peut être atténuée par des composés qui bloquent sa capacité à acétyler le site de liaison de la COX-1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs) se lient à la COX avec une sélectivité à l'isoforme qui varie considérablement dans cette classe de médicaments étendue, atteignant 70–90% de l'inhibition de la COX aux doses analgésiques classiques [337]. La demi-vie plus longue et la plus forte affinité à la COX de la plupart des NSAIDs comparés à l'ASA produisent une interaction compétitive entre l'ASA et les NSAIDs [338].

L'ibuprofène, un inhibiteur réversible et non sélectif de la COX, altère considérablement l'efficacité de l'ASA si elle est prise avant l'ASA par des sujets en bonne santé. Après un traitement de six jours de 400 mg d'ibuprofène pris 2 heures avant la prise de 81 mg d'ASA, l'inhibition de la TXB₂ sérique s'est révélée être réduite 24 heures après l'administration de la dose par rapport au régime inverse ($53 \pm 7\%$ vs $99 \pm 3\%$; $p < 0,001$) [339]. De même, une réduction importante de

l'inhibition de l'agrégation plaquettaire a été observée ($2 \pm 1\%$ vs $98 \pm 1\%$ inhibition de l'agrégation ; $p < 0,001$) lorsque l'ibuprofène était pris avant l'ASA.

Les conséquences cliniques de ces interactions ont été explorées chez une cohorte de 7107 patients sortis à la suite d'une admission contre les maladies cardiovasculaires et la prise d'ASA à faible dose [340]. Les patients prenant à la fois de l'ASA et de l'ibuprofène ont présenté une augmentation de mortalité cardiovasculaire. Intéressamment, ni cette étude ni l'étude précédente n'ont démontré une atténuation *in vitro* ou *in vivo* de l'effet de l'ASA lorsqu'il est pris en association avec le diclofénac (une autre classe NSAIDs), renforçant ainsi la notion de variabilité de cette interaction selon la classe de drogue. Globalement, les données provenant d'essais contrôlés randomisés soutiennent l'affirmation que l'ibuprofène atténue les effets inhibiteurs de l'ASA [341, 342].

4.5 Les amorceurs des plaquettes:

Outres les facteurs contribuant au phénomène de « résistance » ou de « non-réponse » décrits précédemment, on a remarqué que certains patients "résistants" à la thérapie antiplaquettaire présentent souvent une hyperactivité plaquettaire et des niveaux anormaux de « *primers* » ou amorceurs plaquettaires dans leur circulation. Les amorces plaquettaires ne peuvent pas stimuler l'activation plaquettaire, mais, en combinaison avec un stimulus physiologique, augmentent significativement la fonction plaquettaire. Donc on soupçonne que ces amorces pourraient aussi causer une certaine « résistance » au antiplaquettaires.

Les amorces plaquettaires peuvent être classées en plusieurs catégories: protéines, hormones, ions, prostaglandines et substances diverses.

4.5.1 Gas6:

Gas6 est une protéine dépendante de la vitamine K, trouvée dans les granules α des plaquettes et sécrétée suite à leur activation [343, 344]. Gas6 joue le rôle d'une amorce plaquettaire en augmentant l'agrégation plaquettaire et la sécrétion des granules en réponse aux agonistes plaquettaires [345]. Les plaquettes des souris « Knock out » Gas6^{-/-} sont normales en nombre et en forme, mais n'agrègent pas en réponse à des faibles doses d'agonistes et forment de plus petits thrombus pathologiques comparées aux souris Gas6^{+/+}. Par contre, suite à l'administration de Gas6 recombinant, la formation du thrombus est rétablie [344]. De même, les souris dépourvues

du récepteur de Gas6 (Gas6-Rs^{-/-}) présentent le même défaut thrombotique que les souris Gas6^{-/-} [346]. Chez les humains on appelle "pseudo-résistance à l'aspirine" toute agrégation plaquettaire qui persiste malgré l'inhibition de production de TxA₂ par l'ASA. Cette pseudo-résistance a été observée de 9 à 10 fois plus importante chez les sujets sains dont le niveau de Gas6 est élevé. Ainsi, on suggère que cette augmentation de Gas6 pourrait affecter l'activation des plaquettes même en inhibant une voie d'amplification majeure, comme celle de la TxA₂ [347]. De plus, un polymorphisme du gène Gas6 était associée à l'incidence d'AVC [348], suggérant un lien entre cette protéine et l'athéro-thrombose. Moins de 1% du Gas6 présent dans le sang est présent dans les plaquettes, ce qui suggère que toute potentialisation plaquettaire est à cause du Gas6 de la circulation [349].

4.5.2 Métallo-protéinase matricielle -2:

Comme déjà discuté, les MMPs constituent une classe d'enzymes qui dégrade plusieurs protéines de la matrice [350]. Dans le système cardiovasculaire, ces protéines participent dans le remodelage tissulaire, par exemple après un MI, et dans la progression d'athérosclérose. Comme on a déjà mentionné, les plaquettes humaines contiennent les MMP-2 dans leur cytosol et les secrètent suite à l'agrégation [351, 352]. Les MMP-2 amplifient l'agrégation plaquettaire déclenchée par plusieurs agonistes [351, 353] en potentialisant l'activation de la PI3K [353]. Cette amplification persiste malgré l'inhibition exercée par l'ASA ou par les antagonistes des récepteurs d'ADP [353], suggérant ainsi que la MMP-2 pourrait jouer un rôle dans la résistance à l'ASA ou aux thiéno-pyridines. Les plaquettes des souris MMP-2 "*Knock Out*" (MMP-2^{-/-}) sont normales en tant que morphologie et nombre, mais montrent une agrégation et une expression de P-sélectine défectueuses en réponse à de faibles doses d'agonistes. Elles montrent aussi une adhérence réduite en présence de forces de cisaillements élevés. Les souris MMP-2^{-/-} présentent une formation de thrombus pathologique nettement réduite, mais celle-ci est rétabli par l'injection de pro-MMP-2. Chez l'homme en bonne santé, les plaquettes libèrent la MMP-2 dans les sites de dommages vasculaires, et un traitement d'ASA n'inhibe pas cette sécrétion [354]. De plus, des prélèvements sanguins de l'aorte et le sinus coronaire des patients souffrant d'angine instable a montré que la MMP-2 est libérée dans la circulation coronaire, simultanément à d'autres protéines plaquettaires, suggérant que la MMP-2 est secrété par les plaquettes activées durant la formation du thrombus. La MMP-2 plasmatique est secrétée également par d'autres sources que les plaquettes, comme

l'endothélium, les athéromes rompus et les CMLs. Intéressamment, un promoteur de la MMP-2 était associé à la maladie coronarienne à trois vaisseaux [355], suggérant ainsi un rôle de celle-ci dans l'athéro-thrombose.

4.5.3 Leptine:

La leptine est protéine de 167 AA [356] synthétisée et libérée par le tissu adipeux et qui informe le cerveau du niveau de gras corporelle et participe à l'angiogenèse [356] et à l'athérogenèse [357]. Les plaquettes expriment le récepteur de la leptine sur leur surface [358]. La leptine potentialise l'agrégation, la génération de la TxB₂ et l'activation du récepteur αIIbβ₃ en réponse à divers agonistes [359]. Les concentrations de la leptine amorçant l'agrégation plaquettaire correspondent à ceux trouvés dans le sang des personnes obèses [360]. L'agrégation plaquettaire induite par l'ADP est liée aux concentrations de leptine chez les sujets diabétiques [361].

4.5.4 Prostaglandine E2 (PGE2):

Comme on l'a déjà mentionné, lors de l'activation plaquettaire, l'AA est libéré des phospholipides membranaires des plaquettes et métabolisé par la COX, produisant ainsi la prostaglandine PGG₂ et la PGH₂; la PGH₂ est ensuite transformée non seulement en TxA₂ mais aussi en PGD₂, PGF_{2a} et PGE₂ [362]. La PGE₂ est également produite par d'autres cellules du sang, y compris les monocytes. Il a été démontré que des faibles concentrations de PGE₂ potentialisent l'agrégation plaquettaire en augmentant l'activation de la PKC [363] et en inhibant l'AC [364]. Plusieurs sous-types de récepteurs de la PGE₂ existent, et les effets de la PGE₂ sur les plaquettes sont médiés par la EP₃ [363, 364]. Les souris déficientes en EP₃ ont une légère prolongation du temps de saignement [364] mais la formation de thrombus pathologique est fortement altérée [365, 366]. En plus, la PGE₂ présente dans les plaques athéromateuses, potentialise l'activation des plaquettes [366]. Une augmentation de la sécrétion de PGE₂ par les plaquettes chez certains patients réduit l'effet antiplaquettaire des inhibiteurs de la TxA₂ synthase [367].

4.5.5 Lipoprotéines de basse densité :

L'hyperlipidémie et le stress oxydatif sont associés à une augmentation de la réactivité plaquettaire, de l'activation plaquettaire *in vivo* et du risque cardiovasculaire [140]. Récemment, les produits athérogènes de l'oxydation des LDL agissent comme ligands pour le récepteur CD36 (ou GPIV) présent sur les plaquettes [368]. Les plaquettes CD36⁺ subissent une agrégation complète en réponse à des concentrations sub-optimales d'agoniste dans le plasma hyperlipidémique *in vitro*. Les souris « *knock out* » CD36^{-/-} étaient protégées contre la thrombose associée à l'hyperlipidémie, mais pas contre la thrombose dans un milieu normolipidémique; cela est expliqué par le fait que la concentration d'oxPCCD36 dans le plasma hyperlipidémique était jusqu'à 40 fois plus élevé que dans le plasma normolipidémique [368]. Dans des conditions pathologiques, les ligands du CD36 sont susceptibles d'être présentés à la surface des plaquettes bien avant les agonistes plaquettaires. Ainsi, le CD36 pourrait servir à amorcer ou à sensibiliser les plaquettes pour une activation ultérieure [368].

4.5.6 Le CD40L soluble :

Comme on l'a déjà mentionné, le CD40L joue un rôle dans le système inflammatoire. De plus, le sCD40L se lie à l'intégrine α IIb β 3 sur les plaquettes activées et favorise la stabilisation du thrombus. Ainsi, les souris CD40L^{-/-} montrent une occlusion retardée après une lésion vasculaire et la stabilité du thrombus formé est diminuée. Cependant, l'administration de sCD40L recombinant rétablit une réponse thrombotique normale [148].

Le sCD40L est libéré chez l'homme, *in vivo*, dans des conditions thrombotiques, bien qu'il atteigne des concentrations circulantes inférieures à celles requises, *in vitro*, pour potentialiser les plaquettes. Cependant, le microenvironnement qui se forme entre les plaquettes agrégées pourrait permettre d'atteindre des concentrations locales potentialisatrices [369]. Une augmentation de l'expression de CD40L sur les plaquettes est associée avec l'athérosclérose et la maladie coronarienne, et un taux de sCD40L élevé est associé à une augmentation du risque de développer une maladie cardiovasculaire [370]; il n'est toutefois pas encore clair si l'augmentation du sCD40L est une cause du risque accru ou simplement un marqueur d'activation *in vivo* des plaquettes.

Chapitre 5 :
« Projet de recherche »

5.1 Problématique :

Les plaquettes jouent un rôle clé dans les maladies cardiovasculaires puisqu'elles induisent des réponses thrombo-inflammatoires qui amplifient l'athérosclérose et engendrent la thrombose [371, 372]. En fait, ces maladies cardiovasculaires sont principalement causées par l'athérosclérose des artères coronaires et ses complications cliniques ultérieures; notamment la cardiopathie ischémique, l'ACS, l'IM et les AVCs [175]. Par conséquent, les agents antiplaquettaires sont au centre de la prévention secondaire des maladies cardiovasculaires [373]. L'ASA est le médicament le plus utilisé pour la prévention de ces maladies; il réduit le risque d'IM, d'AVC et de décès chez une bonne partie de patients à risque élevé de développer de futurs événements cardiovasculaires [294, 374]. Cependant, l'ASA ne prévient qu'environ 25% des événements coronaires et des accidents ischémiques cérébraux quand il est utilisé en prévention secondaire [310].

L'ASA agit en inhibant de manière irréversible l'enzyme COX-1 en acétylant le résidu sérine en position 529. L'enzyme COX-1 catalyse la conversion de l'AA en PG G1/G2, qui sont ensuite converties par le TX synthase en TxA₂ [295]. Malgré leur traitement par l'ASA, des événements thromboemboliques sont observés chez un grand nombre de patients non-répondants à l'ASA suivant un phénomène qu'on appelle « résistance à l'aspirine ». Plusieurs facteurs pourraient être à l'origine de cette résistance; le polymorphisme de la COX-1, les interactions médicamenteuses, la pharmacocinétique de l'ASA [302] et des causes encore inconnues.

Les patients atteints de maladies inflammatoires présentent des taux d'accidents cardiovasculaires ischémiques plus élevés que prévu. Ces accidents ne sont pas attribués aux facteurs de risque traditionnels, mais plutôt à des stimuli inflammatoires qui déclenchent des voies contribuant à la pathogenèse de l'athérosclérose [222, 375]. À cet égard, le médiateur thrombo-inflammatoire CD40L et son récepteur classique CD40, des molécules clé dans l'immunité

humorale, ont suscité une attention particulière due à leur implication dans la pathogenèse de l'inflammation, de l'athérosclérose et de la thrombose [165, 182, 376]. Parallèlement, les patients résistants au traitement antiplaquettaire présentent un phénotype de plaquettes hyperactives [377, 378], qui peut être induit par des taux élevés d'amorceurs en circulation [379-381]. Les amorceurs plaquettaires ne stimulent pas l'activation plaquettaire mais, quand ils sont associés à des stimuli physiologiques, augmentent significativement la fonction plaquettaire [382]. Un de ces amorceurs remarquables est le CD40L [256, 383].

Le CD40L est exprimé par une large gamme de cellules, principalement les cellules T et les plaquettes [165]. Comme tout autre membre de la famille des TNF, le CD40L a une forme soluble (sCD40L) principalement produite par les plaquettes. On pensait initialement que cette molécule était uniquement impliquée dans les réponses immunitaires et inflammatoires [146], car elle était principalement exprimée par les cellules immunitaires [241]. Cependant, le CD40L a un rôle beaucoup plus large puisque ses récepteurs s'expriment sur diverses cellules du système vasculaire [182] [241] et que l'axe CD40L/CD40 a un rôle thrombo-inflammatoire, qui intervient à toutes les stades de plusieurs maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose [384] et la resténose [385].

Au sein de notre laboratoire, nous avons déjà montré que le sCD40L exacerbait l'activation et l'agrégation plaquettaires par les voies de signalisation CD40/TRAF-2/Rac-1/p38-MAPK [267]. Plus récemment, nous avons également montré que l'action d'amorçage du sCD40L sur les plaquettes implique le NF- κ B [268] d'une façon dépendante de son récepteur principal le CD40 et de la kinase 1 activée par TGF- β (TAK1) [386].

Puisque le sCD40L joue un rôle important en tant qu'amorceur plaquettaire par sa potentialisation de l'activation et de l'agrégation des plaquettes en réponse à des concentrations

sub-optimales d'agonistes [267, 268, 386], l'étude de son effet sur l'efficacité de l'ASA favoriserait la compréhension du phénomène de la « résistance » et peut être y remédier, en proposant des traitements accessoires basés sur l'inhibition de l'axe sCD40L/CD40 plaquettaire.

5.2 Hypothèse et Objectifs :

Hypothèse principale : L'ASA réduit l'effet d'amorçage du sCD40L sur les plaquettes.

Objectifs spécifiques :

- I. Déterminer l'effet de l'ASA sur l'agrégation plaquettaire en présence de sCD40L.
- II. Déterminer l'effet de l'ASA sur la sécrétion de la TxA2 en présence de sCD40L.
- III. Déterminer l'effet de l'ASA sur la signalisation plaquettaire induite par le sCD40L.

5.3 Contribution scientifique :

5.3.1 Résumé de l'article :

Le traitement antiplaquettaire à l'aspirine (ASA) est moins efficace chez certains patients coronariens, ce qui augmente leur risque de développer une thrombose. Des taux sanguins élevés de médiateurs thrombo-inflammatoires, tels que le sCD40L, peuvent expliquer de telles variabilités. Nous avons émis l'hypothèse que, en présence de taux élevés de sCD40L, l'efficacité de l'ASA peut être réduite. Ainsi, nous avons visé à déterminer les effets de l'ASA sur la signalisation et l'agrégation des plaquettes en présence de sCD40L.

Les effets de l'ASA sur les plaquettes humaines traitées par le sCD40L, en réponse à des concentrations sub-optimales de collagène ou de thrombine, ont été évalués sur l'agrégation, la

sécrétion de TxA₂ et la phosphorylation de la p38-MAPK, le NF-κB, la kinase activée par le TGF-β 1 (TAK-1) et la chaîne légère de la myosine (MLC). Le sCD40L a significativement augmenté la sécrétion de TxA₂ dans les plaquettes, en réponse à des doses sub-optimales de collagène et de thrombine, ce qui a été inversé par l'ASA. L'ASA n'a pas inhibé la phosphorylation de p38-MAPK, NF-KB, TAK-1, que ce soit avec une stimulation par le sCD40L seul ou en présence des agonistes plaquettaires. Cependant, Le sCD40L a potentialisé l'agrégation plaquettaire, un effet complètement inversé et partiellement réduit par l'ASA en réponse au collagène et à la thrombine, respectivement. Les effets de l'ASA sur les plaquettes traitées par le sCD40L et stimulées par le collagène étaient liés à l'inhibition du changement de forme des plaquettes et la phosphorylation de la MLC.

L'ASA n'affecte pas la signalisation du sCD40L dans les plaquettes, mais empêche son effet sur la sécrétion de TxA₂ et l'agrégation plaquettaire en réponse au collagène, via un mécanisme impliquant l'inhibition de la MLC. Le ciblage de l'axe sCD40L dans les plaquettes peut avoir un potentiel thérapeutique chez les patients, présentant des taux élevés de sCD40L, qui ne répondent pas ou moins à l'ASA.

5.3.2 Contributions des auteurs :

Mira Mohsen : Planification et exécution des expériences de l'ELISA (figure 1), de Western Blot (figures 2 et 3) et d'agrégation plaquettaire (figures 5 et 6). Rédaction et modification de l'article.

Kevin Kojok : Planification et exécution des expériences de Western Blot (figures 4, 7 et 8). Rédaction et correction de l'article.

Walid Mourad : Apport intellectuel, analyse des résultats.

Yahye Merhi : Direction générale. Conception de l'étude, apport intellectuel, analyse des résultats et correction de l'article.

5.3.3 Aspirin reduces the potentiating effect of CD40L on platelet aggregation via inhibition of myosin light chain

Running title: ASA in CD40L-primed platelets

Kevin Kojok^{* 1,2}, Mira Mohsen^{* 1,2}, Walid Mourad², Yahye Merhi^{1,2}

¹Laboratory of Thrombosis and Haemostasis, Montreal Heart Institute, Research Centre, 5000 Belanger Street, Montreal, QC, H1T 1C8, Canada.

²Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.M. (email: yahye.merhi@icm-mhi.org)

*: Both authors contributed equally to this work.

Keywords: Platelets; CD40L; Aspirin; Thromboxane A₂

Word Count: 3128 words

BACKGROUND AND PURPOSE: Antiplatelet therapy with Aspirin (ASA) is less efficient in some coronary patients, which increases their risk of developing thrombosis. Elevated blood levels of thrombo-inflammatory mediators, like sCD40L, may explain such variabilities. We hypothesized that in the presence of elevated levels of sCD40L, the efficacy of ASA may vary; and aimed to determine the effects of ASA on CD40L signalling and aggregation of platelets.

EXPERIMENTAL APPROACH: The effects of ASA on CD40L-treated human platelets, in response to suboptimal concentrations of collagen or thrombin, were assessed on aggregation, thromboxane A₂ (TxA₂) secretion, and phosphorylation of p38-MAPK, NF- κ B, TGF- β -activated kinase 1 (TAK-1), and myosin light chain (MLC).

KEY RESULTS: sCD40L significantly elevated TxA₂ secretion in platelets, in response to suboptimal doses of collagen and thrombin, which was reversed by ASA. ASA did not inhibit phosphorylation of p38-MAPK, NF- κ B, TAK-1, either with sCD40L stimulation alone or with platelet agonists. sCD40L potentiated platelet aggregation, an effect completely reversed and partially reduced by ASA in response to a suboptimal dose of collagen and thrombin, respectively. The effects of ASA in sCD40L-treated platelets with collagen were related to inhibition of platelet shape change and MLC phosphorylation.

CONCLUSION AND IMPLICATIONS: ASA does not affect platelet sCD40L signalling, but prevents its effect on TxA₂ secretion and platelet aggregation in response to collagen, via a mechanism implying inhibition of MLC. Targeting sCD40L axis in platelets may have therapeutic potential in patients with elevated levels of CD40L that are none or less responding to ASA.

Abbreviations

ACS, acute coronary syndrome; ASA, Aspirin; CAD, coronary artery disease; COX, cyclooxygenase; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HBSS, Hank's buffered salt solution; I κ B, inhibitor of κ B; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MLC, myosin light chain; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PRP, Platelet-rich plasma; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; SEM, standard error (of estimate mean value); TAK1, TGF- β -activated kinase 1; TNF, tumor necrosis factor; Tris, 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3,-diol; TxA₂, Thromboxane A₂.

What is already known about the subject?

- ASA efficiency varies among coronary patients.
- sCD40L is a thrombo-inflammatory molecule that plays the role of a platelet primer by potentiating platelet aggregation.
- Presence of elevated levels of sCD40L in the blood of coronary patients.

What this study adds?

- ASA inhibits TxA₂ secretion of sCD40L-treated platelets stimulated by suboptimal doses of agonists.
- ASA has no effect on platelet sCD40L signalling.
- ASA inhibits the potentiating action of sCD40L on platelet aggregation, an effect related to inhibition of platelet shape change and MLC phosphorylation.

Clinical significance

- Elevated levels of sCD40L in the blood of coronary patients may have an impact on ASA efficiency.

- Targeting sCD40L signalling might have a therapeutic potential within coronary patients that are none or less responding to ASA.

Introduction:

Platelets play a key role in cardiovascular diseases; since they are at the centre of atherothrombotic events by mediating thrombo-inflammatory responses that amplify atherosclerosis in the coronary arteries and its subsequent clinical complications, including ischemic heart disease, acute coronary syndrome (ACS), myocardial infarction and stroke [175, 371, 372]. Therefore, Antiplatelet agents have been a main focus of secondary prevention of cardiovascular diseases [373]. Aspirin (ASA) is the most widely used medicine for prevention of these diseases and reduces the risk of myocardial infarction, stroke and cardiovascular death in a broad range of patients at high risk for future cardiovascular events [294, 374]. Nevertheless, ASA only prevents approximately 25% of coronary events and ischemic strokes when used in secondary prevention [310]. ASA acts by irreversibly inhibiting the cyclooxygenase-1 (COX-1) enzyme that catalyses the conversion of arachidonic acid to prostaglandins G1/G2, which are subsequently converted by thromboxane synthase to thromboxane A2 (TxA₂) [295]. A large number of patients continue to experience thrombo-embolic events despite ASA therapy in a phenomenon known as ‘aspirin resistance’, which could be due to several reasons such as COX-1 polymorphism, drug interactions, and pharmacokinetics of ASA [302].

Patients with inflammatory diseases exhibit higher than expected rates of ischemic cardiovascular events that are not attributable to common traditional risk factors, but rather to inflammatory stimuli that trigger pathways contributing to the pathogenesis of atherosclerosis.[222, 375] Patients who are resistant to antiplatelet therapy have a hyperactive

platelet phenotype [377, 378], which may be related to elevated levels of circulating primers [379-381]. Platelet primers do not stimulate platelet activation, but, in combination with physiologic stimuli, significantly enhance platelet function [382]. One of these remarkable primers is the thrombo-inflammatory mediator CD40L and its classical receptor CD40 [256, 383], which have gained significant attention for their involvement in the pathogenesis of inflammation, atherosclerosis, and atherothrombosis [165, 182, 376].

CD40L, also known as CD154 or gp39, is a type II transmembrane protein and a member of the tumour necrosis factor (TNF) gene superfamily. It is expressed on a broad range of cells, mainly T cells and platelets [165]. Like other members of the TNF family, CD40L has a soluble form (sCD40L) that is mainly produced by platelets. This molecule was initially thought to be solely implicated in immune and inflammatory responses [146] as it was mostly expressed by immune cells [241]. However, CD40L has a much broader role. In particular, we have previously shown that enhanced levels of sCD40L exacerbate platelet activation and aggregation through the CD40/TRAF-2/Rac-1/p38 MAPK signaling pathways [267]. More recently, we have also shown that the priming action of sCD40L on platelets involves nuclear factor kappa B (NF- κ B) [268] in CD40- and TGF- β -activated kinase 1 (TAK1)-dependent manner [386]

Although CD40L has an important role as a platelet primer through its strong enhancement of platelet activation and aggregation in response to suboptimal concentrations of agonists, its effect may influence the anti-platelet efficiency of ASA. The objective of the present study was set to determine the effect of ASA on CD40L in platelet signalling, secretion and aggregation.

Methods

Preparation of human platelets

Venous blood was drawn from healthy volunteers, free from medication known to interfere with platelet function for at least three weeks before the experiment. The protocol was approved by the Human Ethical Committee of the Montreal Heart Institute, in accordance with the declaration of Helsinki for experiments involving humans. Washed platelets were prepared as previously described [267, 268]. Briefly, platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of acid citrate dextrose anticoagulated blood. Platelets were then pelleted from PRP, to which 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PGE_1 was added, washed with HBSS-Hank's sodium citrate buffer, and finally re-suspended in HBSS-Hank's buffer containing 2 mM MgCl_2 and 2 mM CaCl_2 . Platelets were rested at 37°C for at least 30 minutes before further manipulation.

Measurement of Thromboxane A_2

The stable hydrolysis product of TxA_2 , thromboxane B_2 , was used as a readout of TxA_2 production. It was measured using a commercial Thromboxane B_2 ELISA kit (R&D systems). Platelet samples from the aggregation reactions were quenched at 5 min with 2 μM indomethacin and 5 mM EDTA to inhibit further production of TxA_2 . Samples were centrifuged (5 min, 1000 rpm at 4°C) and the supernatant was removed and stored at -80°C for subsequent analysis.

Phosphorylation of p38-MAPK, NF- κB , TAK-1, and MLC

Western blots were performed to assess the phosphorylation levels of p38-MAPK, NF- κB , TAK-1, and MLC. Briefly, platelets ($1000 \times 10^6/\text{mL}$) were stimulated as indicated and lysed immediately by the addition of 1/4 volume of 4X sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) loading buffer containing 5% β -mercaptoethanol. All samples were boiled for 5 min. Protein lysates were then resolved in 10% SDS-PAGE gels and transferred to

nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk for 1 hour, washed three times with TBS/T (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4, 0.1 % Tween-20) and incubated with appropriate primary antibody overnight at 4°C. We used primary antibodies against phospho-p38-MAPK^{threonine 180/182}, phospho-IκBα^{serine 32/36}, phospho-TAK1^{threonine 184/187}, phospho-MLC^{serine 19 threonine 18}, and β-actin (Cell Signaling Technology). Following washing steps, membranes were labelled with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hour, washed and bound peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer Life Sciences). All membranes were stripped and reprobed for β-actin, a commonly chosen loading control. Data were presented as ratios of phosphorylated proteins to respective β-actin.

Measurement of platelet aggregation

We monitored aggregation of washed human platelets on a four-channel optical aggregometer (Chronolog Corp.) under shear (1000 rpm) at 37°C. Platelet suspensions (250 x 10⁶/mL) were pretreated with ASA (30 uM, Tocris) or Latrunculin A (inhibitor of actin polymerization in cytoskeleton, 1 uM, Sigma-Aldrich) for 5 minutes followed by treatment with sCD40L (1000 ng/mL, R&D systems) for 30 minutes at 37°C. After that, platelet aggregation was triggered by a suboptimal dose of collagen (0.25 ± 0.1 µg/ml, Chronolog Corp.), or α-thrombin (0.025 ± 0.01 U/mL, Sigma-Aldrich). The suboptimal dose of agonist that does not induce more than 30% aggregation was selected before each experiment from a dose-response curve of platelet aggregation in response to collagen or thrombin (Supplement Data 1). Traces were recorded until stabilization of platelet aggregation [267, 268, 387].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS statistics 25. Results are presented as mean \pm SEM. Statistical comparisons were done using a Student's paired t-test or a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test for comparison against a single group. The specific statistical tests used, the mean of data, the number (n) of experiments and the P values are specified in the figure legends. A P value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

ASA inhibits thromboxane A₂ secretion induced by sCD40L

ASA blocks COX-1 activity and subsequent generation of TxA₂ [295]. Since TxA₂ has an important role in platelet activation, we were interested in investigating whether CD40L can increase TxA₂ formation and whether this contributes to CD40L mediated effect on platelet function in the presence of ASA. In unstimulated platelets, the production of TxA₂ (9.4 ± 2.3 ng/ml) was unaffected by CD40L either in the presence or absence of ASA (Fig. 1A). In stimulated platelets, the production of TxA₂ increased to 15.0 ± 3.3 ng/ml in response to a suboptimal concentration of collagen (Fig. 1B), which was reduced significantly by 3 folds to 5.3 ± 2.1 in the presence of ASA. TxA₂ remained significantly unchanged (7.5 ± 2.0 ng/ml) in response to a suboptimal concentration of thrombin and unaffected by ASA (Fig. 1C). However, sCD40L significantly elevated TxA₂ production in platelets in the presence of suboptimal doses of collagen (21.2 ± 4.5 ng/ml, Fig. 1B) and thrombin (23.71 ± 5.9 ng/ml, Fig. 1C); an effect that was completely reversed by ASA.

ASA does not affect CD40L signalling

We have previously shown that NF- κ B, p38-MAPK, and TAK1 are required for sCD40L-induced platelet activation and potentiation of platelet aggregation [267, 268, 386]. We aimed to verify whether the impact of ASA passes via modulation of CD40L signalling in platelets. To this end, we assessed the phosphorylation levels of I κ B α (Fig. 2), p38-MAPK (Fig. 3), and TAK1 (Fig. 4). We have first showed that sCD40L induced robust phosphorylations of I κ B α , p38-MAPK and TAK1, which were not affected by the addition of suboptimal concentrations of collagen or thrombin. Treatment of platelets with ASA has no impact on the phosphorylation of those proteins, either following sCD40L stimulation alone or with sCD40L and a suboptimal dose of collagen or thrombin.

ASA reduces the effect of CD40L on platelet aggregation

Circulating levels of sCD40L, a platelet primer [267, 268, 386], are elevated in cardiovascular diseases [153, 388]. Herein, we determined the impact of sCD40L on ASA therapy in platelet aggregation. sCD40L alone was unable to induce platelet aggregation (Fig. 5A), but potentiated platelet aggregation in response to suboptimal doses of collagen (Fig. 5B) or thrombin (Fig. 5C). The effect of sCD40L in potentiating platelet aggregation was completely reversed by ASA in response to a suboptimal dose of collagen. However, the potentiating impact of sCD40L on platelet aggregation was significantly reduced by approximately 50% by ASA when sCD40L pretreated-platelets were stimulated with a suboptimal dose of thrombin. Interestingly, only the effect of ASA in response to collagen and sCD40L was associated with complete inhibition of platelet shape change (Fig. 5B, red and green aggregation traces) that precedes the onset of the aggregation process. Latrunculin, an inhibitor of actin polymerisation and reorganization of cytoskeleton during platelet shape changes, mimicked the effects of ASA on platelet aggregation

and shape change when platelets are stimulated with suboptimal dose of collagen. However, Latrunculin was able to inhibit shape change of CD40L-treated platelets when stimulated with suboptimal dose of thrombin and prevents partially the potentiating action of sCD40L on platelet aggregation. (Figure 6B, green trace). Finally, similar to ASA, Latrunculin has no effect of the phosphorylation of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, p38-MAPK and TAK1 (Fig. 7).

ASA and MLC phosphorylation

To get insight on the observed effect of ASA on platelet shape changes in response to collagen, we assessed the phosphorylation of Myosin light chain (MLC), a regulator of the dynamic remodelling of the actin cytoskeleton required for platelet shape change [389-391]. As shown in Figure 8, ASA inhibits MLC phosphorylation induced by a suboptimal aggregating dose of collagen in sCD40L-treated platelets. However, in sCD40L-treated platelet stimulated with a suboptimal dose of thrombin, ASA was without any significant effect. The same observations were noted in response to maximal aggregating doses of collagen or thrombin (Fig. 8B); ASA inhibits platelet MLC phosphorylation in response to collagen, but not thrombin.

Discussion

The first line treatment of CAD relies on antiplatelet agents. Aspirin (ASA) is currently the standard gold treatment that used clinically to reduce the risk of developing thrombosis and ACS. Despite proven effectiveness, ASA is limited in its efficacy, as demonstrated in various clinical studies showing resistance or decreased response in high-risk patients.[392, 393] This is partially related to well-known reasons: reduced absorption/increased metabolism of ASA and genetic

polymorphisms in the genes encoding COX-1[394]. Also, patients who are resistant to conventional antiplatelet therapies are usually present with a hyperactive platelet phenotype.[378, 381] This could be related to increased blood levels of some thrombo-inflammatory molecules that act as platelet primers.[382] In fact, sCD40L is certainly one of the platelet primers that do not stimulate platelet activation, but, in combination with physiologic stimuli significantly enhance platelet function. Indeed, high serum levels of sCD40L are correlated with an increased risk of developing thrombotic events in CAD.[370, 388, 395] Thus, we hypothesized that in the presence of elevated levels of sCD40L, like those found in the circulation of coronary patients, reducing the influence of sCD40L on platelet activity should improve antiplatelet efficacy. To address our hypothesis, we assessed the effects of ASA on sCD40L-induced signalling, secretion and aggregation of unstimulated and primed platelets with suboptimal concentrations of physiological agonists, thrombin and collagen. We found that ASA is highly effective in reversing the potentiating effect of sCD40L on platelet aggregation in response to collagen, while reducing the effect in response to thrombin. Such effect was independent of sCD40L signalling via NF- κ B, p38-MAPK or TAK1, but related to inhibition of MLC phosphorylation and platelet shape change. in response to collagen of sCD40L-primed platelets.

The priming role of sCD40L, which potentiated significantly the aggregation in accordance with our previous studies [267, 268, 386], was reversed completely by pre-treatment with ASA, when platelets are challenged by collagen. However, sCD40L was able to overcome partially but significantly the inhibitory effect of ASA when aggregation was induced with suboptimal doses of thrombin. This could be explained by the ability of ASA to inhibit the effects of collagen on platelets, which relies principally on TxA₂ [396]. Whereas, thrombin is known to be a potent platelet activator [52, 140], independently of TxA₂. Indeed, despite dual therapies with clopidogrel

and ASA, a large number of ACS patients experience recurrent major cardiovascular ischemic events due to markers of thrombin activation remaining high after an ACS [397, 398]. This suggests a maintained platelet activation through a thrombin-mediated mechanism [399]. Interestingly, the effect of ASA was related to inhibition of collagen-induced platelet shape changes, which frequently occur even when platelets are exposed to minimal degrees of activation that cannot result in aggregation or adhesion, such as suboptimal concentrations of platelet agonists or shear stress [400]. The effect of ASA on platelet shape changes correlated with its effect on MLC phosphorylation, a major key player protein in platelet shape changes [389-391], that was also inhibited in response to a suboptimal concentration of collagen, but not thrombin; and those whether the platelet was stimulated with CD40L or not. This indicates that collagen-induced platelet shape change is TxA₂ dependent [401]. However, ASA has no effect on MLC activation in thrombin-stimulated platelets, which translates to a maintained shape change during the aggregation process. This could be explained by the ability of thrombin to induce a shape change in a TxA₂ independent manner. Furthermore, we observed that sCD40L is capable of enhancing TxA₂ secretion in response to suboptimal doses of agonists. Thus, CD40L, aside from being able to enhance platelet alpha-granule release [256], can also amplify TxA₂ secretion. This observation is consistent with the results of a previous study where other platelet primers also enhanced TxA₂ secretion [402]. Interestingly, following inhibition with ASA, sCD40L maintains its ability to trigger platelet aggregation in response to suboptimal doses of thrombin indicating that the priming action of sCD40L is independent of TxA₂. In fact, one of the proposed mechanisms by which ASA resistance develops is via activation of alternative signalling pathways that are TxA₂-independent [403]. Also, our results demonstrate that this resistance may be explained by the fact that ASA does not affect sCD40L signalling. Indeed, ASA seems to have an indirect effect in preventing sCD40L

potentiation action in platelet aggregation by inhibiting collagen action that is dependent on TxA_2 secretion which is not the case with thrombin that can induce aggregation independently of TxA_2 [404]. Furthermore, our previous work showed that sCD40L signalling in platelets goes through two pathways: the CD40/TAK-1/NF- κ B pathway [268, 386] and the Rac1/p38 MAPK [267]. These pathways remained activated when ASA treated platelets are stimulated with sCD40L indicating that sCD40L-mediated resistance to ASA is dependent on TAK-1, NF- κ B, and p38 MAPK. To translate this study to a clinical setting, our results suggest that patients undergoing anti-platelet therapy that blocks TxA_2 formation are not totally protected from the priming impact of sCD40L on platelets.

In conclusion, ASA does not affect platelet sCD40L signalling, but prevents its effect on TXA_2 secretion and platelet aggregation in response to collagen, via a mechanism implying inhibition of platelet shape change and MLC phosphorylation. Elevated levels of sCD40L in the blood of coronary patients may have an impact on ASA efficiency. Targeting sCD40L axis in platelets may have therapeutic potential in patients with elevated levels of CD40L that are none or less responding to ASA.

References:

1. Thomas, M.R. and R.F. Storey, *The role of platelets in inflammation*. *Thromb Haemost*, 2015. **114**(3): p. 449-58.
2. Willoughby, S., A. Holmes, and J. Loscalzo, *Platelets and cardiovascular disease*. *Eur J Cardiovasc Nurs*, 2002. **1**(4): p. 273-88.
3. Lozano, R., et al., *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. *Lancet*, 2012. **380**(9859): p. 2095-128.
4. Cheng-Ching, E., et al., *Update on pharmacology of antiplatelets, anticoagulants, and thrombolytics*. *Neurology*, 2012. **79**(13 Suppl 1): p. S68-76.
5. Antithrombotic Trialists, C., *Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients*. *BMJ*, 2002. **324**(7329): p. 71-86.
6. Elwood, P.C., C. Hughes, and J.R. O'Brien, *Platelets, aspirin, and cardiovascular disease*. *Postgrad Med J*, 1998. **74**(876): p. 587-91.
7. Antithrombotic Trialists, C., et al., *Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials*. *Lancet*, 2009. **373**(9678): p. 1849-60.
8. Roth, G.J. and P.W. Majerus, *The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein*. *J Clin Invest*, 1975. **56**(3): p. 624-32.
9. Floyd, C.N. and A. Ferro, *Mechanisms of aspirin resistance*. *Pharmacol Ther*, 2014. **141**(1): p. 69-78.
10. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(2): p. 115-26.
11. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(7): p. 508-19.
12. Dichiaro, J., et al., *Platelet function measured by VerifyNow identifies generalized high platelet reactivity in aspirin treated patients*. *Platelets*, 2007. **18**(6): p. 414-23.
13. Macchi, L., et al., *Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate*. *Thromb Res*, 2002. **107**(1-2): p. 45-9.
14. Stolla, M.C., et al., *Enhanced platelet activity and thrombosis in a murine model of type I diabetes are partially insulin-like growth factor 1-dependent and phosphoinositide 3-kinase-dependent*. *J Thromb Haemost*, 2013. **11**(5): p. 919-29.
15. Lupia, E., et al., *Elevated thrombopoietin in plasma of burned patients without and with sepsis enhances platelet activation*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(6): p. 1000-8.
16. Angiolillo, D.J., et al., *Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment*. *Diabetes*, 2005. **54**(8): p. 2430-5.
17. Gresele, P., E. Falcinelli, and S. Momi, *Potentiation and priming of platelet activation: a potential target for antiplatelet therapy*. *Trends Pharmacol Sci*, 2008. **29**(7): p. 352-60.
18. Aukrust, P., et al., *Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes*. *Circulation*, 1999. **100**(6): p. 614-20.
19. Inwald, D.P., et al., *CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation*. *Circ Res*, 2003. **92**(9): p. 1041-8.
20. Hassan, G.S., Y. Merhi, and W.M. Mourad, *CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies*. *Trends Immunol*, 2009. **30**(4): p. 165-72.
21. Hassan, G.S., Y. Merhi, and W. Mourad, *CD40 ligand: a neo-inflammatory molecule in vascular diseases*. *Immunobiology*, 2012. **217**(5): p. 521-32.
22. Lutgens, E., et al., *Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis*. *Nat Med*, 1999. **5**(11): p. 1313-6.
23. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(1): p. 2-17.
24. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. *Nature*, 1998. **391**(6667): p. 591-4.

25. Yacoub, D., et al., *Enhanced levels of soluble CD40 ligand exacerbate platelet aggregation and thrombus formation through a CD40-dependent tumor necrosis factor receptor-associated factor-2/Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(12): p. 2424-33.
26. Hachem, A., et al., *Involvement of nuclear factor kappaB in platelet CD40 signaling*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **425**(1): p. 58-63.
27. Kojok, K., et al., *CD40L Priming of Platelets via NF-kappaB Activation is CD40- and TAK1-Dependent*. *J Am Heart Assoc*, 2018. **7**(23): p. e03677.
28. Yacoub, D., et al., *Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(40): p. 30024-35.
29. Pamukcu, B., et al., *The CD40-CD40L system in cardiovascular disease*. *Ann Med*, 2011. **43**(5): p. 331-40.
30. Zhang, B., et al., *The CD40/CD40L system: a new therapeutic target for disease*. *Immunol Lett*, 2013. **153**(1-2): p. 58-61.
31. Siess, W., *Molecular mechanisms of platelet activation*. *Physiol Rev*, 1989. **69**(1): p. 58-178.
32. Klages, B., et al., *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**(4): p. 745-54.
33. Lokeshwar, V.B. and L.Y. Bourguignon, *The involvement of Ca2+ and myosin light chain kinase in collagen-induced platelet activation*. *Cell Biol Int Rep*, 1992. **16**(9): p. 883-97.
34. Gum, P.A., et al., *Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease*. *Am J Cardiol*, 2001. **88**(3): p. 230-5.
35. Shantsila, E. and G.Y. Lip, *Variability of response to antiplatelet therapy: what should we do next?* *Fundam Clin Pharmacol*, 2009. **23**(1): p. 19-22.
36. Kasotakis, G., Pipinos, II, and T.G. Lynch, *Current evidence and clinical implications of aspirin resistance*. *J Vasc Surg*, 2009. **50**(6): p. 1500-10.
37. Heeschen, C., et al., *Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(12): p. 1104-11.
38. Lobbes, M.B., et al., *Is there more than C-reactive protein and fibrinogen? The prognostic value of soluble CD40 ligand, interleukin-6 and oxidized low-density lipoprotein with respect to coronary and cerebral vascular disease*. *Atherosclerosis*, 2006. **187**(1): p. 18-25.
39. Best, L.C., et al., *The interrelationship between thromboxane biosynthesis, aggregation and 5-hydroxytryptamine secretion in human platelets in vitro*. *Thromb Haemost*, 1980. **43**(1): p. 38-40.
40. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(9): p. 938-49.
41. Davi, G. and C. Patrono, *Platelet activation and atherothrombosis*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(24): p. 2482-94.
42. Loeffen, R., et al., *Factor XIa and Thrombin Generation Are Elevated in Patients with Acute Coronary Syndrome and Predict Recurrent Cardiovascular Events*. *PLoS One*, 2016. **11**(7): p. e0158355.
43. Manten, A., et al., *Procoagulant and proinflammatory activity in acute coronary syndromes*. *Cardiovasc Res*, 1998. **40**(2): p. 389-95.
44. de Souza Brito, F. and P. Tricoci, *Novel anti-platelet agents: focus on thrombin receptor antagonists*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2013. **6**(3): p. 415-24.
45. Shin, E.K., et al., *Platelet Shape Changes and Cytoskeleton Dynamics as Novel Therapeutic Targets for Anti-Thrombotic Drugs*. *Biomol Ther (Seoul)*, 2017. **25**(3): p. 223-230.
46. Jarvis, G.E., et al., *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**(1): p. 107-17.
47. Blair, T.A., S.F. Moore, and I. Hers, *Circulating primers enhance platelet function and induce resistance to antiplatelet therapy*. *J Thromb Haemost*, 2015. **13**(8): p. 1479-93.
48. Topcuoglu, M.A., E.M. Arsava, and H. Ay, *Antiplatelet resistance in stroke*. *Expert Rev Neurother*, 2011. **11**(2): p. 251-63.
49. Lewis, G.P. and I.S. Watts, *Prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2 and adenosine diphosphate in collagen-induced aggregation of rabbit platelets*. *Br J Pharmacol*, 1982. **75**(4): p. 623-31.

Figure 1. ASA inhibits sCD40L induced Thromboxane B₂ formation in platelets in response to a suboptimal dose of agonists. Washed human platelets ($250 \times 10^6/\text{mL}$) were left untreated or pretreated with ASA ($30 \mu\text{M}$) for 5 minutes at 37°C . They were then stimulated with sCD40L (1000 ng/ml) or not for 30 minutes. Platelets were left unstimulated (A) or challenged with a suboptimal dose of thrombin ($0,025 \text{ U/mL} \pm 0,01$) (B) or collagen ($0,25 \text{ ug/mL} \pm 0,1$) (C). Aggregation was stopped with indomethacin 2 uM , 5 min following the adding of suboptimal doses of agonists. Platelets were centrifuged at 10000 rpm for 5 min at 4°C and supernatant was collected. Thromboxane B₂ in the supernatant was then measured by using a Thromboxane B₂ ELISA kit. ($n = 10$, mean \pm SEM). * $p < 0,01$ vs. other treatments (Student's paired t-test).

Figure 2. ASA does not affect NF- κB activation by sCD40L. Washed human platelets ($1,000 \times 10^6/\text{mL}$) were pretreated or not with ASA (30 uM) for 10 min then stimulated with sCD40L (1000 ng/mL), thrombin ($0,025 \text{ U/mL}$) or collagen ($0,25 \text{ ug/mL}$) for 5 minutes. Platelet lysates were resolved in 10% SDS-PAGE and assessed for p-I $\kappa\text{B}\alpha$. Actin blot is from stripped membranes of p-I $\kappa\text{B}\alpha$ blot. Histograms represent the mean of blot data, expressed in optical density ($n = 3$, mean \pm SEM). * $p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test vs. Control).

Figure 3. ASA does not affect p38-MAPK activation by sCD40L. Washed human platelets ($1,000 \times 10^6/\text{mL}$) were pretreated or not with ASA (30 uM) for 10 min then stimulated with sCD40L (1000 ng/mL), thrombin ($0,025 \text{ U/mL}$) or collagen ($0,25 \text{ ug/mL}$) for 5 minutes. Platelet lysates were resolved in 10% SDS-PAGE and assessed for p-p38-MAPK. Actin blot is from stripped membranes of p-p38-MAPK blot. Histograms represent the mean of blot data, expressed in optical density ($n = 3$, mean \pm SEM). * $p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test vs. Control).

Figure 4. ASA does not affect TAK1 activation by sCD40L. Washed human platelets ($1,000 \times 10^6/\text{mL}$) were pretreated or not with ASA (30 μM) for 10 min then stimulated with sCD40L (1000 ng/mL), thrombin (0,025 U/mL) or collagen (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 5 minutes. Platelet lysates were resolved in 10% SDS–PAGE and assessed for p-TAK1. Actin blot is from stripped membranes of p-TAK1 blot. Histograms represent the mean of blot data, expressed in optical density ($n = 3$, mean \pm SEM). * $p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparisons test vs. Control).

Figure 5. Effects of sCD40L and ASA on platelet aggregation in response to suboptimal doses of agonists. Washed human platelets ($250 \times 10^6/\text{mL}$) were left untreated or pretreated with ASA (30 μM) for 5 minutes at 37°C. In A, sCD40L (1000 ng/ml) was used as the platelet agonist, whereas in B and C, platelets were preincubated with sCD40L or not for 30 minutes. Platelet aggregation was induced with suboptimal doses of thrombin (0.0125 U/ml, A), or collagen (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, B). Histograms represent means of aggregation percentages ($n = 25$, mean \pm SEM). * $p < 0.01$ (one-way ANOVA followed by Bonferroni’s multiple comparisons test vs. other treatments).

Figure 6. Effect of Latrunculin on the potentiating action of sCD40L on platelet aggregation. Washed human platelets (250×10^6 platelets/ml) were pretreated with ASA (30 μM) or Latrunculin (1 μM). They were stimulated with sCD40L (1000 ng/ml) for 30 minutes at 37°C. Platelet aggregation was induced with suboptimal doses of (A) Thrombin and (B) Collagen. Histograms represent means of aggregations ($n = 9$, mean \pm SEM). * $p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparisons test vs. other treatments).

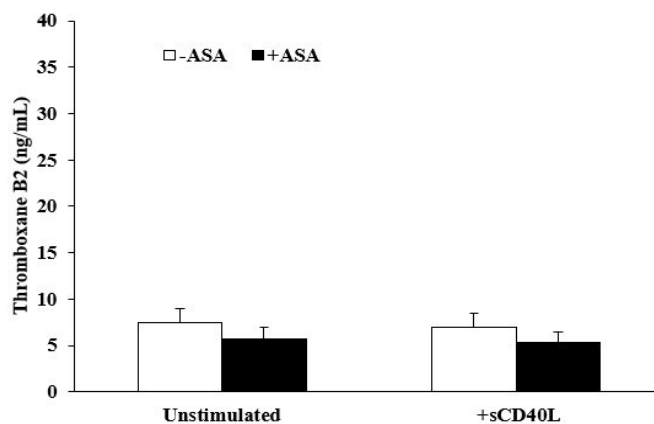
Figure 7. Latrunculin has no effect on CD40L signaling. Washed human platelets ($1,000 \times 10^6/\text{mL}$) were pretreated or not with Latrunculin (1 μM) for 10 min, then left untreated or stimulated with sCD40L (1000 ng/mL) for 5 minutes. Platelet lysates were resolved in 10% SDS–PAGE and

assessed for p-TAK1 and stripped for p-I κ B α , p-p38 and actin. Histograms represent the mean of blot data, expressed in optical density (n = 4, mean \pm SEM). *p<0.001 (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test vs. Control).

Figure 8. ASA inhibits MLC phosphorylation of platelets stimulated with collagen but not thrombin. Washed human platelets ($1,000 \times 10^6/\text{mL}$) were pretreated or not with ASA (30 μM) for 10 minutes then stimulated with sCD40L (1000 ng/mL). Aggregation was triggered with suboptimal doses of thrombin (0,025 U/mL) or collagen (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Platelet lysates were resolved in 15% SDS-PAGE and assessed for p-MLC. Actin blot is from stripped membranes of p-MLC blot. Histograms represent the mean of blot data, expressed in optical density (n = 3, mean \pm SEM). *p<0.001 (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test vs. Control).

Figure 1

A



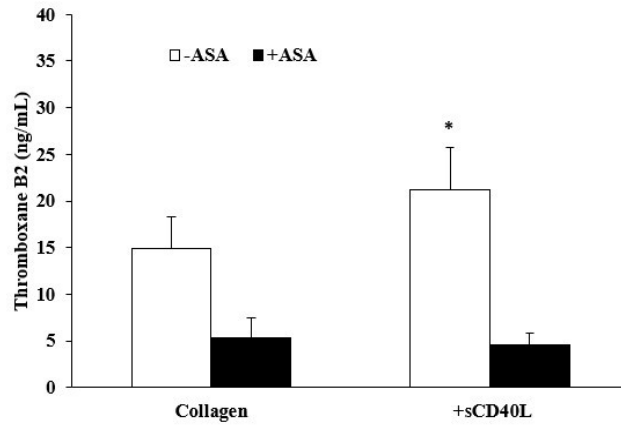
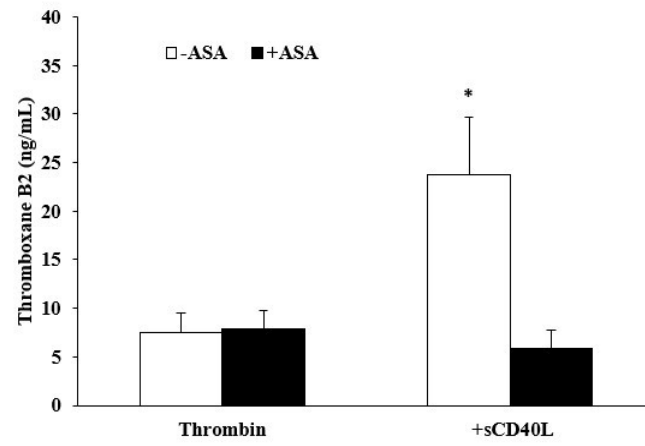
B**C**

Figure 2

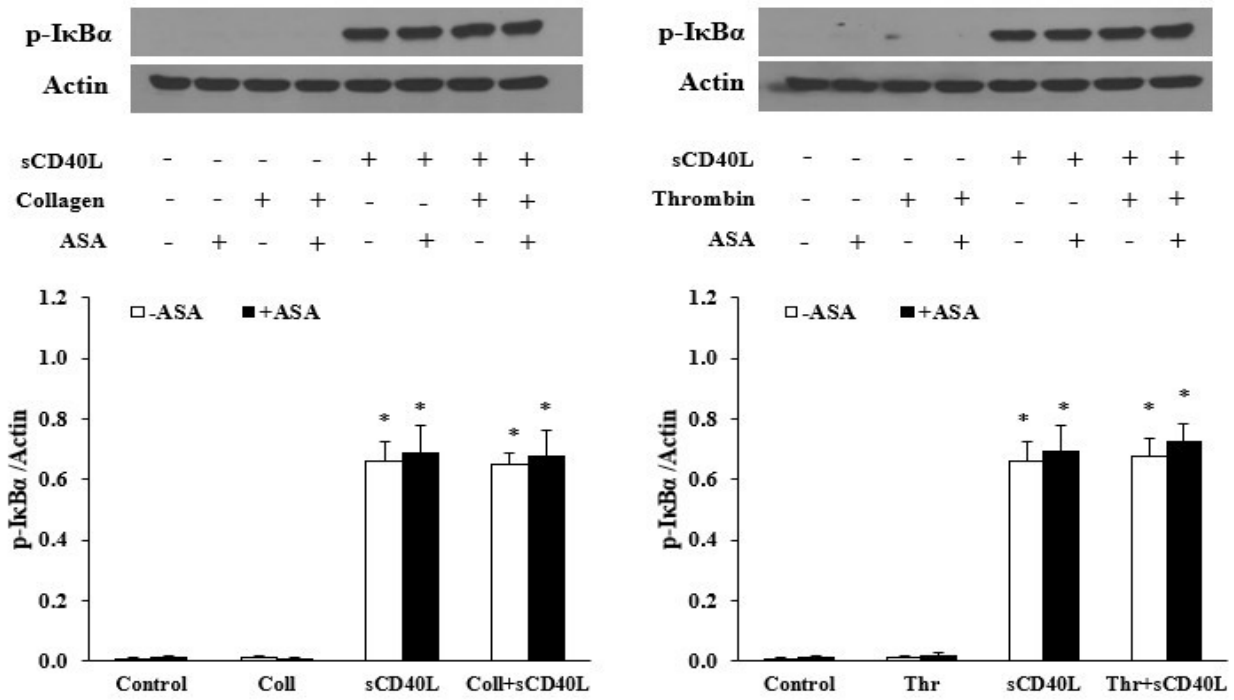


Figure 3

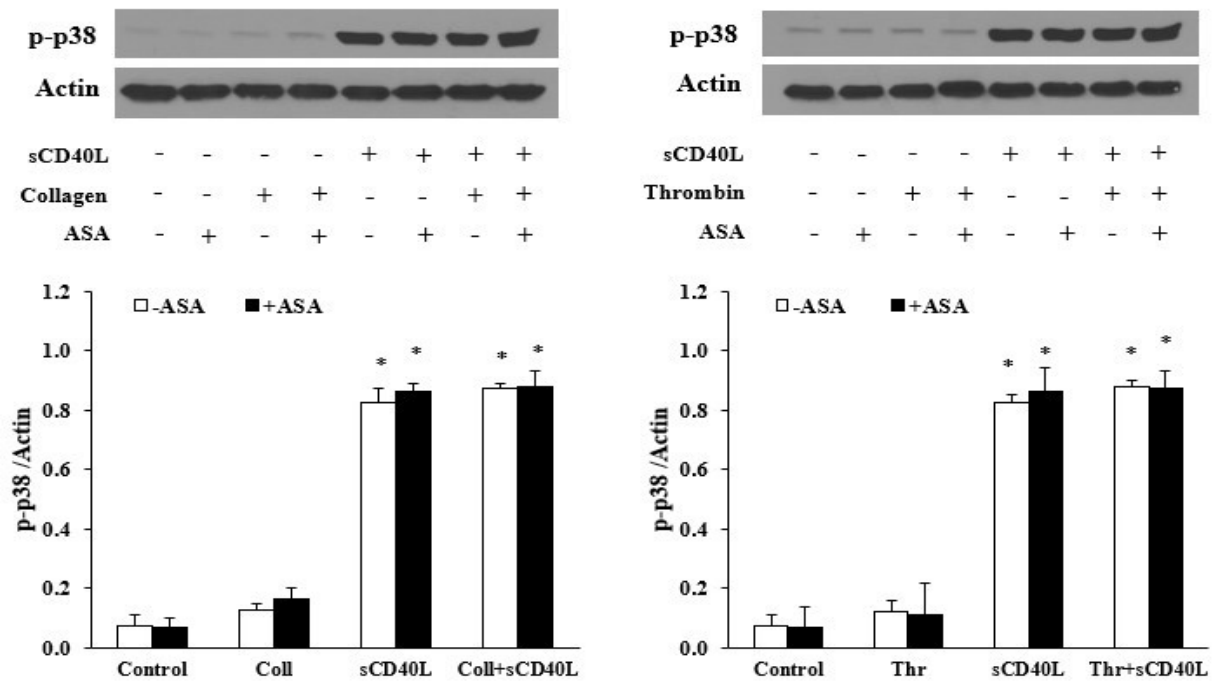


Figure 4

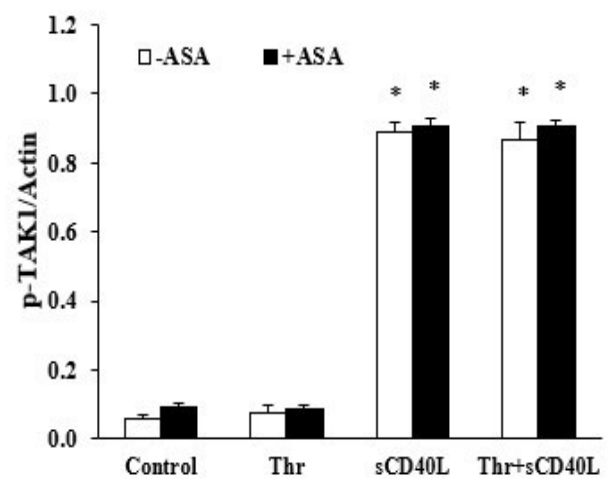
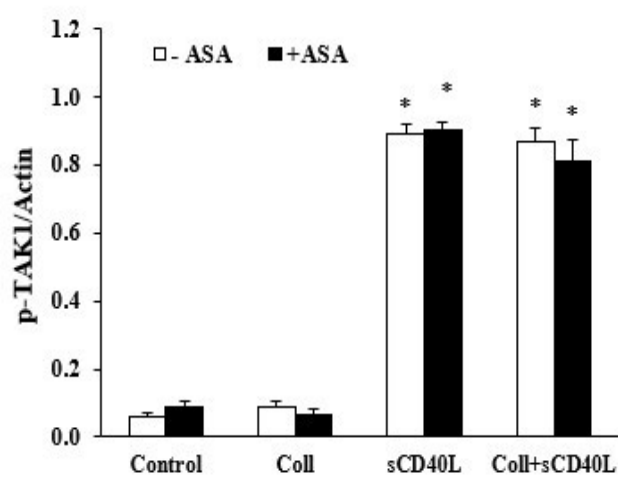
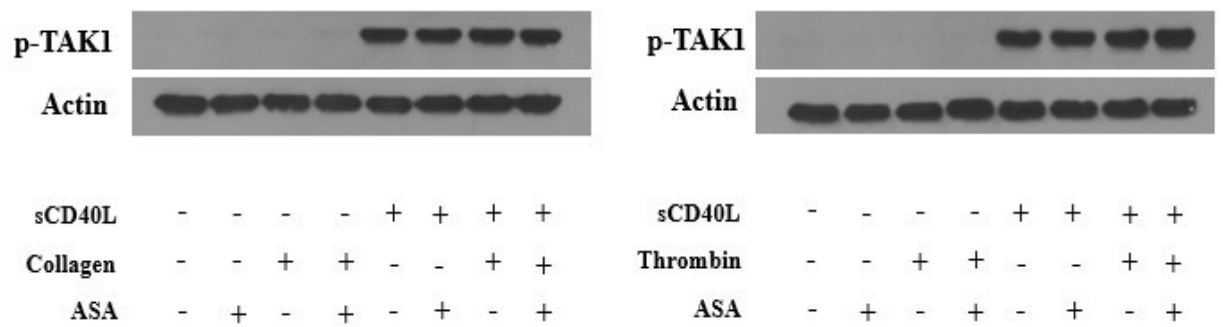
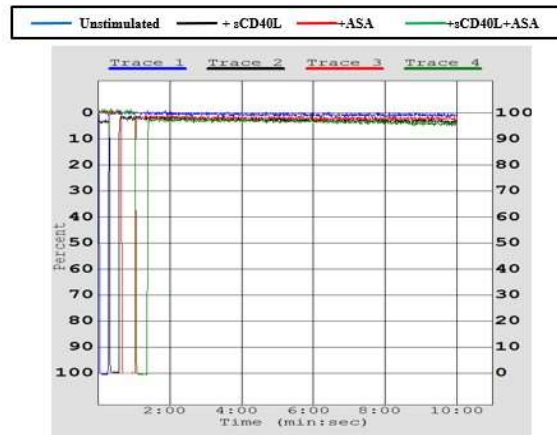
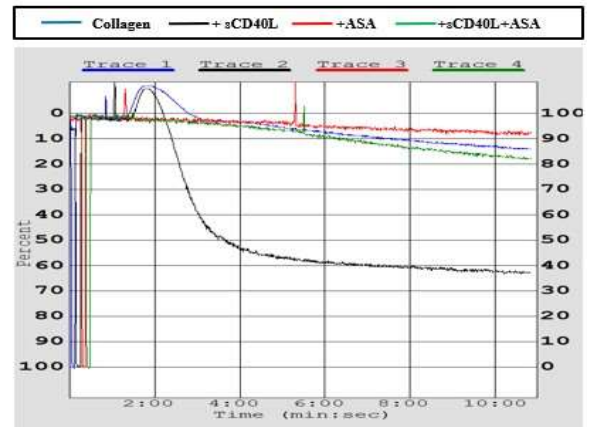
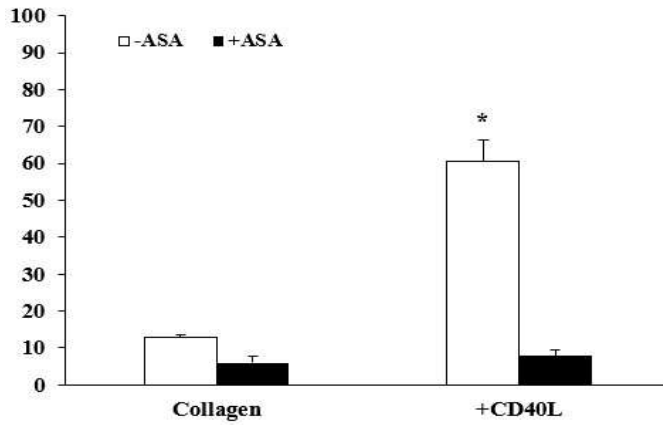


Figure 5

A



B



C

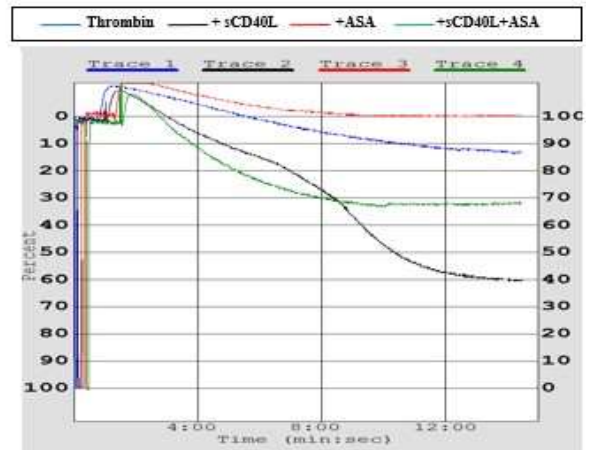
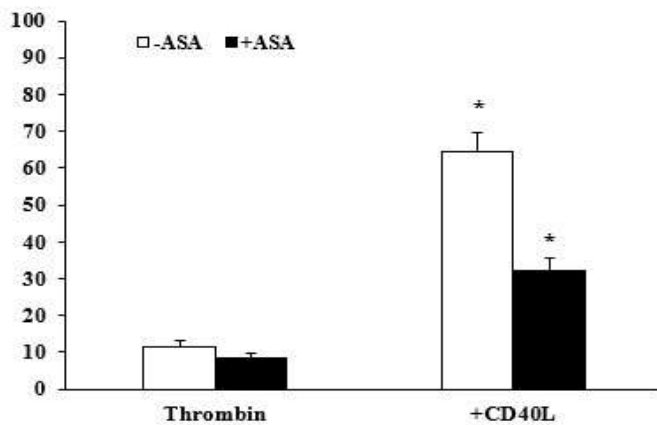
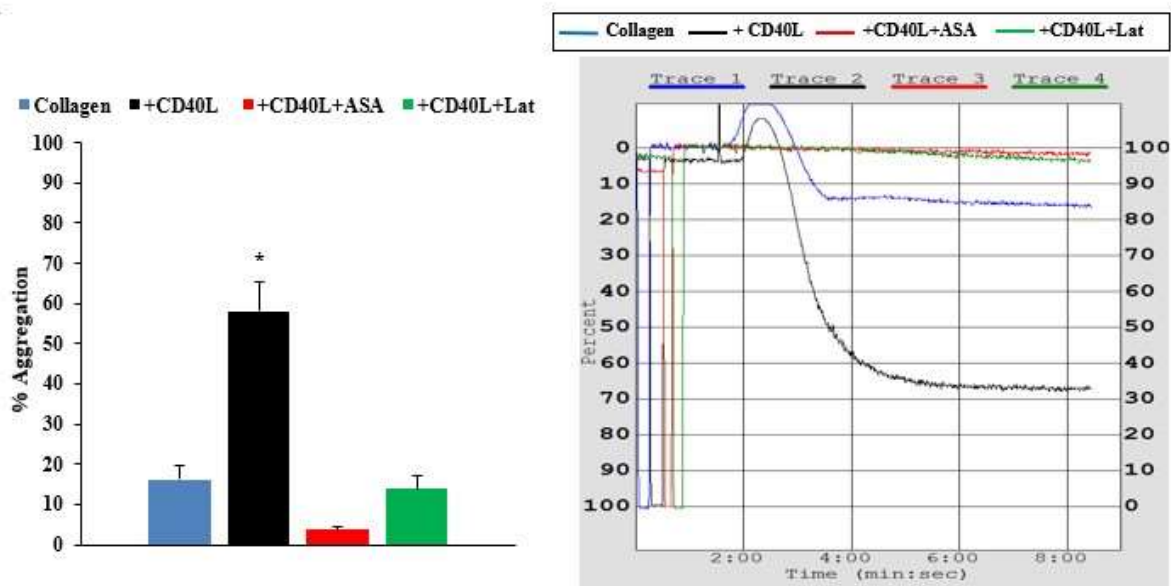


Figure 6

A



B

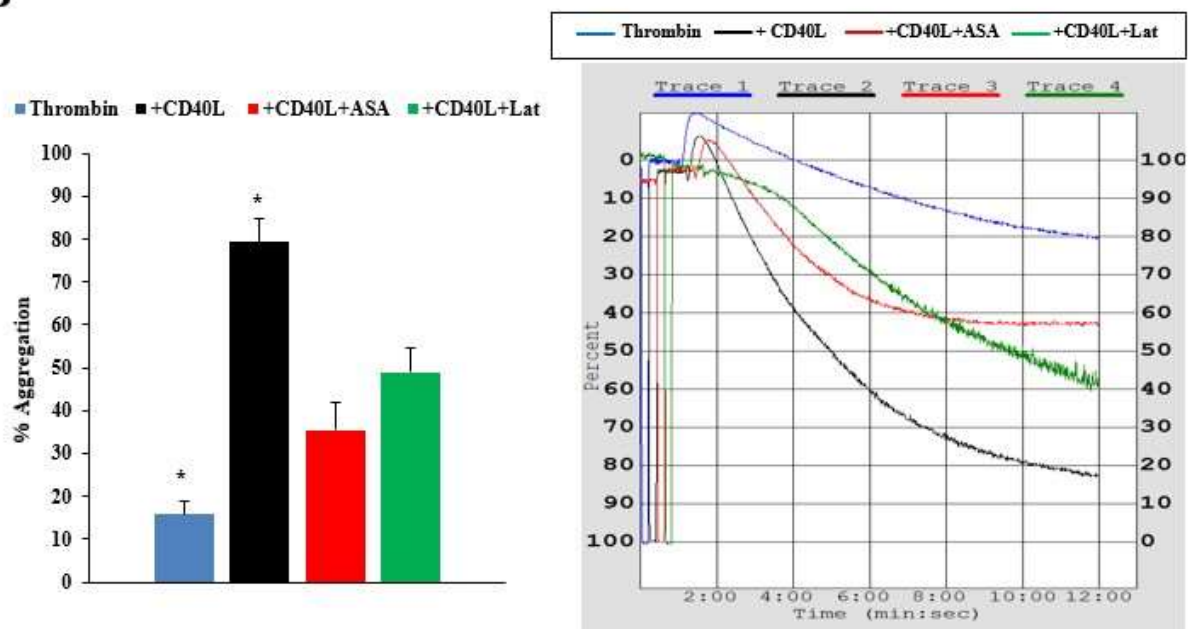


Figure 7

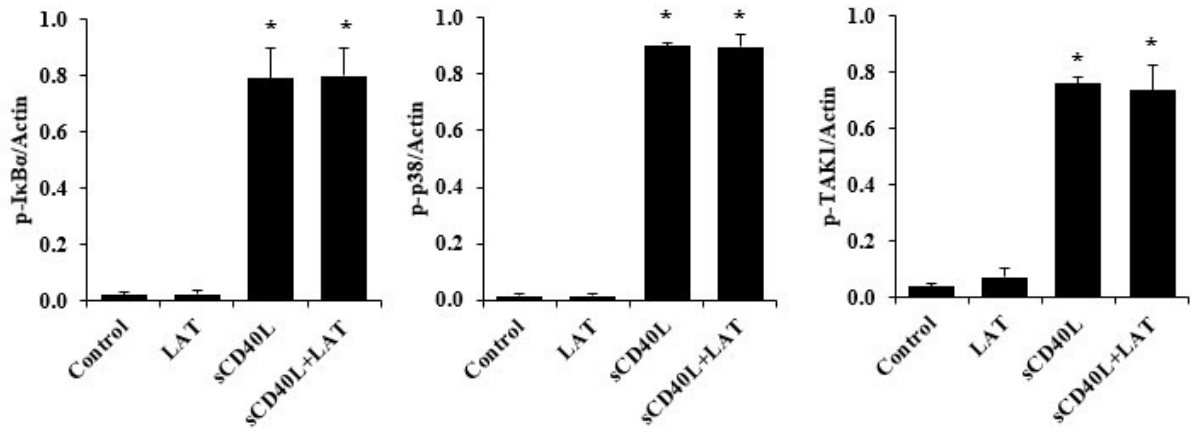
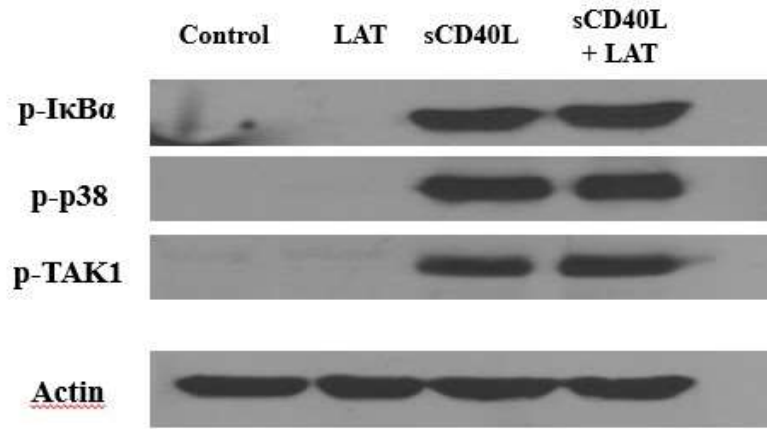
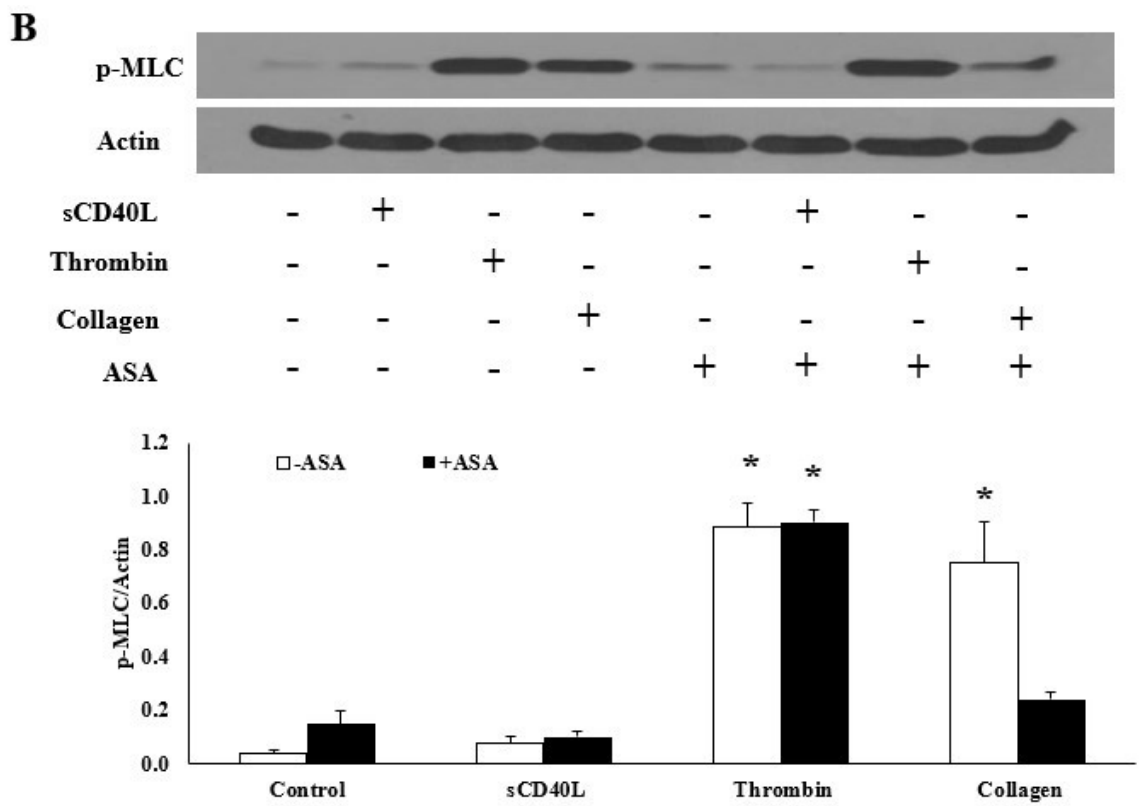
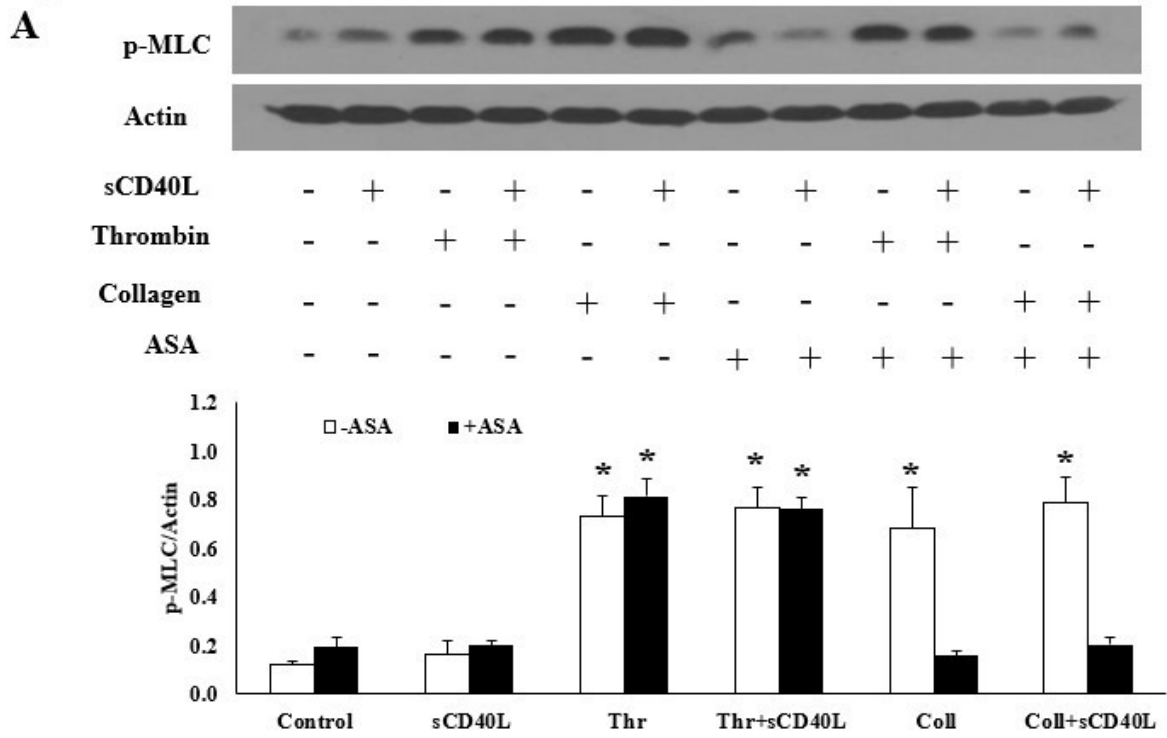


Figure 8



5.5 Discussion :

Les maladies cardiovasculaires sont principalement causées par l'athérosclérose des artères coronaires et ses complications cliniques ultérieures [175]. Ainsi, la thérapie antiplaquettaire est à la base du traitement des patients atteints d'ACS ou qui ont subi des PCI [284] [285]. Tel que discuté précédemment, l'ASA est actuellement le traitement de référence utilisé cliniquement pour réduire le risque de thrombose et d'ACS. Cependant, malgré son efficacité prouvée, celle-ci demeure limitée et montre une résistance ou une réponse diminuée chez les patients à haut risque [392, 393]. Intéressamment, les patients résistant aux traitements antiplaquetitaires conventionnels présentent généralement un phénotype hyperactif des plaquettes [378, 381]. Les patients atteints de maladies inflammatoires présentent des taux d'accidents cardiovasculaires ischémiques plus élevés que prévu. Ces accidents ne sont pas attribués aux facteurs de risque traditionnels, mais plutôt à des stimuli inflammatoires qui déclenchent des voies contribuant à la pathogenèse de l'athérosclérose [222, 375]. À cet égard, le médiateur thrombo-inflammatoire CD40L et son récepteur classique CD40, des molécules clé dans l'immunité humorale, ont suscité une attention particulière due à leur implication dans la pathogenèse de l'inflammation, de l'athérosclérose et de la thrombose [165, 182, 376]. L'amplification de ces maladies pourrait être lié à des taux sanguins élevés de ces molécules thrombo-inflammatoires jouant le rôle d'amorceurs plaquetitaires [382]. En fait, le sCD40L est effectivement l'un des amorceurs plaquetitaires qui ne stimulent pas l'activation plaquettaire, mais qui, associé à des stimuli physiologiques, augmente considérablement la fonction plaquettaire. En effet, les taux sériques élevés de sCD40L sont corrélés à un risque élevé de développement d'événements thrombotiques en cas de coronaropathie [370, 388, 395]. Ainsi, une augmentation de l'expression du CD40L sur les plaquettes est associée avec l'athérosclérose et les maladies coronariennes, et le taux de sCD40L élevé est associé à une

augmentation du risque de développer une maladie cardiovasculaire [370]. Ainsi, nous pensons que la réduction de l'effet du sCD40L sur l'activité des plaquettes devrait améliorer l'efficacité des agents antiplaquettaires. Afin de valider notre hypothèse, nous avons évalué l'effet de l'ASA sur la signalisation induite par le sCD40L, la sécrétion ainsi que l'agrégation des plaquettes non stimulées et stimulées par des concentrations sub-optimales d'agonistes physiologiques : la thrombine et le collagène. Nous avons constaté que l'ASA est très efficace pour inverser l'effet de potentialisation du sCD40L sur l'agrégation plaquettaire en réponse au collagène, cependant il réduit son effet en réponse à la thrombine. Cet effet était indépendant de la signalisation du sCD40L via NF-KB, p38-MAPK ou TAK1, mais était lié à l'inhibition de la phosphorylation de la MLC et au changement de forme des plaquettes en réponse au collagène et stimulées par le sCD40L.

Conformément à nos études précédentes, l'effet amorceur du sCD40L a considérablement potentialisé l'agrégation plaquettaire [267, 268, 386]. Cependant, cet effet a été complètement inversé par un traitement préalable à l'ASA, lorsque les plaquettes sont stimulées par le collagène. Par contre, le sCD40L a pu surmonter partiellement mais significativement l'effet inhibiteur de l'ASA lorsque l'agrégation était induite par des doses sub-optimales de thrombine. Cela pourrait s'expliquer par la capacité de l'ASA à inhiber l'effet du collagène sur les plaquettes, qui repose principalement sur le TxA₂ [396]. Cependant, la thrombine est connue comme étant un activateur plaquettaire puissant [52, 140], indépendant du TxA₂. En effet, malgré les doubles thérapies antiplaquettaires au Clopidogrel et à l'ASA, un grand nombre de patients atteints d'ACS ont des récurrences d'événements ischémiques cardiovasculaires majeurs dus à la présence des marqueurs de l'activation de la thrombine qui demeurent élevés après un ACS [397, 398]. Ceci suggère que l'activation plaquettaire est maintenue via un mécanisme impliquant la thrombine [399]. Intéressamment, l'effet de l'ASA était lié à l'inhibition des changements de forme des plaquettes

induits par le collagène. Cet effet se produit souvent même lorsque les plaquettes sont exposées à un degré d'activation minimal ne pouvant donner lieu ni à une agrégation ni à une adhésion; telles que des concentrations sub-optimales d'agonistes plaquettaires ou des forces de cisaillement [400]. L'effet de l'ASA sur le changement de forme des plaquettes s'avère en corrélation avec son effet sur la phosphorylation de la MLC, une protéine clé impliquée dans le changement de forme des plaquettes [389-391]. Cette protéine a également été inhibée en réponse à une concentration sub-optimale de collagène, mais pas de thrombine; cet effet est observé dans le cas où les plaquettes ont été stimulées ou non par le sCD40L. Cela indique que le changement de forme des plaquettes induit par le collagène est dépendant de TxA_2 [401]. Cependant, l'ASA n'a aucun effet sur l'activation de la MLC dans les plaquettes stimulées par la thrombine, ce qui se traduit par un changement de forme maintenu pendant le processus d'agrégation. Cela pourrait s'expliquer par la capacité de la thrombine à induire un changement de forme de manière indépendante de TxA_2 .

De plus, nous avons constaté que le sCD40L est capable d'augmenter la sécrétion de la TxA_2 en réponse à des doses sub-optimales d'agonistes. Ainsi, le sCD40L, en plus de son pouvoir à augmenter la sécrétion des granules α [256], peut également amplifier la sécrétion du TxA_2 . Cette observation s'accorde avec les résultats d'une étude précédente dans laquelle d'autres amorces plaquettaires augmentaient également la sécrétion de TxA_2 [402]. Intéressamment, malgré l'inhibition exercée par l'ASA, le sCD40L maintient sa capacité à déclencher l'agrégation plaquettaire en réponse à des doses sub-optimales de thrombine, indiquant que l'action d'amorçage du sCD40L est indépendante du TxA_2 . En fait, l'un des mécanismes proposés qui est à la base du développement de la résistance à l'ASA consiste en l'activation des voies de signalisation alternatives indépendantes du TxA_2 [403]. A cet égard, nos résultats démontrent que cette résistance peut être expliquée par le fait que l'ASA n'affecte pas la signalisation du CD40L. En

effet, l'ASA semble avoir un effet indirect dans la prévention de la potentialisation exercée par le sCD40L en inhibant l'action du collagène qui dépend de la sécrétion de TxA₂. Ceci n'est pas le cas de la thrombine qui peut induire l'agrégation indépendamment du TxA₂ [404]. En outre, nos travaux précédents avaient montré que la signalisation du sCD40L dans les plaquettes passait par deux voies: la voie CD40/TAK-1/ NF-κB [268] [386] et la voie Rac1/p-38 MAPK [267]. Ces voies sont restées activées même lorsque les plaquettes étaient traitées par l'ASA et stimulées par sCD40L, ce qui indique que la résistance à l'ASA induite par le sCD40L dépend du TAK-1, de NF-KB et de p-38 MAPK. Pour traduire cette étude dans un contexte plus clinique, nos résultats suggèrent que les patients qui suivent un traitement antiplaquettaire bloquant la formation de TxA₂ ne sont pas totalement protégés contre l'effet d'amorçage du sCD40L sur les plaquettes.

5.6 Conclusion :

Cette étude nous a permis de démontrer que l'ASA n'affecte pas la signalisation du sCD40L dans les plaquettes mais empêche son effet sur la sécrétion de TxA₂ et l'agrégation plaquettaire en réponse au collagène, via un mécanisme impliquant l'inhibition du changement de forme des plaquettes et la phosphorylation de la MLC. Cependant, la potentialisation de l'agrégation plaquettaire en réponse au sCD40L en présence de thrombine était partiellement inhibée car elle n'implique pas la MLC. Ainsi, nous pouvons déduire que des niveaux élevés de sCD40L dans le sang de patients coronaires peuvent avoir un impact sur l'efficacité de l'ASA. Ainsi, le ciblage de l'axe du sCD40L dans les plaquettes peut avoir un potentiel thérapeutique chez les patients présentant des taux élevés de sCD40L qui ne répondent pas ou moins à l'ASA.

5.7 Perspectives:

L'élaboration de ce projet de recherche a permis d'identifier un nouveau rôle du sCD40L dans la régulation de la fonction plaquettaire. Il a permis ainsi d'élargir nos connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents induits par le sCD40L, qui affectent l'activation et l'agrégation plaquettaire. Cette étude découle du lien, qu'on pense qu'il existe, entre les taux élevés de sCD40L en circulation et la résistance de certains patients coronariens aux thérapies antiplaquettaires conventionnelles, comme l'ASA. Ainsi, l'identification des voies de signalisation intracellulaires par lesquelles le sCD40L agit, fournit des indices importants pour le développement de cibles thérapeutiques pouvant améliorer l'efficacité des traitements antiplaquettaires.

Cependant, comme pour toute autre cible pharmacologique, il faut développer des antagonistes spécifiques contre l'axe CD40L/CD40 afin d'éviter les effets secondaires indésirables. Par exemple, le blocage de CD40 ou de CD40L pourrait entraîner des défauts dans le système immunitaire, tels que ceux observés chez les patients atteints du syndrome d'hyper-IgM qui ne disposent pas d'un système efficace de développement du système immunitaire adaptatif et dont l'incidence de cancer est augmentée à cause de l'absence de réponse immunitaire contre les cellules tumorales. Par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels l'axe CD40L/CD40 affecte la fonction plaquettaire serait nécessaire pour développer des traitements pharmacologiques efficaces qui pourraient diminuer le taux de résistance aux antiplaquettaires. Une approche suggestive serait de cibler la signalisation de TAK-1 activée par l'axe CD40L/CD40 spécifiquement dans les plaquettes par l'utilisation de agents qui interfèrent avec le TAK-1. Autres possibilités seraient de cibler la liaison du CD40 au TRAF-2 avec des peptides bloquants le TRAF-2.

Bien que cette étude ait apporté de nouvelles informations significatives sur les effets de l'ASA et son rapport avec les mécanismes par lesquels le sCD40L affecte la fonction plaquettaire, elle ne répond pas à toutes les questions et problématiques liées à l'implication de l'axe CD40L/CD40 dans l'hyperactivité des plaquettes chez les patients atteints d'ACS. Ainsi, de futures études avec les plaquettes de ces patients pourraient donner plus de renseignements sur cette relation en explorant les questions suivantes :

1. Est-ce qu'on obtiendra les mêmes résultats si on utilise des plaquettes des patients coronariens ?
2. Est-ce qu'on obtiendra les mêmes résultats si on utilise le sang complet au lieu des plaquettes lavées ?
3. Est-ce que le mécanisme de potentialisation des plaquettes par le sCD40L dépend-t-il d'un certain type d'agoniste plaquettaire ?
4. Est-ce que l'effet potentialisateur du sCD40L affecte l'efficacité d'autres antiplaquettaires?

Les réponses à ces questions apporteront sans doute d'importantes contributions à nos connaissances concernant le rôle précis de l'axe CD40L/CD40 dans les plaquettes, et par conséquent son implication dans les fonctions plaquettaires. Cet axe peut en fin de compte représenter une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Néanmoins, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de cet axe et ses implications dans le développement et la progression des maladies.

Bibliographies

1. World Health Organization. *About cardiovascular diseases*. 2016, 22 September; Available from: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/en/.
2. Nakeff, A. and B. Maat, *Separation of megakaryocytes from mouse bone marrow by velocity sedimentation*. Blood, 1974. **43**(4): p. 591-5.
3. Richardson, J.L., et al., *Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4066-75.
4. Italiano, J.E., Jr., et al., *Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes*. J Cell Biol, 1999. **147**(6): p. 1299-312.
5. Ebbe, S. and F. Stohlman, Jr., *Megakaryocytopoiesis in the Rat*. Blood, 1965. **26**: p. 20-35.
6. Odell, T.T., Jr. and C.W. Jackson, *Polyploidy and maturation of rat megakaryocytes*. Blood, 1968. **32**(1): p. 102-10.
7. Odell, T.T., Jr., C.W. Jackson, and T.J. Friday, *Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy*. Blood, 1970. **35**(6): p. 775-82.
8. Harker, L.A. and C.A. Finch, *Thrombokinetis in man*. J Clin Invest, 1969. **48**(6): p. 963-74.
9. Jackson, C.W. and C.C. Edwards, *Biphasic thrombopoietic response to severe hypobaric hypoxia*. Br J Haematol, 1977. **35**(2): p. 233-44.
10. Machlus, K.R. and J.E. Italiano, Jr., *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation*. J Cell Biol, 2013. **201**(6): p. 785-96.
11. Bessis, M., *Living Blood Cells and Their Ultrastructure*. 1973, New York: Springer-Verlag.
12. White, J.G., *Platelet structure*. 2013, Elsevier/Academic Press: San Diego. p. 117-144.
13. Kunicki, T.J., *Platelet glycoprotein antigens and immune receptors*. Prog Clin Biol Res, 1988. **283**: p. 87-123.
14. White, J.G. and W.J. Conard, *The fine structure of freeze-fractured blood platelets*. Am J Pathol, 1973. **70**(1): p. 45-56.
15. Del Conde, I., et al., *Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1604-11.
16. White, J.G., *The submembrane filaments of blood platelets*. Am J Pathol, 1969. **56**(2): p. 267-77.
17. Hartwig, J.H. and M. DeSisto, *The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments*. J Cell Biol, 1991. **112**(3): p. 407-25.
18. Haydon, G.B. and D.A. Taylor, *Microtubules in hamster platelets*. J Cell Biol, 1965. **26**(2): p. 673-6.
19. Bessis, M. and J. Breton-Gorius, *[Microtubules and fibrils in spread-out platelets]*. Nouv Rev Fr Hematol, 1965. **5**(4): p. 657-62.
20. White, J.G. and W. Krivit, *An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling*. Blood, 1967. **30**(5): p. 625-35.
21. White, J.G., *Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate*. Blood, 1968. **31**(5): p. 604-22.
22. Escolar, G., M. Krumwiede, and J.G. White, *Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension*. Am J Pathol, 1986. **123**(1): p. 86-94.
23. White, J.G. and M. Krumwiede, *Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets*. Blood, 1987. **69**(4): p. 1196-1203.
24. Behnke, O., *Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet*. Anat Rec, 1967. **158**(2): p. 121-137.
25. Behnke, O., *An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat*. J Ultrastruct Res, 1968. **24**(5): p. 412-433.
26. Breton-Gorius, J., *Development of two distinct membrane systems associated in giant complexes in pathological megakaryocytes*. Ser Haematol, 1975. **8**(1): p. 49-67.
27. White, J.G. and G. Escolar, *The blood platelet open canalicular system: a two-way street*. Eur J Cell Biol, 1991. **56**(2): p. 233-242.
28. Escolar, G. and J.G. White, *The platelet open canalicular system: a final common pathway*. Blood Cells, 1991. **17**(3): p. 467-485.
29. White, J.G. and C.C. Clawson, *Effects of small latex particle uptake on the surface connected canalicular system of blood platelets: a freeze-fracture and cytochemical study*. Diagn Histopathol, 1982. **5**(1): p. 3-10.

30. Escolar, G., E. Leistikow, and J.G. White, *The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets*. Blood, 1989. **74**(6): p. 1983-1988.
31. Lundblad, R.L. and G.C. White, 2nd, *The interaction of thrombin with blood platelets*. Platelets, 2005. **16**(7): p. 373-85.
32. White, J.G., *Platelet glycosomes*. Platelets, 1999. **10**(4): p. 242-6.
33. White, J.G., *Medich giant platelet disorder: a unique alpha granule deficiency I. Structural abnormalities*. Platelets, 2004. **15**(6): p. 345-53.
34. Tranzer, J.P., M. Da Prada, and A. Pletscher, *Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine in blood platelets*. Nature, 1966. **212**(5070): p. 1574-5.
35. Siegel, A. and E.F. Luscher, *Non-identity of the alpha-granules of human blood platelets with typical lysosomes*. Nature, 1967. **215**(5102): p. 745-7.
36. Flaumenhaft, R., *Platelet secretion*. 2013, Elsevier/Academic Press: San Diego. p. 343-366.
37. Cramer, E.M., et al., *Uncoordinated expression of alpha-granule proteins in human megakaryocytes*. Prog Clin Biol Res, 1990. **356**: p. 131-42.
38. Hegyi, E., L.K. Heilbrun, and A. Nakeff, *Immunogold probing of platelet factor 4 in different ploidy classes of rat megakaryocytes sorted by flow cytometry*. Exp Hematol, 1990. **18**(7): p. 789-93.
39. Heijnen, H.F., et al., *Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules*. Blood, 1998. **91**(7): p. 2313-25.
40. Berger, G., J.M. Massé, and E.M. Cramer, *Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V*. Blood, 1996. **87**(4): p. 1385-1395.
41. Maynard, D.M., et al., *Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(9): p. 1945-1955.
42. Nurden, P., M. Jandrot-Perrus, and R. Combrié, *Severe deficiency of glycoprotein VI in a patient with gray platelet syndrome*. Blood, 2004. **104**(1): p. 107-114.
43. Michelson, A.D. and M.I. Furman, *Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance*. Curr Opin Hematol, 1999. **6**(5): p. 342-348.
44. Michelson, A.D., *Flow cytometry: a clinical test of platelet function*. Blood, 1996. **87**(12): p. 4925-4936.
45. Michelson, A.D., *Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(2): p. 154-169.
46. Coppinger, J.A., G. Cagney, and S. Toomey, *Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2096-2104.
47. Raposo, G., M.S. Marks, and D.F. Cutler, *Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(4): p. 394-401.
48. Holmsen, H. and H.J. Weiss, *Secretable storage pools in platelets*. Annu Rev Med, 1979. **30**: p. 119-34.
49. Ruiz, F.A., et al., *Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes*. J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44250-7.
50. Aikawa, M., et al., *Interaction of rabbit platelets and leukocytes in the release of histamine. Electron microscopic observations*. Am J Pathol, 1971. **63**(1): p. 85-98.
51. Ribatti, D. and E. Crivellato, *Giulio Bizzozero and the discovery of platelets*. Leuk Res, 2007. **31**(10): p. 1339-41.
52. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 938-49.
53. Jackson, S.P., *The growing complexity of platelet aggregation*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5087-95.
54. Ruggeri, Z.M., *Platelet adhesion under flow*. Microcirculation, 2009. **16**(1): p. 58-83.
55. McFadyen, J.D. and S.P. Jackson, *Differentiating haemostasis from thrombosis for therapeutic benefit*. Thromb Haemost, 2013. **110**(5): p. 859-67.
56. Lopez, J.A., et al., *Bernard-Soulier syndrome*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4397-418.
57. George, J.N., J.P. Caen, and A.T. Nurden, *Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease*. Blood, 1990. **75**(7): p. 1383-95.
58. Broos, K., et al., *Platelets at work in primary hemostasis*. Blood Rev, 2011. **25**(4): p. 155-67.
59. Gawaz, M., et al., *Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty*. Circulation, 1996. **93**(2): p. 229-37.

60. Gawaz, M., et al., *Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction*. *Circulation*, 1997. **96**(6): p. 1809-18.
61. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalph*. *J Exp Med*, 1998. **187**(3): p. 329-39.
62. Subramaniam, M., et al., *Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice*. *Blood*, 1996. **87**(4): p. 1238-42.
63. Frenette, P.S., et al., *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(16): p. 7450-4.
64. Frenette, P.S., et al., *Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules*. *Blood*, 1998. **91**(4): p. 1318-24.
65. Massberg, S., et al., *Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin*. *Blood*, 1998. **92**(2): p. 507-15.
66. Romo, G.M., et al., *The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin*. *J Exp Med*, 1999. **190**(6): p. 803-14.
67. Frenette, P.S., 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**(8): p. 1413-22.
68. Laszik, Z., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells*. *Blood*, 1996. **88**(8): p. 3010-21.
69. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. *Nat Med*, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
70. Massberg, S., et al., *Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo*. *Blood*, 1999. **94**(11): p. 3829-38.
71. Farndale, R.W., et al., *Collagen-platelet interactions: recognition and signalling*. *Biochem Soc Symp*, 2003(70): p. 81-94.
72. Ruggeri, Z.M., *Structure and function of von Willebrand factor*. *Thromb Haemost*, 1999. **82**(2): p. 576-84.
73. Jaffe, E.A., L.W. Hoyer, and R.L. Nachman, *Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells*. *J Clin Invest*, 1973. **52**(11): p. 2757-64.
74. Nachman, R., R. Levine, and E.A. Jaffe, *Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes*. *J Clin Invest*, 1977. **60**(4): p. 914-21.
75. Ruggeri, Z.M., *The role of von Willebrand factor in thrombus formation*. *Thromb Res*, 2007. **120 Suppl 1**: p. S5-9.
76. Sadler, J.E., *Biochemistry and genetics of von Willebrand factor*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 395-424.
77. Wagner, D.D., et al., *Divergent fates of von Willebrand factor and its propolypeptide (von Willebrand antigen II) after secretion from endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(7): p. 1955-9.
78. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates*. *Blood Rev*, 2009. **23**(4): p. 177-89.
79. Kanaji, S., et al., *Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis*. *J Thromb Haemost*, 2012. **10**(8): p. 1646-52.
80. Verhenne, S., et al., *Platelet-derived VWF is not essential for normal thrombosis and hemostasis but fosters ischemic stroke injury in mice*. *Blood*, 2015. **126**(14): p. 1715-22.
81. Sporn, L.A., V.J. Marder, and D.D. Wagner, *Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers*. *Cell*, 1986. **46**(2): p. 185-90.
82. Wagner, D.D., *Cell biology of von Willebrand factor*. *Annu Rev Cell Biol*, 1990. **6**: p. 217-46.
83. Wagner, D.D., et al., *Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propolypeptide*. *Cell*, 1991. **64**(2): p. 403-13.
84. Ruggeri, Z.M. and J. Ware, *von Willebrand factor*. *FASEB J*, 1993. **7**(2): p. 308-16.
85. Tsai, H.M., et al., *Multimeric composition of endothelial cell-derived von Willebrand factor*. *Blood*, 1989. **73**(8): p. 2074-6.
86. Reininger, A.J., *Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis*. *Haemophilia*, 2008. **14 Suppl 5**: p. 11-26.
87. Schneider, S.W., et al., *Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(19): p. 7899-903.

88. Moake, J.L., et al., *Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation*. J Clin Invest, 1986. **78**(6): p. 1456-61.
89. Federici, A.B., et al., *Binding of von Willebrand factor to glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex: affinity is related to multimeric size*. Br J Haematol, 1989. **73**(1): p. 93-9.
90. Fischer, B.E., et al., *Effect of multimerization of human and recombinant von Willebrand factor on platelet aggregation, binding to collagen and binding of coagulation factor VIII*. Thromb Res, 1996. **84**(1): p. 55-66.
91. Sporn, L.A., V.J. Marder, and D.D. Wagner, *von Willebrand factor released from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively*. Blood, 1987. **69**(5): p. 1531-4.
92. Siedlecki, C.A., et al., *Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor*. Blood, 1996. **88**(8): p. 2939-50.
93. Zheng, X.L., *Structure-function and regulation of ADAMTS-13 protease*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 11-23.
94. Levy, G.G., et al., *Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura*. Nature, 2001. **413**(6855): p. 488-94.
95. Jin, S.Y., et al., *von Willebrand factor cleaved from endothelial cells by ADAMTS13 remains ultralarge in size*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(10): p. 1749-52.
96. De Ceunynck, K., et al., *Local elongation of endothelial cell-anchored von Willebrand factor strings precedes ADAMTS13 protein-mediated proteolysis*. J Biol Chem, 2011. **286**(42): p. 36361-7.
97. Tsai, H.M., Sussman, II, and R.L. Nagel, *Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma*. Blood, 1994. **83**(8): p. 2171-9.
98. Furlan, M., et al., *Triplet structure of von Willebrand factor reflects proteolytic degradation of high molecular weight multimers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7503-7.
99. Gebhardt, J.C. and M. Rief, *Biochemistry. Force signaling in biology*. Science, 2009. **324**(5932): p. 1278-80.
100. Furlan, M. and B. Lammle, *Haemolytic-uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura--new insights into underlying biochemical mechanisms*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(8): p. 1112-4.
101. Du, X., *Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(3): p. 262-9.
102. Cosemans, J.M., et al., *Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(8): p. 1797-808.
103. Watson, S.P., J.M. Herbert, and A.Y. Pollitt, *GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(7): p. 1456-67.
104. Suzuki-Inoue, K., et al., *Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 25993-6001.
105. Bobe, R., et al., *How many Ca(2)+ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets*. Platelets, 2005. **16**(3-4): p. 133-50.
106. Freyssinet, J.M. and F. Toti, *Formation of procoagulant microparticles and properties*. Thromb Res, 2010. **125 Suppl 1**: p. S46-8.
107. Morel, O., et al., *Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses*. Platelets, 2008. **19**(1): p. 9-23.
108. Brass, L.F., et al., *Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 581-9.
109. Vu, T.K., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
110. Ishii, K., et al., *Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases*. J Biol Chem, 1994. **269**(2): p. 1125-30.
111. Trejo, J., S.R. Hammes, and S.R. Coughlin, *Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13698-702.
112. Molino, M., et al., *Proteolysis of the human platelet and endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin G*. J Biol Chem, 1995. **270**(19): p. 11168-75.

113. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors*. *Circ Res*, 2006. **99**(12): p. 1293-304.
114. Getz, T.M., et al., *Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional implications in platelets*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(10): p. 2283-93.
115. Stalker, T.J., et al., *Platelet signaling*. *Handb Exp Pharmacol*, 2012(210): p. 59-85.
116. Garcia, A., et al., *Role of phosphoinositide 3-kinase beta in platelet aggregation and thromboxane A2 generation mediated by Gi signalling pathways*. *Biochem J*, 2010. **429**(2): p. 369-77.
117. Hechler, B., et al., *The P2Y1 receptor; necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel*. *Br J Haematol*, 1998. **103**(3): p. 858-66.
118. Leon, C., et al., *Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(12): p. 1731-7.
119. Fabre, J.E., et al., *Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice*. *Nat Med*, 1999. **5**(10): p. 1199-202.
120. Bergmeier, W., et al., *Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(6): p. 1699-707.
121. Crittenden, J.R., et al., *CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation*. *Nat Med*, 2004. **10**(9): p. 982-6.
122. Chrzanowska-Wodnicka, M., et al., *Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 680-7.
123. Han, J., et al., *Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin alphaIIb beta3*. *Curr Biol*, 2006. **16**(18): p. 1796-806.
124. Bouaouina, M., Y. Lad, and D.A. Calderwood, *The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta1 and beta3 integrins*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(10): p. 6118-25.
125. Banno, A. and M.H. Ginsberg, *Integrin activation*. *Biochem Soc Trans*, 2008. **36**(Pt 2): p. 229-34.
126. Anthis, N.J., et al., *The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction*. *EMBO J*, 2009. **28**(22): p. 3623-32.
127. Shattil, S.J., C. Kim, and M.H. Ginsberg, *The final steps of integrin activation: the end game*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(4): p. 288-300.
128. Munnix, I.C., et al., *Platelet response heterogeneity in thrombus formation*. *Thromb Haemost*, 2009. **102**(6): p. 1149-56.
129. Brass, L.F., L. Zhu, and T.J. Stalker, *Minding the gaps to promote thrombus growth and stability*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(12): p. 3385-92.
130. Turpie, A.G., B.S. Chin, and G.Y. Lip, *Venous thromboembolism: pathophysiology, clinical features, and prevention*. *BMJ*, 2002. **325**(7369): p. 887-90.
131. Falk, E., *Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi*. *Br Heart J*, 1983. **50**(2): p. 127-34.
132. Falati, S., et al., *Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin*. *J Exp Med*, 2003. **197**(11): p. 1585-98.
133. Mallat, Z., et al., *Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity*. *Circulation*, 1999. **99**(3): p. 348-53.
134. Heemskerk, J.W., E.M. Bevers, and T. Lindhout, *Platelet activation and blood coagulation*. *Thromb Haemost*, 2002. **88**(2): p. 186-93.
135. Nesbitt, W.S., et al., *A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation*. *Nat Med*, 2009. **15**(6): p. 665-73.
136. Hamet, P., et al., *Abnormalities of platelet function in hypertension and diabetes*. *Hypertension*, 1985. **7**(6 Pt 2): p. II135-42.
137. Hirsh, J., *Hyperreactive platelets and complications of coronary artery disease*. *N Engl J Med*, 1987. **316**(24): p. 1543-4.
138. Trip, M.D., et al., *Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction*. *N Engl J Med*, 1990. **322**(22): p. 1549-54.

139. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3378-84.
140. Davi, G. and C. Patrono, *Platelet activation and atherothrombosis*. N Engl J Med, 2007. **357**(24): p. 2482-94.
141. Kaplan, Z.S. and S.P. Jackson, *The role of platelets in atherothrombosis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 51-61.
142. Jennings, L.K., *Role of platelets in atherothrombosis*. Am J Cardiol, 2009. **103**(3 Suppl): p. 4A-10A.
143. Schonbeck, U. and P. Libby, *CD40 signaling and plaque instability*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1092-103.
144. Schonbeck, U., et al., *Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7458-63.
145. Lutgens, E., et al., *Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7464-9.
146. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
147. Schonbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(1): p. 4-43.
148. Andre, P., et al., *CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 247-52.
149. Leveille, C., et al., *CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5143-51.
150. Zirlik, A., et al., *CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1*. Circulation, 2007. **115**(12): p. 1571-80.
151. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 111-35.
152. Elgueta, R., et al., *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 152-72.
153. Zhang, B., et al., *The CD40/CD40L system: a new therapeutic target for disease*. Immunol Lett, 2013. **153**(1-2): p. 58-61.
154. Andre, P., et al., *Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 896-9.
155. Ludewig, B., et al., *Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(12): p. 3137-43.
156. Blair, P.J., et al., *CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis*. J Exp Med, 2000. **191**(4): p. 651-60.
157. Graf, D., et al., *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*. Eur J Immunol, 1995. **25**(6): p. 1749-54.
158. Lievens, D., et al., *The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 206-14.
159. Mach, F., et al., *Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1931-6.
160. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
161. Anand, S.X., et al., *Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease*. Thromb Haemost, 2003. **90**(3): p. 377-84.
162. Fullard, J.F., *The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(14): p. 1567-76.
163. Scarborough, R.M., et al., *Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of Sistrurus m. barbouri*. J Biol Chem, 1991. **266**(15): p. 9359-62.
164. El Fakhry, Y., et al., *Functional interaction of CD154 protein with alpha5beta1 integrin is totally independent from its binding to alphaIIb beta3 integrin and CD40 molecules*. J Biol Chem, 2012. **287**(22): p. 18055-66.
165. Hassan, G.S., Y. Merhi, and W.M. Mourad, *CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies*. Trends Immunol, 2009. **30**(4): p. 165-72.

166. Michel, N.A., A. Zirlik, and D. Wolf, *CD40L and Its Receptors in Atherothrombosis-An Update*. Front Cardiovasc Med, 2017. **4**: p. 40.
167. Dunne, J.L., et al., *Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1*. Blood, 2002. **99**(1): p. 336-41.
168. Dunne, J.L., et al., *Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6105-11.
169. Altieri, D.C., et al., *A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Biol Chem, 1990. **265**(21): p. 12119-22.
170. Kanse, S.M., et al., *Promotion of leukocyte adhesion by a novel interaction between vitronectin and the beta2 integrin Mac-1 (alphaMbeta2, CD11b/CD18)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): p. 2251-6.
171. Peter, K., et al., *Heparin inhibits ligand binding to the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. Circulation, 1999. **100**(14): p. 1533-9.
172. Ehlers, R., et al., *Targeting platelet-leukocyte interactions: identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor glycoprotein Ibalpha*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1077-88.
173. Simon, D.I., *Opening the field of integrin biology to "biased agonism"*. Circ Res, 2011. **109**(11): p. 1199-201.
174. Rosetti, F. and T.N. Mayadas, *The many faces of Mac-1 in autoimmune disease*. Immunol Rev, 2016. **269**(1): p. 175-93.
175. Lozano, R., et al., *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2095-128.
176. Wolf, D., et al., *Inflammation, but not recruitment, of adipose tissue macrophages requires signalling through Mac-1 (CD11b/CD18) in diet-induced obesity (DIO)*. Thromb Haemost, 2017. **117**(2): p. 325-338.
177. Ding, A., S.D. Wright, and C. Nathan, *Activation of mouse peritoneal macrophages by monoclonal antibodies to Mac-1 (complement receptor type 3)*. J Exp Med, 1987. **165**(3): p. 733-49.
178. Wolf, D., et al., *Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKKSRTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis--but does not affect immunity and thrombosis in mice*. Circ Res, 2011. **109**(11): p. 1269-79.
179. Alturaihi, H., et al., *Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals*. Eur J Immunol, 2015. **45**(2): p. 592-602.
180. Obara, M., M.S. Kang, and K.M. Yamada, *Site-directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: separable, synergistic sites mediate adhesive function*. Cell, 1988. **53**(4): p. 649-57.
181. Mould, A.P., J.A. Askari, and M.J. Humphries, *Molecular basis of ligand recognition by integrin alpha 5beta 1. I. Specificity of ligand binding is determined by amino acid sequences in the second and third NH2-terminal repeats of the alpha subunit*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20324-36.
182. Hassan, G.S., Y. Merhi, and W. Mourad, *CD40 ligand: a neo-inflammatory molecule in vascular diseases*. Immunobiology, 2012. **217**(5): p. 521-32.
183. Orecchia, A., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the alpha 5 beta 1 integrin*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 17): p. 3479-89.
184. Mittal, A., et al., *Fibronectin and integrin alpha 5 play requisite roles in cardiac morphogenesis*. Dev Biol, 2013. **381**(1): p. 73-82.
185. Loubaki, L., et al., *Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/alpha 5 beta 1 interaction*. Mol Immunol, 2010. **47**(11-12): p. 2112-8.
186. Bachsais, M., et al., *The Interaction of CD154 with the alpha5beta1 Integrin Inhibits Fas-Induced T Cell Death*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0158987.
187. Duperray, A., et al., *Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes*. J Cell Biol, 1987. **104**(6): p. 1665-73.
188. Lefkovits, J., E.F. Plow, and E.J. Topol, *Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine*. N Engl J Med, 1995. **332**(23): p. 1553-9.
189. Bennett, J.S., *Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3363-9.
190. Topol, E.J., T.V. Byzova, and E.F. Plow, *Platelet GPIIb-IIIa blockers*. Lancet, 1999. **353**(9148): p. 227-31.

191. Lau, T.L., et al., *The structure of the integrin α IIb β 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling*. EMBO J, 2009. **28**(9): p. 1351-61.
192. Prasad, K.S., et al., *Soluble CD40 ligand induces β 3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12367-71.
193. Bruemmer, D., et al., *Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions*. Am J Cardiol, 2001. **87**(1): p. 21-7.
194. Alderson, M.R., et al., *CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 669-74.
195. Banchereau, J., et al., *Functional CD40 antigen on B cells, dendritic cells and fibroblasts*. Adv Exp Med Biol, 1995. **378**: p. 79-83.
196. Tone, M., et al., *Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1751-6.
197. Hou, H., et al., *Modulation of neuronal differentiation by CD40 isoforms*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **369**(2): p. 641-7.
198. Chatzigeorgiou, A.E., et al., *CD40 expression and its association with low-grade inflammation in a Greek population of type 1 diabetic juveniles: evidence for differences in CD40 mRNA isoforms expressed by peripheral blood mononuclear cells*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2010. **118**(1): p. 38-46.
199. Contin, C., et al., *Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor- α -converting enzyme. Implications for CD40 signaling*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32801-9.
200. Eshel, D., et al., *Characterization of natural human antagonistic soluble CD40 isoforms produced through alternative splicing*. Mol Immunol, 2008. **46**(2): p. 250-7.
201. Reyes-Moreno, C., et al., *CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7799-806.
202. Pullen, S.S., et al., *High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization*. Biochemistry, 1999. **38**(31): p. 10168-77.
203. He, X.H., L.H. Xu, and Y. Liu, *Enhancement of binding activity of soluble human CD40 to CD40 ligand through incorporation of an isoleucine zipper motif*. Acta Pharmacol Sin, 2006. **27**(3): p. 333-8.
204. Lang, I., et al., *Binding Studies of TNF Receptor Superfamily (TNFRSF) Receptors on Intact Cells*. J Biol Chem, 2016. **291**(10): p. 5022-37.
205. Armitage, R.J., et al., *Identification of a source of biologically active CD40 ligand*. Eur J Immunol, 1992. **22**(8): p. 2071-6.
206. Wyzgol, A., et al., *Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 1851-61.
207. Reyes-Moreno, C., et al., *Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling*. J Biol Chem, 2007. **282**(27): p. 19473-80.
208. Xie, P., *TRAF molecules in cell signaling and in human diseases*. J Mol Signal, 2013. **8**(1): p. 7.
209. Danese, S., M. Sans, and C. Fiocchi, *The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease*. Gut, 2004. **53**(7): p. 1035-43.
210. Neron, S., et al., *B cell proliferation following CD40 stimulation results in the expression and activation of Src protein tyrosine kinase*. Int Immunol, 2006. **18**(2): p. 375-87.
211. Schonbeck, U., et al., *Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo*. J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 843-53.
212. Wolf, D., et al., *Coinhibitory suppression of T cell activation by CD40 protects against obesity and adipose tissue inflammation in mice*. Circulation, 2014. **129**(23): p. 2414-25.
213. Ledbetter, J.A., et al., *Augmentation of normal and malignant B cell proliferation by monoclonal antibody to the B cell-specific antigen BP50 (CDW40)*. J Immunol, 1987. **138**(3): p. 788-94.
214. Banchereau, J., et al., *The CD40 antigen and its ligand*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 881-922.
215. Durandy, A., S. Kracker, and A. Fischer, *Primary antibody deficiencies*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(7): p. 519-33.
216. Nutt, S.L. and D.M. Tarlinton, *Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends?* Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 472-7.

217. Baumjohann, D., et al., *Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype*. *Immunity*, 2013. **38**(3): p. 596-605.
218. Ma, D.Y. and E.A. Clark, *The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells*. *Semin Immunol*, 2009. **21**(5): p. 265-72.
219. Bhadra, R., J.P. Gigley, and I.A. Khan, *Cutting edge: CD40-CD40 ligand pathway plays a critical CD8-intrinsic and -extrinsic role during rescue of exhausted CD8 T cells*. *J Immunol*, 2011. **187**(9): p. 4421-5.
220. Korniluk, A., H. Kemono, and V. Dymicka-Piekarska, *Multifunctional CD40L: pro- and anti-neoplastic activity*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(10): p. 9447-57.
221. Packard, R.R. and P. Libby, *Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction*. *Clin Chem*, 2008. **54**(1): p. 24-38.
222. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(7): p. 508-19.
223. Li, D., et al., *LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(5): p. 816-21.
224. Geraldès, P., et al., *Estradiol blocks the induction of CD40 and CD40L expression on endothelial cells and prevents neutrophil adhesion: an ERalpha-mediated pathway*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(3): p. 566-73.
225. Wagner, A.H., et al., *Cytokine-inducible CD40 expression in human endothelial cells is mediated by interferon regulatory factor-1*. *Blood*, 2002. **99**(2): p. 520-5.
226. Lutgens, E., et al., *CD40 and its ligand in atherosclerosis*. *Trends Cardiovasc Med*, 2007. **17**(4): p. 118-23.
227. Omari, K.M., R. Chui, and K. Dorovini-Zis, *Induction of beta-chemokine secretion by human brain microvessel endothelial cells via CD40/CD40L interactions*. *J Neuroimmunol*, 2004. **146**(1-2): p. 203-8.
228. Pluvinet, R., et al., *CD40: an upstream master switch for endothelial cell activation uncovered by RNAi-coupled transcriptional profiling*. *Blood*, 2008. **112**(9): p. 3624-37.
229. Thienel, U., J. Loike, and M.J. Yellin, *CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets*. *Cell Immunol*, 1999. **198**(2): p. 87-95.
230. Sakurai, K., et al., *Induction of endothelin-1 production in endothelial cells via co-operative action between CD40 and lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1)*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004. **44 Suppl 1**: p. S173-80.
231. Lutgens, E. and M.J. Daemen, *CD40-CD40L interactions in atherosclerosis*. *Trends Cardiovasc Med*, 2002. **12**(1): p. 27-32.
232. Mukundan, L., et al., *CD40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through a Src-initiated, MAPK-dependent pathway*. *Cell Signal*, 2004. **16**(3): p. 375-84.
233. Yellin, M.J., et al., *Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation*. *J Leukoc Biol*, 1995. **58**(2): p. 209-16.
234. Springer, T.A., *Adhesion receptors of the immune system*. *Nature*, 1990. **346**(6283): p. 425-34.
235. Xu, F., et al., *Activation of adventitial fibroblasts contributes to the early development of atherosclerosis: a novel hypothesis that complements the "Response-to-Injury Hypothesis" and the "Inflammation Hypothesis"*. *Med Hypotheses*, 2007. **69**(4): p. 908-12.
236. Croce, K. and P. Libby, *Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis*. *Curr Opin Hematol*, 2007. **14**(1): p. 55-61.
237. Libby, P., *Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2001. **104**(3): p. 365-72.
238. Wu, M. and Y.G. Li, *The expression of CD40-CD40L and activities of matrix metalloproteinases in atherosclerotic rats*. *Mol Cell Biochem*, 2006. **282**(1-2): p. 141-6.
239. Schonbeck, U., et al., *Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture?* *Circ Res*, 1997. **81**(3): p. 448-54.
240. May, A.E., et al., *Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alphaIIb)beta3 on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells*. *Circulation*, 2002. **106**(16): p. 2111-7.
241. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. *Nature*, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
242. Hermann, A., et al., *Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel*. *Platelets*, 2001. **12**(2): p. 74-82.

243. Charafeddine, A.H., et al., *Platelet-derived CD154: ultrastructural localization and clinical correlation in organ transplantation*. *Am J Transplant*, 2012. **12**(11): p. 3143-51.
244. Doescher, A., et al., *Platelet recovery and survival measured in patients by quantitative polymerase chain reaction of mitochondrial DNA*. *Transfusion*, 2015. **55**(1): p. 55-63.
245. Denis, M.M., et al., *Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets*. *Cell*, 2005. **122**(3): p. 379-91.
246. Gnatenko, D.V., et al., *Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression*. *Blood*, 2003. **101**(6): p. 2285-93.
247. Simon, L.M., et al., *Human platelet microRNA-mRNA networks associated with age and gender revealed by integrated plateletomics*. *Blood*, 2014. **123**(16): p. e37-45.
248. Flaumenhaft, R., *Molecular basis of platelet granule secretion*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(7): p. 1152-60.
249. Leroyer, A.S., et al., *CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **52**(16): p. 1302-11.
250. Danese, S., et al., *Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients*. *Gut*, 2003. **52**(10): p. 1435-41.
251. Chaturvedi, R., et al., *Soluble CD40 ligand: a novel biomarker in the pathogenesis of periodontal disease*. *Clin Oral Investig*, 2015. **19**(1): p. 45-52.
252. Henn, V., et al., *The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40*. *Blood*, 2001. **98**(4): p. 1047-54.
253. Elzey, B.D., et al., *Cooperation between platelet-derived CD154 and CD4+ T cells for enhanced germinal center formation*. *J Leukoc Biol*, 2005. **78**(1): p. 80-4.
254. Elzey, B.D., et al., *Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments*. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 9-19.
255. Cognasse, F., et al., *Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins*. *Exp Hematol*, 2007. **35**(9): p. 1376-87.
256. Inwald, D.P., et al., *CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation*. *Circ Res*, 2003. **92**(9): p. 1041-8.
257. Santos-Martinez, M.J., et al., *Role of metalloproteinases in platelet function*. *Thromb Res*, 2008. **121**(4): p. 535-42.
258. Matthies, K.M., et al., *Differential regulation of soluble and membrane CD40L proteins in T cells*. *Cell Immunol*, 2006. **241**(1): p. 47-58.
259. Yacoub, D., et al., *CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(50): p. 36083-93.
260. Furman, M.I., et al., *Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **43**(12): p. 2319-25.
261. Nannizzi-Alaimo, L., V.L. Alves, and D.R. Phillips, *Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation*. *Circulation*, 2003. **107**(8): p. 1123-8.
262. Choi, W.S., O.H. Jeon, and D.S. Kim, *CD40 ligand shedding is regulated by interaction between matrix metalloproteinase-2 and platelet integrin alpha(IIb)beta(3)*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(6): p. 1364-71.
263. Rahman, M., et al., *Metalloproteinases regulate CD40L shedding from platelets and pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis*. *Inflamm Res*, 2012. **61**(6): p. 571-9.
264. Fernandez Bello, I., et al., *Platelet soluble CD40L and matrix metalloproteinase 9 activity are proinflammatory mediators in Behcet disease patients*. *Thromb Haemost*, 2012. **107**(1): p. 88-98.
265. Rahman, M., et al., *Platelet shedding of CD40L is regulated by matrix metalloproteinase-9 in abdominal sepsis*. *J Thromb Haemost*, 2013. **11**(7): p. 1385-98.
266. Kuijpers, M.J., et al., *Platelet CD40L Modulates Thrombus Growth Via Phosphatidylinositol 3-Kinase beta, and Not Via CD40 and IkappaB Kinase alpha*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(6): p. 1374-81.
267. Yacoub, D., et al., *Enhanced levels of soluble CD40 ligand exacerbate platelet aggregation and thrombus formation through a CD40-dependent tumor necrosis factor receptor-associated factor-2/Rac1/p38*

- mitogen-activated protein kinase signaling pathway*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(12): p. 2424-33.
268. Hachem, A., et al., *Involvement of nuclear factor kappaB in platelet CD40 signaling*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **425**(1): p. 58-63.
269. Karim, Z.A., et al., *IkappaB kinase phosphorylation of SNAP-23 controls platelet secretion*. *Blood*, 2013. **121**(22): p. 4567-74.
270. Gerdes, N., et al., *Platelet CD40 Exacerbates Atherosclerosis by Transcellular Activation of Endothelial Cells and Leukocytes*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(3): p. 482-90.
271. Langer, F., et al., *The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation*. *Thromb Haemost*, 2005. **93**(6): p. 1137-46.
272. Simic, D., et al., *Blocking alpha5beta1 Integrin Attenuates sCD40L-Mediated Platelet Activation*. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2017. **23**(6): p. 607-614.
273. Donners, M.M., et al., *The CD40-TRAF6 axis is the key regulator of the CD40/CD40L system in neointima formation and arterial remodeling*. *Blood*, 2008. **111**(9): p. 4596-604.
274. Willecke, F., et al., *Interruption of classic CD40L-CD40 signalling but not of the novel CD40L-Mac-1 interaction limits arterial neointima formation in mice*. *Thromb Haemost*, 2014. **112**(2): p. 379-89.
275. Huo, Y., et al., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. *Nat Med*, 2003. **9**(1): p. 61-7.
276. von Hundelshausen, P. and C. Weber, *Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease*. *Circ Res*, 2007. **100**(1): p. 27-40.
277. Lievens, D., et al., *Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis*. *Blood*, 2010. **116**(20): p. 4317-27.
278. Danese, S., et al., *CD40L-positive platelets induce CD40L expression de novo in endothelial cells: adding a loop to microvascular inflammation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(9): p. e162.
279. Danese, S., et al., *Platelets trigger a CD40-dependent inflammatory response in the microvasculature of inflammatory bowel disease patients*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(5): p. 1249-64.
280. Wolf, D., A. Zirlik, and K. Ley, *Beyond vascular inflammation--recent advances in understanding atherosclerosis*. *Cell Mol Life Sci*, 2015. **72**(20): p. 3853-69.
281. Xu, H., et al., *Platelet-derived or soluble CD154 induces vascularized allograft rejection independent of cell-bound CD154*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(3): p. 769-74.
282. Elzey, B.D., et al., *Platelet-derived CD154 enables T-cell priming and protection against Listeria monocytogenes challenge*. *Blood*, 2008. **111**(7): p. 3684-91.
283. Falk, E., et al., *Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view*. *Eur Heart J*, 2013. **34**(10): p. 719-28.
284. Franchi, F. and D.J. Angiolillo, *Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome*. *Nat Rev Cardiol*, 2015. **12**(1): p. 30-47.
285. Angiolillo, D.J., M. Ueno, and S. Goto, *Basic principles of platelet biology and clinical implications*. *Circ J*, 2010. **74**(4): p. 597-607.
286. Amsterdam, E.A., et al., *2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **64**(24): p. e139-e228.
287. Kolh, P., et al., *2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: the Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI)*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014. **46**(4): p. 517-92.
288. Franchi, F., et al., *Novel Antiplatelet Agents: The Current State and What Is Coming Down the Pike*. *Prog Cardiovasc Dis*, 2015. **58**(3): p. 267-77.
289. Ferreira, S.H., S. Moncada, and J.R. Vane, *Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen*. *Nat New Biol*, 1971. **231**(25): p. 237-9.
290. *Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group*. *Lancet*, 1988. **2**(8607): p. 349-60.

291. Patrono, C., et al., *Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis*. N Engl J Med, 2005. **353**(22): p. 2373-83.
292. *Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--II: Maintenance of vascular graft or arterial patency by antiplatelet therapy*. Antiplatelet Trialists' Collaboration. BMJ, 1994. **308**(6922): p. 159-68.
293. Yeo, E.L., J.A. Sheppard, and I.A. Feuerstein, *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**(9): p. 2498-507.
294. Antithrombotic Trialists, C., *Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients*. BMJ, 2002. **324**(7329): p. 71-86.
295. Roth, G.J. and P.W. Majerus, *The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein*. J Clin Invest, 1975. **56**(3): p. 624-32.
296. Hamberg, M., J. Svensson, and B. Samuelsson, *Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(8): p. 2994-8.
297. Nakahata, N., *Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology*. Pharmacol Ther, 2008. **118**(1): p. 18-35.
298. FitzGerald, G.A., *Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists*. Am J Cardiol, 1991. **68**(7): p. 11B-15B.
299. Pedersen, A.K. and G.A. FitzGerald, *Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase*. N Engl J Med, 1984. **311**(19): p. 1206-11.
300. Harris, P.A. and S. Riegelman, *Influence of the route of administration on the area under the plasma concentration-time curve*. J Pharm Sci, 1969. **58**(1): p. 71-5.
301. Costello, P.B. and F.A. Green, *Aspirin survival in human blood modulated by the concentration of erythrocytes*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(5): p. 550-5.
302. Floyd, C.N. and A. Ferro, *Mechanisms of aspirin resistance*. Pharmacol Ther, 2014. **141**(1): p. 69-78.
303. Patrignani, P., P. Filabozzi, and C. Patrono, *Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects*. J Clin Invest, 1982. **69**(6): p. 1366-72.
304. Dale, G.L., *Platelet kinetics*. Curr Opin Hematol, 1997. **4**(5): p. 330-4.
305. Demers, L.M., R.E. Budin, and B.S. Shaikh, *The effects of aspirin on megakaryocyte prostaglandin production*. Proc Soc Exp Biol Med, 1980. **163**(1): p. 24-9.
306. van Pampus, E.C., et al., *Influence of aspirin on human megakaryocyte prostaglandin synthesis*. Eur J Haematol, 1993. **50**(5): p. 264-8.
307. Patrono, C., et al., *Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans*. J Clin Invest, 1986. **77**(2): p. 590-4.
308. Hennekens, C.H., et al., *Terms and conditions: semantic complexity and aspirin resistance*. Circulation, 2004. **110**(12): p. 1706-8.
309. Armstrong, P.C., et al., *Aspirin and the in vitro linear relationship between thromboxane A2-mediated platelet aggregation and platelet production of thromboxane A2*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(11): p. 1933-43.
310. Antithrombotic Trialists, C., et al., *Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials*. Lancet, 2009. **373**(9678): p. 1849-60.
311. Hankey, G.J. and J.W. Eikelboom, *Aspirin resistance*. Lancet, 2006. **367**(9510): p. 606-17.
312. Bhatt, D.L. and E.J. Topol, *Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(1): p. 15-28.
313. Clappers, N., et al., *The C50T polymorphism of the cyclooxygenase-1 gene and the risk of thrombotic events during low-dose therapy with acetyl salicylic acid*. Thromb Haemost, 2008. **100**(1): p. 70-5.
314. Goodman, T., A. Ferro, and P. Sharma, *Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review*. Br J Clin Pharmacol, 2008. **66**(2): p. 222-32.
315. Simsek, S., et al., *Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis*. Blood, 1993. **81**(3): p. 835-40.

316. Floyd, C.N. and A. Ferro, *The platelet fibrinogen receptor: from megakaryocyte to the mortuary*. JRSM Cardiovasc Dis, 2012. **1**(2).
317. Evangelista, V., et al., *De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin*. Circ Res, 2006. **98**(5): p. 593-5.
318. Pascale, S., et al., *Aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia is explained by accelerated renewal of the drug target*. Blood, 2012. **119**(15): p. 3595-603.
319. Grove, E.L., et al., *Effect of platelet turnover on whole blood platelet aggregation in patients with coronary artery disease*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(1): p. 185-91.
320. Capodanno, D., et al., *Pharmacodynamic effects of different aspirin dosing regimens in type 2 diabetes mellitus patients with coronary artery disease*. Circ Cardiovasc Interv, 2011. **4**(2): p. 180-7.
321. Vane, J.R., Y.S. Bakhle, and R.M. Botting, *Cyclooxygenases 1 and 2*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998. **38**: p. 97-120.
322. Otto, J.C. and W.L. Smith, *Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2*. J Lipid Mediat Cell Signal, 1995. **12**(2-3): p. 139-56.
323. Mitchell, J.A., et al., *Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11693-7.
324. Marcus, A.J., et al., *Synthesis of prostacyclin from platelet-derived endoperoxides by cultured human endothelial cells*. J Clin Invest, 1980. **66**(5): p. 979-86.
325. Papp, A.C., et al., *Production of eicosanoids by deendothelialized rabbit aorta: interaction between platelets and vascular wall in the synthesis of prostacyclin*. Thromb Res, 1986. **42**(4): p. 549-56.
326. Wu, K.K., et al., *Interaction between lymphocytes and platelets in the synthesis of prostacyclin*. J Clin Invest, 1987. **79**(6): p. 1601-6.
327. Maghni, K., et al., *Cell-cell interactions between platelets, macrophages, eosinophils and natural killer cells in thromboxane A2 biosynthesis*. J Lipid Mediat, 1993. **6**(1-3): p. 321-32.
328. Zou, M. and C. Angeles, *Cell-cell interaction between platelets and IL-1 beta-stimulated vascular smooth muscle cells in synthesis of thromboxane A2*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1997. **56**(2): p. 85-91.
329. Catella, F. and G.A. FitzGerald, *Paired analysis of urinary thromboxane B2 metabolites in humans*. Thromb Res, 1987. **47**(6): p. 647-56.
330. Orlandi, M., et al., *Thromboxane A2 synthase activity in platelet free human monocytes*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1215**(3): p. 285-90.
331. Penglis, P.S., et al., *Differential regulation of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenase inhibitors*. J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1605-11.
332. Hla, T. and K. Neilson, *Human cyclooxygenase-2 cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7384-8.
333. Belton, O., et al., *Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis*. Circulation, 2000. **102**(8): p. 840-5.
334. Bonaterra, G.A., et al., *Increased cyclooxygenase-2 expression in peripheral blood mononuclear cells of smokers and hyperlipidemic subjects*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(2): p. 235-42.
335. Nowak, J., et al., *Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes*. Circulation, 1987. **76**(1): p. 6-14.
336. McAdam, B.F., et al., *Contribution of cyclooxygenase-2 to elevated biosynthesis of thromboxane A2 and prostacyclin in cigarette smokers*. Circulation, 2005. **112**(7): p. 1024-9.
337. Schroeder, W.S., L. Ghobrial, and P.J. Gandhi, *Possible mechanisms of drug-induced aspirin and clopidogrel resistance*. J Thromb Thrombolysis, 2006. **22**(2): p. 139-50.
338. Hohlfeld, T., A. Saxena, and K. Schror, *High on treatment platelet reactivity against aspirin by non-steroidal anti-inflammatory drugs--pharmacological mechanisms and clinical relevance*. Thromb Haemost, 2013. **109**(5): p. 825-33.
339. Catella-Lawson, F., et al., *Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin*. N Engl J Med, 2001. **345**(25): p. 1809-17.
340. MacDonald, T.M. and L. Wei, *Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin*. Lancet, 2003. **361**(9357): p. 573-4.

341. Kurth, T., et al., *Inhibition of clinical benefits of aspirin on first myocardial infarction by nonsteroidal antiinflammatory drugs*. *Circulation*, 2003. **108**(10): p. 1191-5.
342. Farkouh, M.E., et al., *Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), cardiovascular outcomes: randomised controlled trial*. *Lancet*, 2004. **364**(9435): p. 675-84.
343. Ishimoto, Y. and T. Nakano, *Release of a product of growth arrest-specific gene 6 from rat platelets*. *FEBS Lett*, 2000. **466**(1): p. 197-9.
344. Angelillo-Scherrer, A., et al., *Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis*. *Nat Med*, 2001. **7**(2): p. 215-21.
345. Gould, W.R., et al., *Gas6 receptors Axl, Sky and Mer enhance platelet activation and regulate thrombotic responses*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(4): p. 733-41.
346. Angelillo-Scherrer, A., et al., *Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(2): p. 237-46.
347. Burnier, L., et al., *Plasma levels of the growth arrest-specific gene 6 product (Gas6) and antiplatelet drug responsiveness in healthy subjects*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(10): p. 2283-4.
348. Munoz, X., et al., *Association of specific haplotypes of GAS6 gene with stroke*. *Thromb Haemost*, 2007. **98**(2): p. 406-12.
349. Balogh, I., et al., *Analysis of Gas6 in human platelets and plasma*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(6): p. 1280-6.
350. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(3): p. 562-73.
351. Sawicki, G., et al., *Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation*. *Nature*, 1997. **386**(6625): p. 616-9.
352. Sawicki, G., et al., *Localization and translocation of MMP-2 during aggregation of human platelets*. *Thromb Haemost*, 1998. **80**(5): p. 836-9.
353. Falcinelli, E., et al., *Intraplatelet signaling mechanisms of the priming effect of matrix metalloproteinase-2 on platelet aggregation*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(11): p. 2526-35.
354. Falcinelli, E., et al., *Platelets release active matrix metalloproteinase-2 in vivo in humans at a site of vascular injury: lack of inhibition by aspirin*. *Br J Haematol*, 2007. **138**(2): p. 221-30.
355. Vasku, A., et al., *A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease*. *Matrix Biol*, 2004. **22**(7): p. 585-91.
356. Sierra-Honigmann, M.R., et al., *Biological action of leptin as an angiogenic factor*. *Science*, 1998. **281**(5383): p. 1683-6.
357. Beltowski, J., *Leptin and atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2006. **189**(1): p. 47-60.
358. Elbatarny, H.S. and D.H. Maurice, *Leptin-mediated activation of human platelets: involvement of a leptin receptor and phosphodiesterase 3A-containing cellular signaling complex*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **289**(4): p. E695-702.
359. Dellas, C., et al., *Leptin signalling and leptin-mediated activation of human platelets: importance of JAK2 and the phospholipases Cgamma2 and A2*. *Thromb Haemost*, 2007. **98**(5): p. 1063-71.
360. Konstantinides, S., et al., *Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(10): p. 1533-40.
361. Sugiyama, C., et al., *Platelet aggregation in obese and diabetic subjects: association with leptin level*. *Platelets*, 2007. **18**(2): p. 128-34.
362. Gresele, P., et al., *Thromboxane synthase inhibitors, thromboxane receptor antagonists and dual blockers in thrombotic disorders*. *Trends Pharmacol Sci*, 1991. **12**(4): p. 158-63.
363. Vezza, R., et al., *Prostaglandin E2 potentiates platelet aggregation by priming protein kinase C*. *Blood*, 1993. **82**(9): p. 2704-13.
364. Ma, H., et al., *Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3*. *Circulation*, 2001. **104**(10): p. 1176-80.
365. Fabre, J.E., et al., *Activation of the murine EP3 receptor for PGE2 inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(5): p. 603-10.

366. Gross, S., et al., *Vascular wall-produced prostaglandin E2 exacerbates arterial thrombosis and atherothrombosis through platelet EP3 receptors*. J Exp Med, 2007. **204**(2): p. 311-20.
367. Gresele, P., et al., *Adenylate cyclase activation determines the effect of thromboxane synthase inhibitors on platelet aggregation in vitro. Comparison of platelets from responders and nonresponders*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. **246**(1): p. 301-7.
368. Podrez, E.A., et al., *Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1086-95.
369. Brass, L.F., L. Zhu, and T.J. Stalker, *Novel therapeutic targets at the platelet vascular interface*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. s43-50.
370. Lobbes, M.B., et al., *Is there more than C-reactive protein and fibrinogen? The prognostic value of soluble CD40 ligand, interleukin-6 and oxidized low-density lipoprotein with respect to coronary and cerebral vascular disease*. Atherosclerosis, 2006. **187**(1): p. 18-25.
371. Thomas, M.R. and R.F. Storey, *The role of platelets in inflammation*. Thromb Haemost, 2015. **114**(3): p. 449-58.
372. Willoughby, S., A. Holmes, and J. Loscalzo, *Platelets and cardiovascular disease*. Eur J Cardiovasc Nurs, 2002. **1**(4): p. 273-88.
373. Cheng-Ching, E., et al., *Update on pharmacology of antiplatelets, anticoagulants, and thrombolytics*. Neurology, 2012. **79**(13 Suppl 1): p. S68-76.
374. Elwood, P.C., C. Hughes, and J.R. O'Brien, *Platelets, aspirin, and cardiovascular disease*. Postgrad Med J, 1998. **74**(876): p. 587-91.
375. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
376. Lutgens, E., et al., *Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1313-6.
377. Dichiaro, J., et al., *Platelet function measured by VerifyNow identifies generalized high platelet reactivity in aspirin treated patients*. Platelets, 2007. **18**(6): p. 414-23.
378. Macchi, L., et al., *Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate*. Thromb Res, 2002. **107**(1-2): p. 45-9.
379. Stolla, M.C., et al., *Enhanced platelet activity and thrombosis in a murine model of type I diabetes are partially insulin-like growth factor 1-dependent and phosphoinositide 3-kinase-dependent*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(5): p. 919-29.
380. Lupia, E., et al., *Elevated thrombopoietin in plasma of burned patients without and with sepsis enhances platelet activation*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(6): p. 1000-8.
381. Angiolillo, D.J., et al., *Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2430-5.
382. Gresele, P., E. Falcinelli, and S. Momi, *Potentiation and priming of platelet activation: a potential target for antiplatelet therapy*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(7): p. 352-60.
383. Aukrust, P., et al., *Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes*. Circulation, 1999. **100**(6): p. 614-20.
384. Hakkinen, T., K. Karkola, and S. Yla-Herttuala, *Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (Fc gammaRIII)*. Virchows Arch, 2000. **437**(4): p. 396-405.
385. Yan, J.C., et al., *Relationship between upregulation of CD40 system and restenosis in patients after percutaneous coronary intervention*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(3): p. 339-43.
386. Kojok, K., et al., *CD40L Priming of Platelets via NF-kappaB Activation is CD40- and TAK1-Dependent*. J Am Heart Assoc, 2018. **7**(23): p. e03677.
387. Yacoub, D., et al., *Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release*. J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 30024-35.
388. Pamukcu, B., et al., *The CD40-CD40L system in cardiovascular disease*. Ann Med, 2011. **43**(5): p. 331-40.
389. Siess, W., *Molecular mechanisms of platelet activation*. Physiol Rev, 1989. **69**(1): p. 58-178.
390. Klages, B., et al., *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**(4): p. 745-54.

391. Lokeshwar, V.B. and L.Y. Bourguignon, *The involvement of Ca²⁺ and myosin light chain kinase in collagen-induced platelet activation*. Cell Biol Int Rep, 1992. **16**(9): p. 883-97.
392. Gum, P.A., et al., *Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2001. **88**(3): p. 230-5.
393. Shantsila, E. and G.Y. Lip, *Variability of response to antiplatelet therapy: what should we do next?* Fundam Clin Pharmacol, 2009. **23**(1): p. 19-22.
394. Kasotakis, G., Pipinos, II, and T.G. Lynch, *Current evidence and clinical implications of aspirin resistance*. J Vasc Surg, 2009. **50**(6): p. 1500-10.
395. Heeschen, C., et al., *Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2003. **348**(12): p. 1104-11.
396. Best, L.C., et al., *The interrelationship between thromboxane biosynthesis, aggregation and 5-hydroxytryptamine secretion in human platelets in vitro*. Thromb Haemost, 1980. **43**(1): p. 38-40.
397. Loeffen, R., et al., *Factor XIa and Thrombin Generation Are Elevated in Patients with Acute Coronary Syndrome and Predict Recurrent Cardiovascular Events*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0158355.
398. Manten, A., et al., *Procoagulant and proinflammatory activity in acute coronary syndromes*. Cardiovasc Res, 1998. **40**(2): p. 389-95.
399. de Souza Brito, F. and P. Tricoci, *Novel anti-platelet agents: focus on thrombin receptor antagonists*. J Cardiovasc Transl Res, 2013. **6**(3): p. 415-24.
400. Shin, E.K., et al., *Platelet Shape Changes and Cytoskeleton Dynamics as Novel Therapeutic Targets for Anti-Thrombotic Drugs*. Biomol Ther (Seoul), 2017. **25**(3): p. 223-230.
401. Jarvis, G.E., et al., *Distinct roles of GPII and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens*. Br J Pharmacol, 2002. **137**(1): p. 107-17.
402. Blair, T.A., S.F. Moore, and I. Hers, *Circulating primers enhance platelet function and induce resistance to antiplatelet therapy*. J Thromb Haemost, 2015. **13**(8): p. 1479-93.
403. Topcuoglu, M.A., E.M. Arsava, and H. Ay, *Antiplatelet resistance in stroke*. Expert Rev Neurother, 2011. **11**(2): p. 251-63.
404. Lewis, G.P. and I.S. Watts, *Prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and adenosine diphosphate in collagen-induced aggregation of rabbit platelets*. Br J Pharmacol, 1982. **75**(4): p. 623-31.