

Université de Montréal

**L'Axe SCD40L/NF- κ B/Protéasome est un Amorceur des
Fonctions Plaquettaires**

Par

Abed El Hakim El Kadiry

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)

en Sciences Biomédicales

Option Médecine Expérimentale

Août 2020

© Abed El Hakim El Kadiry, 2020

Université de Montréal
Programme de Sciences Biomédicales, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

L'Axe SCD40L/NF- κ B/Protéasome est un Amorceur des Fonctions Plaquettaires

Présenté par

Abed El Hakim El Kadiry

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Denis Deblois
Président-rapporteur

Yahye Merhi
Directeur de recherche

Angelo Calderone
Membre du jury

Résumé

Les plaquettes sont la principale source de CD40L soluble (sCD40L), une molécule thrombo-inflammatoire dont les taux élevés chez les patients atteints des maladies coronariennes (CAD) prédisent des événements athérotrombotiques. Nous avons déjà démontré que le sCD40L active deux voies de signalisation dans les plaquettes, la p38 MAPK et le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B), non affectées par l'activité antiplaquettaire de l'aspirine (ASA). Nous avons montré aussi que le sCD40L, en réponse à des doses sous-optimales d'agonistes plaquettaires comme la thrombine et le collagène, potentialise l'agrégation des plaquettes *via* le récepteur CD40 et son effecteur cible présent en aval le NF- κ B. En effet, le NF- κ B appartient à une famille de dimères cytoplasmiques inactivés par l'inhibiteur I κ B et régulés par l'I κ B kinase (IKK). Suite à des signaux immunologiques, l'IKK phosphoryle l'I κ B, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. Par conséquent, le NF- κ B, une fois libre, se déplace vers les noyaux des cellules immunitaires où il agit sur le génome pour maintenir la survie et la prolifération cellulaires. Contrairement aux cellules immunitaires, la régulation et les fonctions de NF- κ B dans les plaquettes, fragments cellulaires dépourvus de génome, sont moins bien comprises. Dans ce projet, nous proposons l'hypothèse que l'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome amorce les plaquettes en les prédisposant à une activation et une agrégation prononcées. Nos objectifs seront donc (i) d'étudier l'interaction entre le NF- κ B et le protéasome en réponse au sCD40L et (ii) d'examiner les rôles de cet axe sur les fonctions plaquettaires.

Pour cela, des plaquettes ont été fraîchement isolées à partir du sang des donneurs humains sains qui ne prennent pas des médicaments antiplaquettaires ou anti-inflammatoires. Ces plaquettes ont été par la suite stimulées par le sCD40L. En étudiant l'activation de NF- κ B, l'analyse par Western blot a montré que le sCD40L induit la phosphorylation d'I κ B et la dégradation de sa forme phosphorylée (p-I κ B) dans un délai de 30 minutes, d'une manière similaire à l'action de la thrombine, l'agoniste plaquettaire le plus puissant. Le prétraitement des plaquettes avec deux classes d'inhibiteurs de NF- κ B, le répresseur d'IKK (BAY 11-7082) et l'antagoniste du protéasome (MG132), a montré que l'activation du NF- κ B dans les plaquettes est régulée par l'IKK et le protéasome, identiquement aux cellules nucléées. L'examen des événements de signalisation induits par le sCD40L a montré que l'inhibition du NF- κ B

plaquettaire n'affecte pas la phosphorylation de p38 MAPK ou le clivage protéasomique de la Taline-1 qui est impliquée dans le changement de la forme des plaquettes. Concernant les effets sur les fonctions plaquettaires, l'inhibition de NF- κ B ou du protéasome n'a pas influencé l'agrégation des plaquettes induite par des doses élevées de collagène ou de thrombine. Cependant, elle a considérablement réduit l'agrégation plaquettaire suite à un amorçage avec le sCD40L, suivie d'une stimulation avec des doses sous-optimales de collagène ou de thrombine. Nous avons également constaté que le sCD40L exacerbe la rétraction des caillots fibrino-plaquettaire formés par de faibles doses de thrombine. Cet effet d'amorçage est régulé par l'axe NF- κ B/protéasome.

En bref, l'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome fonctionne de manière non génomique, en amorçant les plaquettes, induisant ainsi la potentialisation de l'agrégation plaquettaire et l'augmentation de la rétraction des caillots fibrino-plaquettaire. Par conséquent, le ciblage de cet axe dans les plaquettes pourrait avoir un rôle thérapeutique chez les patients atteints de CAD et dont les plaquettes ne répondent pas ou sont moins sensibles aux traitements antiplaquettaires conventionnels.

Mots-clés : plaquettes ▪ sCD40L ▪ NF- κ B ▪ protéasome ▪ amorçage ▪ agrégation ▪ rétraction du caillot

Abstract

Platelets are the principal source of soluble CD40L (sCD40L), a thrombo-inflammatory molecule whose high levels in coronary artery disease (CAD) patients predict atherothrombotic events. We have previously demonstrated that sCD40L activates two signaling pathways in platelets, p38 MAPK and the nuclear factor- κ B (NF- κ B), both of which were unaffected by the anti-platelet activity of aspirin (ASA). We have also shown that sCD40L, in response to suboptimal doses of platelet agonists like thrombin and collagen, potentiates platelet aggregation through CD40 receptor and its downstream effector target NF- κ B. Indeed, NF- κ B belongs to a family of cytoplasmic dimers that are inactivated by the inhibitor I κ B and regulated by I κ B kinase (IKK). Following immunological signals, IKK phosphorylates I κ B, driving the degradation of its phosphorylated form (p-I κ B) by the proteasome. Consequently, NF- κ B becomes free to translocate to the nuclei of immune cells where it acts genomically to maintain survival and proliferation. That is the case in immune cells, but in platelets which are devoid of genome, the regulation and functions of NF- κ B are less understood. Herein, we hypothesized that sCD40L/NF- κ B/proteasome axis primes platelets, predisposing them to pronounced activation and aggregation. We thus aimed to (i) assess the interplay between NF- κ B and proteasome in response to sCD40L and (ii) investigate the roles of this axis at the level of platelet functions.

For this purpose, platelets were freshly isolated from the blood of healthy human donors who are not on anti-platelet or anti-inflammatory medication and then stimulated with sCD40L. In monitoring the activation of NF- κ B, western blot analysis showed that sCD40L induces the phosphorylation of I κ B and the degradation of p-I κ B during a 30-mins time window, in a similar fashion to the most potent platelet agonist thrombin. The pre-treatment of platelets with two classes of NF- κ B inhibitors, an IKK repressor (BAY 11-7082) and a proteasome antagonist (MG132), showed that the activation of platelet NF- κ B is regulated by IKK and the proteasome as in nucleated cells. The examination of the functional signaling events induced by sCD40L showed that NF- κ B inhibition does not affect the phosphorylation of p38 MAPK or the proteasomal cleavage of shape change-involved Talin-1. In functional studies, NF- κ B or proteasomal inhibition did not influence the aggregation of platelets induced by high doses of collagen or thrombin; however, it markedly reduced platelet aggregation primed with sCD40L followed by stimulation with sub-optimal doses of collagen or thrombin. We also found that sCD40L exacerbates the

retraction of fibrin-platelet clots formed by low doses of thrombin. This priming effect was regulated by NF- κ B/proteasome dyad.

In brief, sCD40L/NF- κ B/proteasome axis primes platelets and functions non-genomically, inducing the potentiation of platelet aggregation and augmenting the retraction of fibrin-platelet clots. Hence, targeting this axis in platelets might have a therapeutic potential in CAD patients whose platelets are not or less responsive to conventional antiplatelet therapies.

Keywords: platelets ▪ sCD40L ▪ NF- κ B ▪ proteasome ▪ priming ▪ aggregation ▪ clot retraction

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiv
Chapitre 1: Les Plaquettes	1
1.1 Introduction	2
1.2 L'origine et la structure des plaquettes	2
1.3 Fonctions plaquettaires	4
1.3.1 Fonction hémostatique	4
1.3.1.1 L'adhésion plaquettaire	5
1.3.1.2 L'activation plaquettaire.....	5
1.3.1.3 La sécrétion plaquettaire.....	8
1.3.1.4 L'agrégation plaquettaire.....	10
1.3.1.5 La rétraction du caillot fibrino-plaquettaire.....	12
1.3.2 Les fonctions plaquettaires dans l'athérombose.....	12
1.4 Les agonistes et les amorceurs plaquettaires	14
1.4.1 Les agonistes plaquettaires	14
1.4.1.1 Le collagène.....	14
1.4.1.2 La thrombine.....	15
1.4.1.3 L'ADP	16
1.4.1.4 Le TxA ₂	16
1.4.2 Les amorceurs/potentialisateurs plaquettaires	17
1.4.2.1 Gas6	17
1.4.2.2 MMP-2	17
1.4.2.3 Leptine.....	18
1.4.2.4 PGE ₂	18
1.4.2.5 LDL.....	18
1.4.2.6 Épinéphrine.....	18

1.4.2.7 CD40L.....	19
Chapitre 2: Le CD40L	20
2.1 Introduction.....	21
2.2 L'expression du CD40L.....	21
2.3 Les récepteurs du CD40L.....	22
2.3.1 Le Mac-1	22
2.3.2 L' $\alpha 5\beta 1$	23
2.3.3 L' $\alpha IIb\beta 3$	23
2.3.4 Le CD40.....	24
2.4 L'implication de l'axe CD40L/CD40 dans les fonctions plaquettaires	24
Chapitre 3 : Le NF- κ B	28
3.1 Introduction.....	29
3.2 Le NF- κ B: structure, régulation et activation.....	29
3.3 Le NF- κ B plaquettaire	31
3.3.1 Son expression.....	31
3.3.2 Ses fonctions.....	31
3.3.2.1 La survie plaquettaire et l'apoptose.....	31
3.3.2.2 L'amorçage, l'activation et l'agrégation plaquettaires.....	32
3.3.2.2 Une fonction au-delà des plaquettes.....	34
Chapitre 4: Le protéasome	36
4.1 Le protéasome	37
4.1.1 Structure et fonctions cellulaires.....	37
4.1.2 L'axe protéasome/NF- κ B.....	41
4.2 Le protéasome plaquettaire	42
4.2.1 Aperçu.....	42
4.2.2 Les activateurs et les régulateurs	42
4.3 Les fonctions du protéasome plaquettaire	43
4.3.1 La production et la viabilité des plaquettes	43
4.3.2 L'activation et l'agrégation plaquettaires.....	43
4.3.2.1 Le cas des conditions pathologiques.....	43
4.3.2.2 Le cas des inhibiteurs du protéasome.....	44
Chapitre 5 : Projet de recherche	47
5.1 Problématique.....	48

5.2 Hypothèse.....	50
5.3 Objectifs	50
5.4 Méthodes.....	51
5.4.1 Les réactifs et les anticorps.....	51
5.4.2 Préparation des plaquettes humaines	51
5.4.3 Immunobuvardage de type <i>western</i>	51
5.4.4 Mesure de l'agrégation plaquettaire	52
5.4.5 Essai de rétraction du caillot fibrino-plaquettaire.....	53
5.4.6 Analyses statistiques	53
5.5 Résultats.....	54
5.5.1 Le sCD40L induit la dégradation du phospho-I κ B α plaquettaire.....	54
5.5.2 L'axe sCD40L/CD40/NF- κ B plaquettaire est régulé par l'IKK et le protéasome	56
5.5.3 L'activation de la p38 MAPK et le clivage protéasomique de la Taline-1, induits par sCD40L, ne sont pas régulés par NF- κ B.....	58
5.5.4 L'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome potentialise l'agrégation plaquettaire.....	60
5.5.5 L'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome augmente la rétraction du caillot fibrino-plaquettaire.....	62
5.6 Discussion	63
5.7 Conclusion.....	69
5.8 Directives Futures.....	69
Bibliographie	71
Annexe I.....	101
Annexe II.....	102
Annexe III	103

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1: Schéma montrant la structure et la compartimentation plaquettaires.....	3
Figure 1.2: Schéma des principales voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire.....	6
Figure 1.3: Schéma illustrant les étapes de la sécrétion des granules plaquettaires.....	9
Figure 1.4: Schéma des principales voies de signalisation spécifiques aux récepteurs se produisant séquentiellement pendant l'activation des plaquettes.....	10
Figure 1.5: Schéma montrant les étapes menant à la formation du bouchon fibrine-plaquettes qui maintient l'hémostase primaire.....	11

Chapitre 2

Figure 2.1: Les récepteurs du CD40L.....	22
Figure 2.2: Fonctions proposées de l'interaction CD40L-CD40 dans les plaquettes.....	25

Chapitre 3

Figure 3.1: L'activation de NF- κ B: la voie canonique et non canonique.....	30
Figure 3.2: Les rôles possibles du NF- κ B plaquettaire.....	35

Chapitre 4

Figure 4.1: La structure du protéasome 26S.....	38
Figure 4.2: La voie de l'UPS et les fonctions des DUBs.....	39

Chapitre 5

Figure 5.1: La dégradation du phospho-I κ B α et d'I κ B α dans les plaquettes activées par la thrombine ou amorcées par le sCD40L.....	55
Figure 5.2: Modulation de l'axe sCD40L/CD40/NF- κ B dans les plaquettes.....	57
Figure 5.3: Influence de l'axe sCD40L/NF- κ B sur la signalisation fonctionnelle des plaquettes.....	59
Figure 5.4: L'inhibition du protéasome réduit la potentialisation de l'agrégation plaquettaire induite par sCD40L	61
Figure 5.5: L'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome augmente la rétraction du caillot fibrino-plaquettaire.....	63
Figure 5.6: L'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome est un amorceur plaquettaire.....	68

Liste des tableaux

Chapitre 3

Tableau 3.1: Effets de l'inhibition de NF- κ B par les répresseurs de l'IKK sur l'amorçage, l'activation et l'agrégation plaquettares.....	33
--	----

Chapitre 4

Tableau 4.1: Les antagonistes du protéasome et leurs caractéristiques.....	40
---	----

Liste des abréviations

CAD : *coronary artery diseases*

OCS : *open canalicular system*

PS : phosphatidyl sérine

TF : *tissue factor*

TxA₂ : Thromboxane A₂

GPCR(s) : *G-protein-coupled receptor(s)*

Tyros3 : *Tyrosine-protein kinase receptor 3*

PLCγ2 : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate phosphodiesterase gamma-2

NO : *nitric oxide*

MMP(s) : *matrix metalloproteinase(s)*

vWF : *von Willebrand factor*

DAG : 1,2-diacylglycérol

PK : protéine kinase

VASP : *vasodilator-stimulated phosphoprotein*

PLA₂ : phospholipase A₂

CD40L : *cluster of differentiation 40 ligand*

sCD40L : *soluble CD40L*

TP : récepteur du thromboxane

PAR : *protease-activated receptor*

MLC : *myosin light chain*

MLCK : *MLC kinase*

AC : adénylate cyclase

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

NSF : *N-ethylmaleimide sensitive factor*

SNAREs : *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor-associated protein receptors*

vSNAREs : *vesicular SNAREs*

tSNAREs : *target membrane SNAREs*

SNAP : *soluble NSF-associated proteins*

VAMP : *vesicle-associated membrane proteins*

MAPK : *MAP kinase*

AA : *acide arachidonique*

COX-1 : *cyclooxygénase 1*

TNF : *tumor necrosis factor*

TNFR : *TNF receptor*

TRAF(s) : *TNFR-associated factor(s)*

DCs : *dendritic cells*

CE : *cellules endothéliales*

SMC : *smooth muscle cells*

TAK1 : *transforming growth factor- β -activated kinase 1*

ASA : *acetylsalicylic acid (aspirine)*

NF- κ B : *nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

I κ B : *inhibitor of NF- κ B*

IKK : *I κ B kinase*

UPS : *Ubiquitin-Proteasome System*

DUBs : *deubiquitinases, deubiquitinating enzymes*

PRP : *plasma riche en plaquettes (platelet-rich plasma)*

*“Our dreams prove that to imagine –
to dream about things that have not happened –
is among mankind's deepest needs.”*

— Milan Kundera

Aux cicatrices de ma patrie, je porterai des milliers de rêves...

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude infinie à mon directeur de recherche, le professeur Yahye Merhi, pour sa supervision et ses critiques constructives. Vous n'étiez pas seulement mon directeur de thèse mais aussi un facilitateur, un supporteur et un mentor. Le domaine de la recherche manque de directeurs de vos qualités et de votre intelligence émotionnelle. Merci de m'avoir accueilli au sein de votre équipe pour pouvoir m'engager dans une bonne continuation de ma carrière scientifique.

Mon collègue, Dr Kevin Kojok, merci beaucoup pour la formation et le tutorat, pour votre omniprésence, pour les remarques et le soutien, et pour la création d'une atmosphère amicale et dynamique au sein de notre équipe de recherche.

Ma marraine, Dre Catherine Martel, je vous remercie pour vos commentaires pertinents et votre positivité. Mes membres du jury, Dr. Denis Deblois et Dr. Angelo Calderone, votre temps et vos critiques sont sincèrement appréciés.

Au personnel de l'Institut de Cardiologie de Montréal, infirmières et donneurs du sang, merci de m'offrir tout ce que j'ai besoin pour réaliser ce projet.

Enfin, à ma mère, mon père, mon frère et ma sœur, je serai toujours reconnaissant de votre soutien et vos sacrifices. Vous êtes ma source d'inspiration et de motivation pour devenir un homme meilleur et réaliser mes intentions. Ce travail vous est dédié.

Chapitre 1: Les Plaquettes

1.1 Introduction

Les maladies cardiovasculaires occupent le premier rang dans le monde et le deuxième rang au Canada en termes de cause de décès. Parmi les maladies cardiovasculaires, les troubles thrombotiques reliés avec les maladies coronariennes (CAD) et les maladies cérébrovasculaires, entraînent le taux de mortalité le plus élevé [1,2]. Ces troubles sont dus à l'obstruction des vaisseaux sanguins empêchant ainsi la circulation normale du sang. Physiologiquement, la circulation sanguine et l'intégrité des vaisseaux sanguins sont maintenues par un mécanisme hémostatique complexe qui regroupe plusieurs acteurs tels que les cellules sanguines, les plaquettes, les cellules endothéliales (CE), les protéines plasmatiques, les facteurs de coagulation et les médiateurs inflammatoires. Cependant, une fois l'hémostase est perturbée suite à la formation et la rupture des plaques athérosclérotiques, des événements thrombotiques s'ensuivent [3]. Parmi les principaux acteurs de la thrombose vasculaire, les plaquettes sont des cibles efficaces dans le traitement des maladies thrombotiques. Ce chapitre contextualise l'origine et les caractéristiques des plaquettes, décrit leurs fonctions dans les processus physiologiques et physiopathologiques et représente les molécules qui les activent ou renforcent leur activation.

1.2 L'origine et la structure des plaquettes

Les plaquettes sont issues de la fragmentation des mégacaryocytes – cellules précurseurs provenant des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes. Leur formation suit un modèle pro-plaquettaire dans lequel de longues extensions dans le cytoplasme des mégacaryocytes matures sont formées et pincées. Une fois dans la circulation, les pro-plaquettes sont encore fragmentées en plaquettes individuelles [4].

En effet, les plaquettes sont des fragments cellulaires discoïdes anucléés d'environ 3 μm de diamètre et 0,5 μm d'épaisseur. Leur nombre est en moyenne 250 millions/ml de sang adulte; et ont une durée de vie de 10 jours [5,6]. Leurs organelles cytoplasmiques dérivent des mégacaryocytes, et leur structure regroupe 3 compartiments: la membrane plasmique, le cytosquelette et le cytoplasme [7] (**Figure 1.1**).

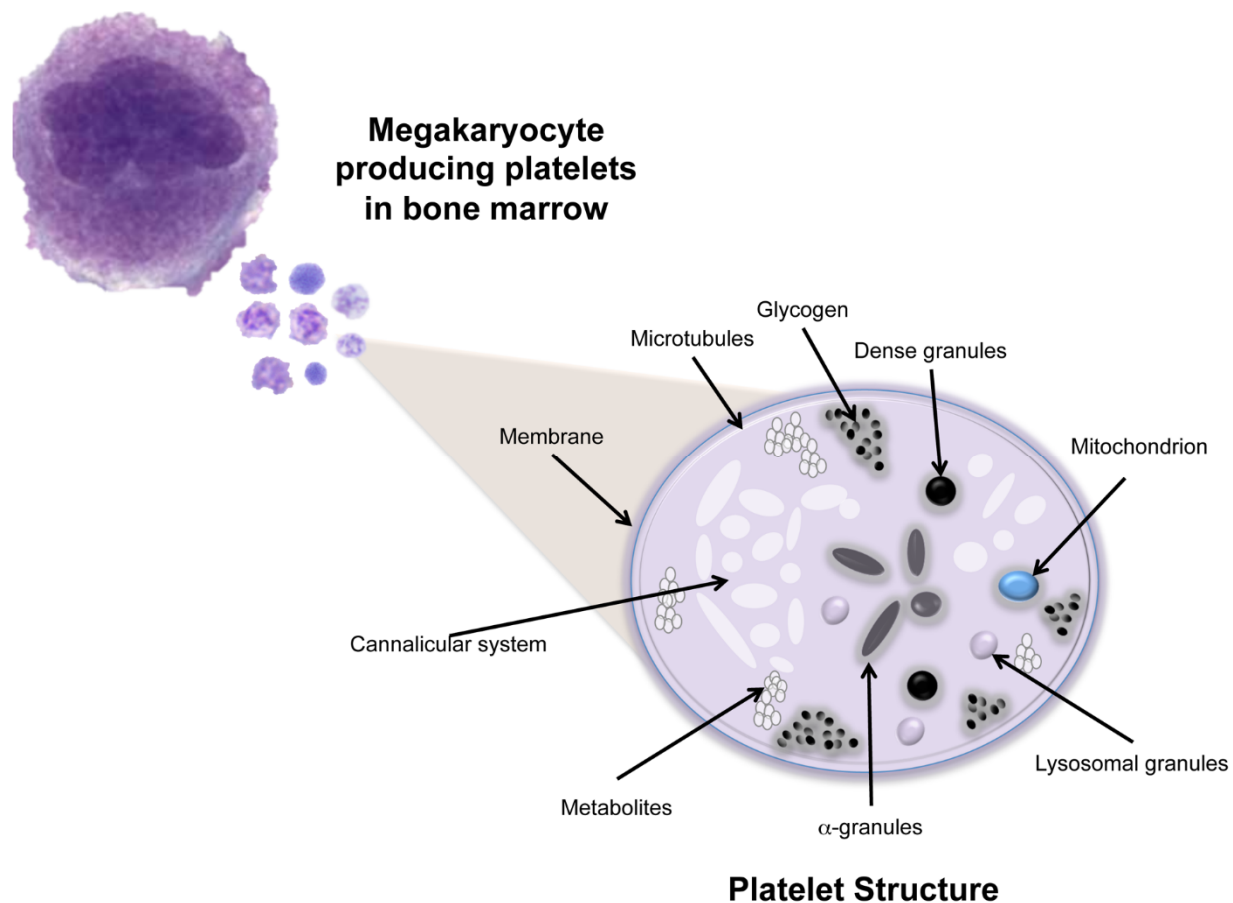


Figure 1.1: Schéma montrant la structure et la compartimentation plaquettaire [7].

La membrane plasmique des plaquettes est une bicouche lipidique qui est minutieusement invaginée dans le cytoplasme, formant ainsi un système de canaux connectés en surface appelé le système canaliculaire ouvert (OCS, *open canalicular system*). L'OCS permet l'afflux sélectif des molécules et des ions et intervient dans la fusion granule-membrane plasmique lors de la libération du contenu granulaire. Il contribue aussi au changement de la forme et à la propagation des plaquettes en facilitant leur adhésion et en transportant plusieurs constituants plaquettaire vers leurs cibles. Par exemple, les granules sécrétoires sont transportés dans le domaine intra plaquettaire et le fibrinogène est libéré dans le milieu extérieur. La membrane plasmique présente de multiples récepteurs de glycoprotéines et des molécules d'adhésion impliqués dans l'interaction, la propagation, l'activation et l'agrégation des plaquettes. Lors de l'activation plaquettaire, la membrane plasmique expose également le facteur tissulaire (TF, *tissue factor*) et la phosphatidyl sérine (PS) qui induisent des cascades de coagulation [7–10] (**Figure 1.1**).

Une monocouche de filaments de microtubules se situe sous la membrane plasmique et donne aux plaquettes une forme discoïde au repos. Les cytosquelettes plaquettaires maintiennent et régulent la forme des plaquettes pendant l'activation plaquettaire, permettant ainsi la formation des filopodes et des lamellipodes (des protubérances d'actine du cytosquelette fournissant aux plaquettes une force de propulsion) [11–14]. Le troisième compartiment plaquettaire est le cytoplasme qui regroupe les granules sécrétoires (les granules alpha, les granules denses et les lysosomes), les mitochondries nécessaires pour le métabolisme oxydatif et les glycosomes où se déroule la glycolyse [7,15] (**Figure 1.1**).

La formation des granules sécrétoires et de la majorité du contenu granulaire commence dans les mégacaryocytes. Les granules sont ensuite endocytés par les plaquettes lors de la formation des pro-plaquettes. En revanche, une partie du contenu granulaire est synthétisée par les plaquettes passant par le réticulum endoplasmique et le corps de golgi avant d'être sécrétée [9,16]. Les granules plaquettaires les plus gros et les plus abondants sont les granules alpha. Ils contiennent des protéines de coagulation, des molécules d'adhésion solubles, des molécules d'adhésion membranaires, des molécules inflammatoires, des facteurs de croissance et des inhibiteurs de protéases. Les granules denses, plus petits et moins abondants, renferment des agonistes, des récepteurs et des cofacteurs d'activation plaquettaire. Les granules alpha et les granules denses ont des constituants différents, mais les deux contiennent la P-sélectine (un marqueur d'activation plaquettaire), l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (le récepteur principal de l'activation/agrégation plaquettaire) et GPIb (un récepteur d'adhésion plaquettaire). Concernant les lysosomes, ils contiennent de multiples enzymes digestives et dégradantes telles que les phosphatases et les métalloprotéinases matricielles (MMP, *matrix metalloproteinases*) [17–22].

1.3 Fonctions plaquettaires

1.3.1 Fonction hémostatique

Les plaquettes assurent l'hémostase en préservant l'intégrité vasculaire. Dans les conditions basales, elles circulent dans les vaisseaux sanguins dans un état inactif, patrouillant la muqueuse des CE vasculaires. Leur état inactif est maintenu par les CE par un mécanisme physique (en empêchant les interactions plaquettes-matrice sous-endothéliale) et paracrine (en sécrétant des molécules inhibitrices telles que le monoxyde d'azote ou l'oxyde nitrique (NO, *nitric oxide*) et la

prostaglandine I₂ (PGI₂)). Cependant, suite à une lésion vasculaire, les plaquettes subissent un processus séquentiel d'adhésion, d'étalement, d'activation et de sécrétion afin de s'agréger et de former un bouchon hémostatique qui facilite la récupération vasculaire [22–24].

1.3.1.1 L'adhésion plaquettaire

Les dommages vasculaires sont marqués par l'expression de la P-sélectine sur les CE voisines de la lésion. Immédiatement, les plaquettes adhèrent à la P-sélectine *via* le complexe récepteur GPIb/IX/V et PSGL-1 pour initier le processus de «roulement». En même temps, leur adhérence est renforcée par la liaison aux composants sous-endothéliaux exposés [25–28]. Sous un cisaillement élevé ($> 1000 \text{ s}^{-1}$, comme dans les petites artères, les micro-vaisseaux et les vaisseaux athérosclérotiques/sténotiques), elles adhèrent faiblement au facteur von Willebrand (vWF, *von Willebrand factor*) des CE à travers leur complexe GPIb/IX/V, tandis que sous un cisaillement faible ($< 1000 \text{ s}^{-1}$, comme dans les veines et les grandes artères), elles se lient fortement aux fibres de collagène, *via* leur immunoglobuline GPVI et l'intégrine GPIIb/IIIa ($\alpha 2\beta 1$). L'adhésion est encore renforcée par la liaison du complexe GPIb/IX/V aux multimères de vWF liés au collagène et au fibrinogène. Le vWF et le fibrinogène se lient également à l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ [29,30]. Dans des conditions de faible cisaillement, d'autres composants sous-endothéliaux participent aussi à l'adhésion plaquettaire comme la fibronectine qui se lie au récepteur $\alpha 5\beta 1$ [19,31–33].

1.3.1.2 L'activation plaquettaire

Les interactions plaquettes-endothélium induisent l'activation plaquettaire par la stimulation de 3 voies de signalisation principales: (i) la voie de la protéine tyrosine kinase, (ii) la signalisation du récepteur couplé aux protéines G (GPCR, *G-protein-coupled receptors*), et (iii) la signalisation «*inside-out*» (l'activation de l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$) [34] (**Figure 1.2**).

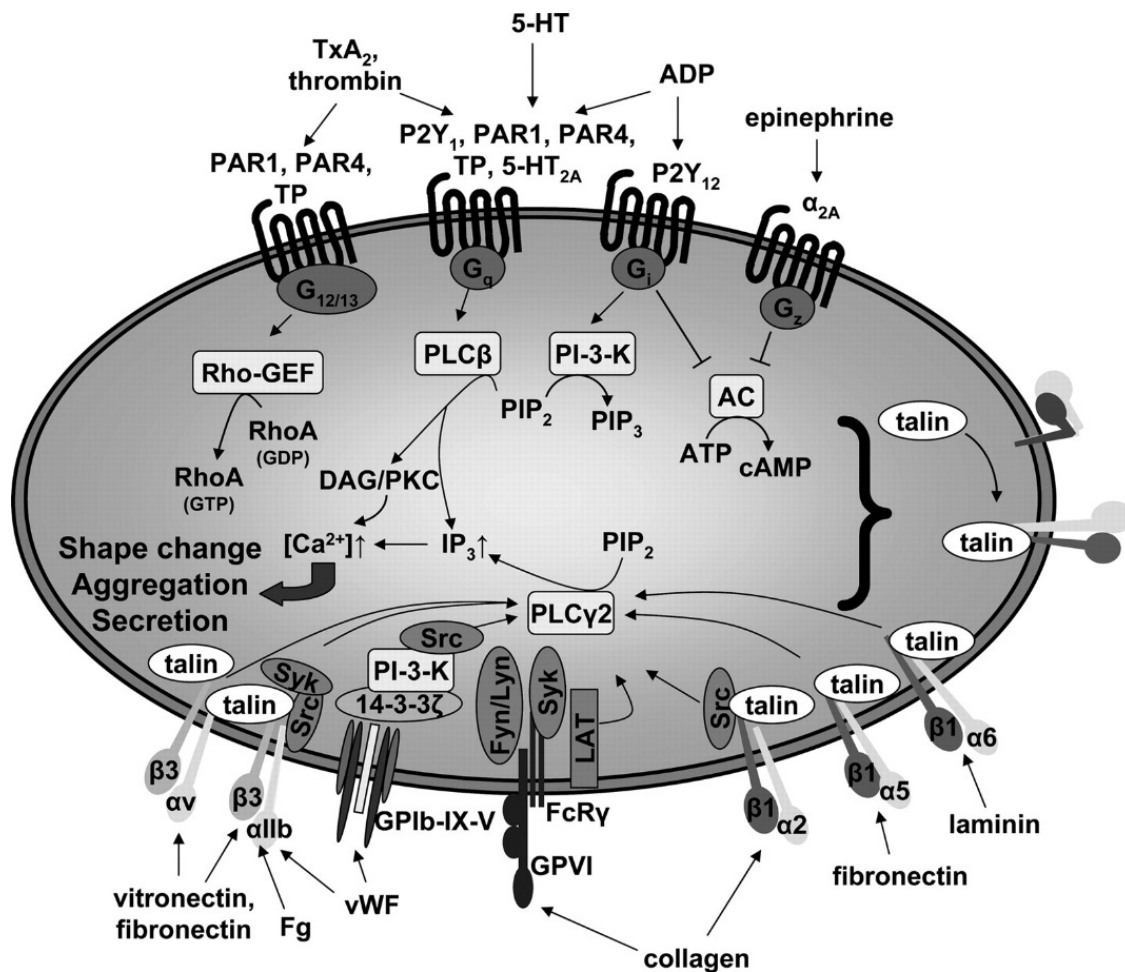


Figure 1.2 : Schéma des principales voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire [34].

L'activation des cascades de signalisation de la protéine tyrosine kinase de la famille Src débute par l'activation de plusieurs récepteurs plaquettaires, y compris le GPVI, le GPIIb, la région Fc d'IgG (FcRγII), l'αIIbβ3, la TYRO3 (*tyrosine-protein kinase receptor 3*) et le récepteur de type c de type lectine 2 (CLEC2). Cela mène à la phosphorylation et l'activation de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 (PLCγ2) [35–38]. La PLCγ2 hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate et génère 1,2-diacylglycérol (DAG) et l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) qui, respectivement, active la protéine kinase C (PKC) et augmente le niveau de calcium (Ca^{2+}) dans le cytosol en induisant sa libération du système tubulaire dense. La PKC à son tour phosphoryle diverses protéines comme VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*), une protéine anti-coiffage impliquée dans la modulation du cytosquelette d'actine (régulation négative). Le DAG membranaire et l'augmentation du Ca^{2+}

cytosolique activent davantage la phospholipase A₂ (PLA₂) et induisent un changement de la forme des plaquettes ainsi que la sécrétion granulaire. L'activation de la PLA₂ est l'étape de limitation dans la synthèse et la libération de Thromboxane A₂ (TxA₂) qui recrute des plaquettes supplémentaires et stabilise la formation du thrombus. En outre, le sécrétome plaquettaire contient des molécules qui stimulent l'activation tels que la P-sélectine, l'ADP et le CD40 ligand (CD40L, *cluster of differentiation 40 ligand*). Des niveaux élevés de Ca²⁺ intracellulaire induisent également l'externalisation du PS qui forme une plate-forme pro-coagulante. Simultanément, des microvésicules plaquettaires exprimant la PS et le TF sont libérées, contribuant au processus de coagulation. Cela aboutit au changement de la forme des plaquettes, leur propagation dans le site de la lésion vasculaire ainsi qu'à l'activation d'une signalisation de l'intérieur vers l'extérieur (*inside-out signaling*) qui active l'intégrine α Ib β 3 [34,39–43] (**Figure 1.2**).

Les GPCR plaquettaires génèrent des signaux stimulateurs ou inhibiteurs. Les GPCR sont des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G. Ces dernières sont composées de trois sous-unités α , β et γ . Dans un état inactif, la sous-unité α , liée au GDP, est associée aux 2 autres sous-unités. Suite à l'activation du récepteur, le GDP est échangé avec le GTP, induisant une dissociation de α -GTP du dimère $\beta\gamma$. Le dimère $\beta\gamma$ et l' α -GTP activent plusieurs molécules effectrices, notamment PLC, l'adénylate cyclase (AC), Rho et les canaux ioniques selon le type de la protéine G couplée au récepteur [44]. Par exemple, le récepteur du thromboxane (TP), qui se lie préférentiellement à TxA₂ (ses actions sont autocrines et paracrines), est couplé à la protéine G_q qui active la PLC β 2. Les récepteurs activés par la protéase (PAR, *protease-activated receptors*), le P2Y₁ et le 5-hydroxytryptamine (5HT_{2A}) se lient respectivement à la thrombine, l'ADP et à la sérotonine, et sont également couplés à la protéine G_q activant aussi la PLC β 2. La PLC β 2, comme la PLC γ 2, génère l'IP₃ et le DAG et augmente le niveau du Ca²⁺ cytosolique. TP et PAR peuvent également être couplés à la protéine G_{12/13} qui active le facteur d'échange Rho-GTP (GEF) et par la suite active la voie de signalisation de Rho/Rho-kinase qui module la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLC, *myosin light chain*). Par conséquent, l'activité de la MLC kinase (MLCK) est favorisée, entraînant une phosphorylation de la MLC, ce qui augmente la contractilité de l'actine-myosine et maintient le changement de la forme des plaquettes et la formation des filopodes. L'augmentation des niveaux intracellulaires de Ca²⁺ suite à l'activation de G_q, active la

MLCK. L'ADP peut se lier aussi au P2Y₁₂, un récepteur couplé à la protéine G_i. G_i inhibe l'AC responsable de transformer l'ATP en AMP cyclique (AMPC) qui régule les niveaux élevés du Ca²⁺ intracellulaire. G_i active d'autre part la phosphoinositide 3-kinase β (PI3Kβ) qui génère le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃), un activateur de la protéine kinase B (PKB) responsable d'augmenter le taux de Ca²⁺ intracellulaire [45–50].

Enfin, l'activation plaquettaire suit une signalisation de l'intérieur vers l'extérieur (*inside-out signaling*) qui engendre l'activation de l'intégrine αIIbβ3 et lui permet de lier avec haute affinité ses ligands, le fibrinogène et le vWF. Cette étape est cruciale pour l'agrégation plaquettaire [51,52] comme c'est démontré chez les patients atteints de la thrombasthénie de Glanzmann. En effet, ces patients ayant les αIIbβ3 absents ou dysfonctionnels, souffrent d'une hémorragie sévère [53]. La signalisation « *inside-out* » menant à l'activation de l'intégrine αIIbβ3 est stimulée par l'augmentation du taux de Ca²⁺ intracellulaire et à l'activation du CalDAG-GEF par la PKC. Le CalDAG-GEF active une protéine liée au GTP nommée Rap1. Celle-ci module l'activation des intégrines en interagissant avec RIAM (*Rap1-interacting adaptor molecule*) [54–56]. Suite à leur activation, Rap1 et RIAM interagissent avec Taline, une protéine du cytosquelette pouvant se lier aux intégrines, à l'actine et aux protéines liées à l'actine. Ce complexe d'activation démasque le site de liaison de l'intégrine à la Taline qui peut maintenant se lier à la sous-unité β3, induisant un changement de conformation dans le domaine extracellulaire du récepteur et exposant son site de liaison au ligand [34,57–62] (**Figure 1.2**).

1.3.1.3 La sécrétion plaquettaire

Les voies de signalisation de PLC et de GPCR activent différents isoformes de PKC qui phosphorylent à leur tour plusieurs molécules impliquées dans l'exocytose. Bien que le mécanisme de la sécrétion plaquettaire ne soit pas entièrement déchiffré et compris, on pense qu'il ressemble à celui des neurones [63–65]. En effet, la machinerie sécrétoire active est composée du facteur soluble NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*) dans le noyau et de ces récepteurs SNAREs (*soluble NSF-associated protein receptor complexes*) localisés à la surface des vésicules (vSNAREs, *vesicular SNAREs*) et des membranes cibles (tSNAREs, *target membrane SNAREs*). L'interaction entre vSNAREs et tSNAREs forme un complexe stable mettant en proximité les deux membranes facilitant ainsi leur fusion. Les plaquettes expriment les protéines SNAREs, y

compris (i) les vSNAREs qui correspondent aux protéines membranaires associées aux vésicules (VAMP, *vesicle-associated membrane proteins*) -2, -3 et -8 (ii) et les tSNAREs qui comprennent SNAP (*soluble NSF-associated proteins*) -23, -25 et -29 et les syntaxines 2, 4, 7 et 11 [66–69].

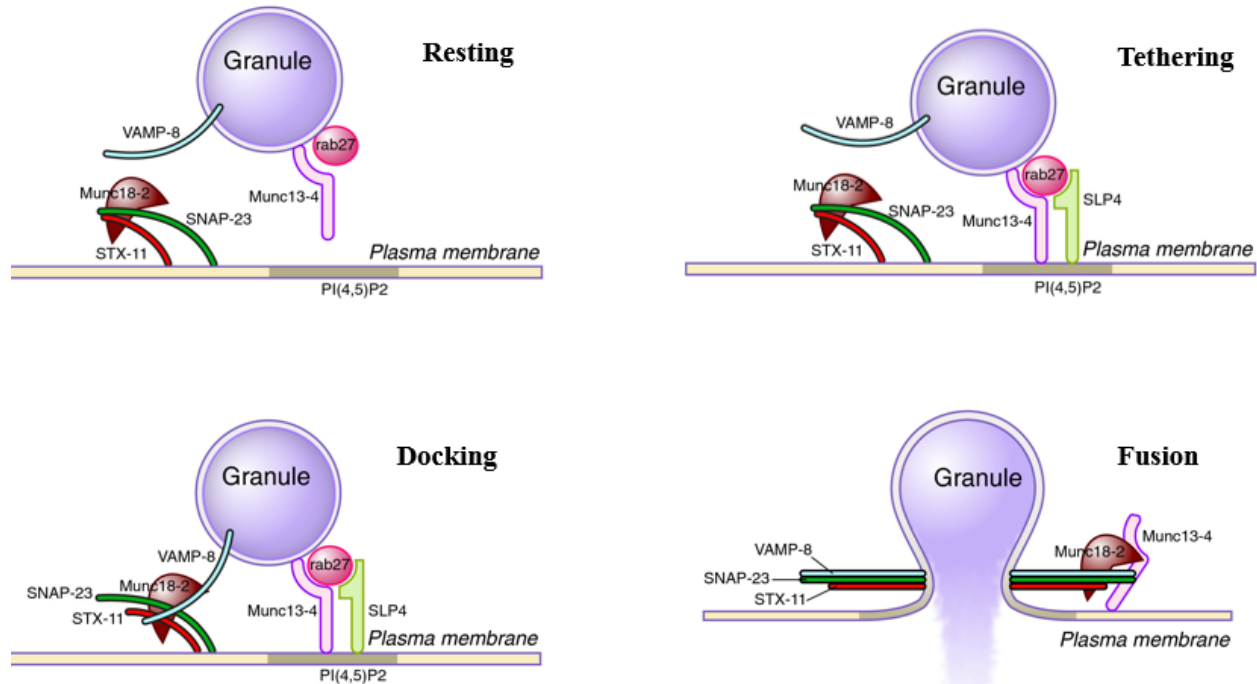


Figure 1.3 : Schéma illustrant les étapes de la sécrétion des granules plaquettaire [70].

De même, les plaquettes expriment les protéines de régulation de SNAREs comme Sec1 et Rab. Dans les conditions basales, la protéine Sec1 plaquettaire (PSP) empêche l'assemblage du complexe SNARE en se liant aux tSNAREs inhibant ainsi la fusion membrane-vésicule. Après l'activation plaquettaire et l'activation de PKC, la PSP est phosphorylée et le NSF est activé. En même temps, le Rab GTPase (Rab27a) s'associe au Munc13-4 et au SLP4 (*Synaptotagmin-like protein 4*), attachant les granules à l'OCS ou à la membrane plasmique. Ce processus d'interaction et d'assemblage permet l'association vSNARE-tSNARE et facilite l'attachement vésiculaire à l'OCS ou à la PM, formant un complexe SNARE qui précède la fusion membranaire. Enfin, NSF module la conformation de SNARE d'une façon qui ressemble à la

fermeture à glissière, provoquant la fusion des granules avec l'OCS ou la PM et libérant le contenu granulaire [57,70–73] (**Figures 1.3-1.4**).

Outre l'exocytose du contenu granulaire dérivé des mégacaryocytes, la *novo*-synthèse des molécules sécrétées telles que le TxA₂ est également une caractéristique des plaquettes [74].

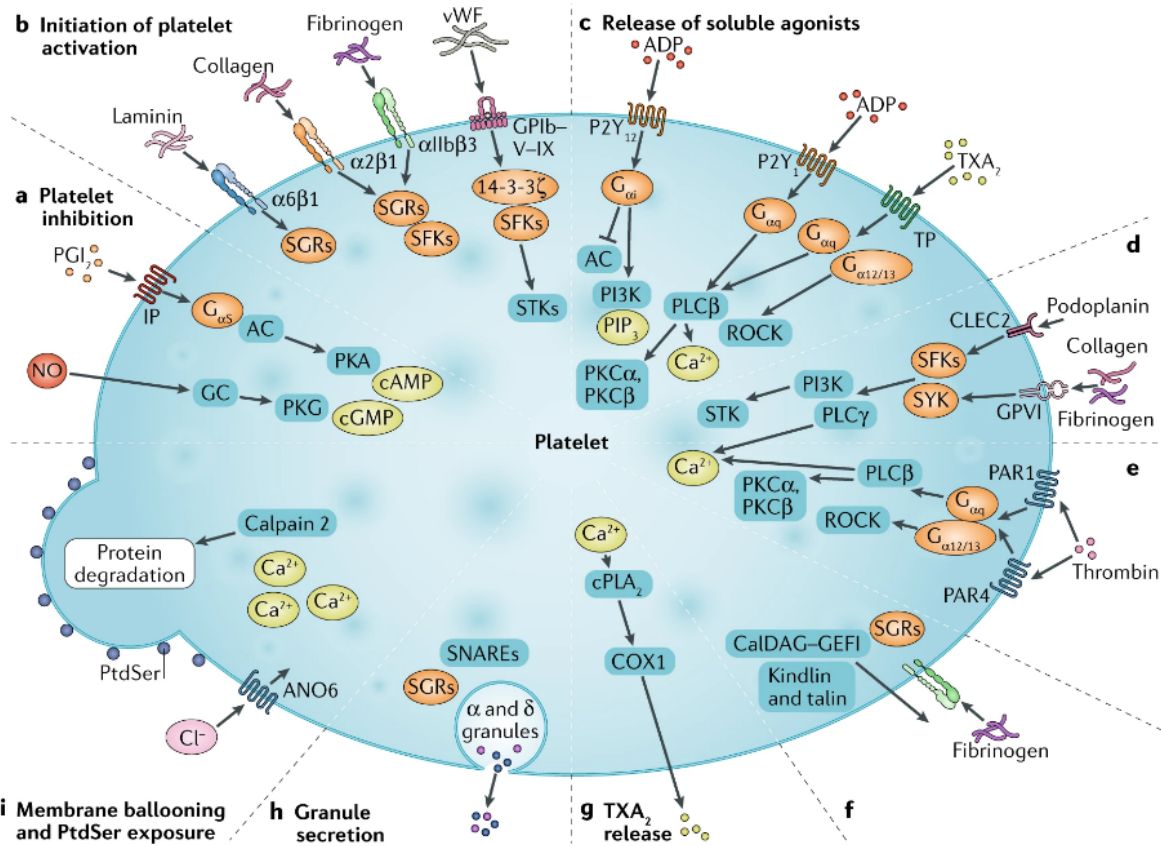


Figure 1.4 : Un schéma des principales voies de signalisation spécifiques aux récepteurs se produisant séquentiellement pendant l'activation des plaquettes [57].

1.3.1.4 L'agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est un processus complexe et dynamique qui résulte de l'adhésion, de l'activation et de la sécrétion plaquettaires, conduisant à la formation d'un thrombus stable riche en fibrine au niveau de la lésion vasculaire [44,75,76] (**Figure 1.5**).

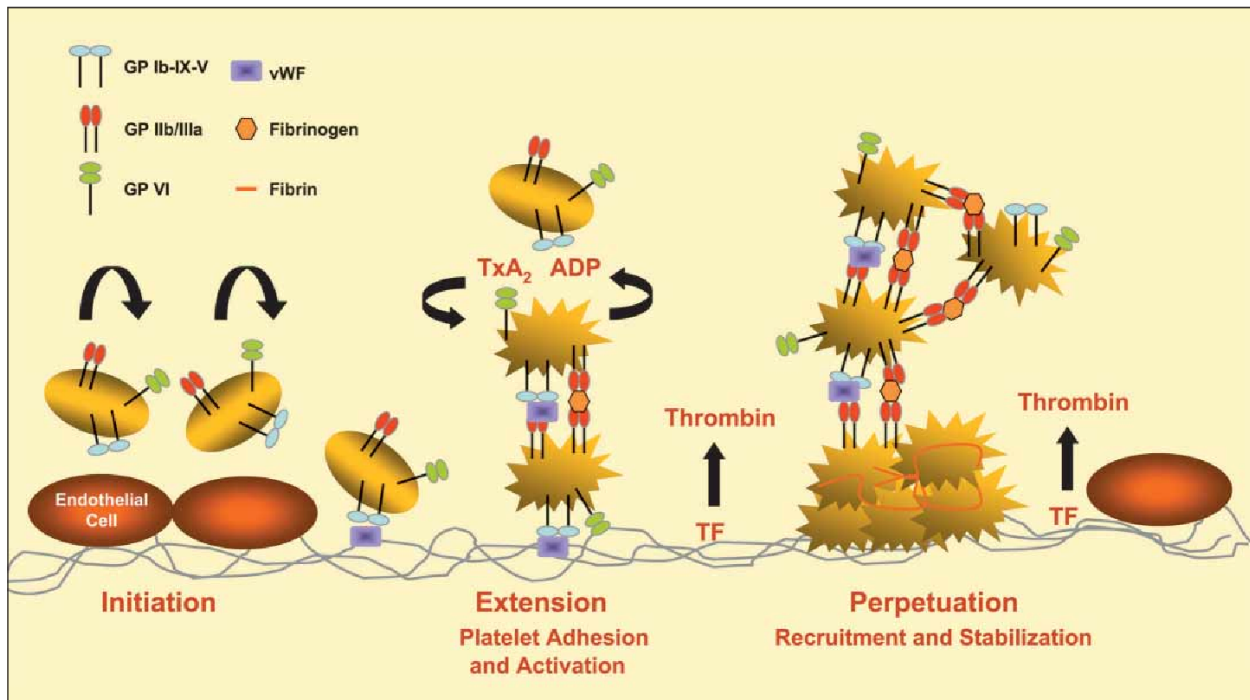


Figure 1.5 : Schéma montrant les étapes menant à la formation du bouchon fibrine-plaquettes qui maintient l'hémostase primaire [75].

Dans les conditions de faible cisaillement, l'agrégation plaquettaire est assurée par la liaison de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ activée au fibrinogène soluble. Dans des conditions de cisaillement moyen ($1000-10000\text{ s}^{-1}$), l'agrégation passe par une phase réversible maintenue par la GPIb α et l' $\alpha IIb\beta 3$ suivie par la formation d'un agrégat stable maintenu par la sécrétion d'agonistes plaquettaire et l'activation irréversible de l' $\alpha IIb\beta 3$ (*inside-out signaling*). À son tour, la liaison de l' $\alpha IIb\beta 3$ activée par le fibrinogène et d'autres ligands (*outside-in signaling*) active la tyrosine kinase Syk et la kinase d'adhésion focale (pp125^{FAK}) et induit la phosphorylation de la queue cytoplasmique de la sous-unité $\beta 3$ [77,78]. Ces événements de signalisation sont impliqués dans la régulation du cytosquelette, la formation des lamellipodes, la propagation des plaquettes et la rétraction du caillot [79–81]. De plus, l'augmentation du recrutement et de l'agrégation plaquettaire induit la libération du TF par les CE, les leucocytes et les plaquettes activés. Le TF agit comme un précurseur de la prothrombine qui est clivée en thrombine. La thrombine agit à la fois comme un agoniste plaquettaire améliorant l'activation plaquettaire et comme une protéase qui convertit le fibrinogène en fibrine. Les filaments de fibrine stabilisent l'agrégation plaquettaire

et contribuent à la phase finale de la formation du bouchon fibrine-plaquette, qui maintient l'intégrité des vaisseaux sanguins et assure l'hémostase. À noter que, dans des conditions de cisaillement élevé ($> 10000 \text{ s}^{-1}$), l'agrégation plaquettaire entraîne exclusivement la liaison entre GPIb et vWF sans avoir besoin d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ni même d'activation plaquettaire [82,83].

1.3.1.5 La rétraction du caillot fibrino-plaquettaire

Suite à la formation d'un caillot de fibrine qui emprisonne les plaquettes et les globules rouges et bouche le site de la lésion vasculaire, la signalisation «*outside-in*» de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ entraîne le processus de rétraction du caillot. Plus précisément, l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ intervient dans l'interaction entre le cytosquelette d'actine/myosine plaquettaire et les fibres externes de fibrine. Il en résulte la transition de la force contractile du cytosquelette plaquettaire vers la maille de fibrine. Autres voies sont également impliquées dans ce processus telles que la PLC γ2 , les kinases Src et les tyrosines kinases. La rétraction de la maille de fibrine contracte le caillot sanguin, extrude l'excès du liquide au site de la blessure et marque les limites des tissus endommagés pour faciliter la récupération [84–86].

1.3.2 Les fonctions plaquettaires dans l'athérombose

En plus de leur rôle hémostatique, les plaquettes ont des fonctions non hémostatiques liées à l'immunité, au cancer et à l'athérombose. En effet, les plaquettes sont activées dans les maladies immunitaires [87–92], et leurs récepteurs de type toll (TLR, *toll-like receptors*) renforcent les fonctions antibactériennes des neutrophiles [93–97]. Les plaquettes sont également hyperactives dans le cancer [98] et il a été démontré qu'elles favorisent les métastases tumorales [99] en induisant l'angiogenèse [99–101].

Plus pertinente encore est l'implication des plaquettes dans des conditions inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose et la thrombose [102–104]. En effet, les processus d'adhésion, d'activation et d'agrégation par lesquels les plaquettes maintiennent l'hémostase primaire ont aussi lieu dans le cas d'athérombose mais d'une façon exagérée et non régulée. Ainsi, l'hypercholestérolémie rend l'endothélium plus enflammé en raison de l'accumulation des particules de lipoprotéines oxydées et du stress oxydatif dans l'intima du vaisseau. Cela induit à l'expression des ligands adhésifs (vWF, l' $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, P-/E-sélectine) sur la couche endothéliale, permettant une diaphonie plaquettaire-endothéliale. Par conséquent, l'adhésion des plaquettes au

site d'athérome *via* le GPIIb/IX/V et l' α IIB β 3 conduit à l'activation des plaquettes et à la sécrétion d'une multitude de molécules pro-inflammatoires y compris des facteurs adhésives (e.g. le fibrinogène, la fibronectine, le vWF et la P-sélectine), des facteurs de coagulation (e.g. le facteur V, le facteur XI, le plasminogène et la protéine S), des chimiokines /cytokines (e.g. l'interleukine-1 β , le CD40L, le thromboglobuline - β) et des facteurs de croissance (e.g. le facteur de croissance plaquettaire « *platelet-derived growth factor* », le facteur de croissance épidermique et le facteur de croissance des fibroblastes) [105]. Contrairement à l'hémostase primaire dans laquelle les CE présentent un phénotype anti adhésif maintenu par le PGI₂ et le NO, l'athérothrombose est caractérisée par des mécanismes antiadhésifs perturbés et une expression endothéliale amplifiée des molécules adhésives, ce qui conduit à une activation et une sécrétion plaquettaires exagérées [22]. En général, le sécrétome plaquettaire et les facteurs exprimés par la membrane plasmique agissent comme des chimio-attractants pour d'autres cellules immunitaires, induisent l'angiogenèse, favorisent la coagulation et diminuent la stabilité de la plaque [105,106]. Par exemple, lors de l'activation des plaquettes, la P-sélectine (CD62P) se libère des granules α et se place à la surface des plaquettes, favorisant le recrutement des leucocytes vers la paroi vasculaire athérogène [107]. De plus, la sécrétion du CD40L amplifie l'instabilité de la plaque en se liant aux cellules musculaires lisses (SMC, *smooth muscle cells*), aux CE et aux monocytes, activant ensuite les voies apoptotiques dans le noyau de la plaque nécrotique et induisant l'expression des MMP. Les MMP peuvent dégrader le collagène dans la matrice extracellulaire ainsi que le bouchon des plaquettes fibreuses, rendant la plaque plus sensible à la rupture [106,108]. De plus, lors de la rupture de la plaque, les composants de la matrice extracellulaire ainsi que le noyau de la plaque nécrotique sont exposés ce qui aggrave l'activation plaquettaire, conduisant à la formation d'un thrombus blanc (dérivé des plaquettes) qui obstrue partiellement le vaisseau [109,110]. Pendant ce temps, l'assemblage des facteurs de coagulation sur la membrane plasmique plaquettaire favorise la formation de thrombine et la conversion ultérieure du fibrinogène en fibrine, qui soutiennent tous deux la croissance du thrombus [111]. La thrombogenèse implique également des fluctuations de la rapidité du flux sanguin à l'apex du thrombus sténotique, ce qui affecte l'adhésion des plaquettes et favorise leur dépôt sur les surfaces thrombogènes [112]. La circulation sanguine altérée autour du thrombus sténotique crée également des sites stagnants qui sont cibles de la coagulation sanguine et de la propagation d'un thrombus rouge formé de fibrine et de globules rouges et connu sous le nom de «queue de fibrine» [113]. Les

thrombus blancs et rouges obstruent le vaisseau sanguin, particulièrement si ses plaquettes sont hyperactives. C'est le cas des patients diabétiques ou hypertendus qui sont généralement résistants aux traitements antiplaquettaires réguliers (l'aspirine ou l'acide acétylsalicylique (ASA), les antagonistes du récepteur de l'ADP et les inhibiteurs de la thrombine) [114,115].

1.4 Les agonistes et les amorceurs plaquettaires

1.4.1 Les agonistes plaquettaires

Les agonistes plaquettaires induisent l'activation, la libération et l'agrégation des plaquettes. Cependant, des études récentes ont montré que l'activité des agonistes est spatialement limitée, ce qui signifie qu'elle dépend de la localisation des plaquettes dans le bouchon hémostatique [116].

1.4.1.1 Le collagène

Les humains possèdent environ 28 types de collagène caractérisés par une structure hélicoïdale triple avec de multiples résidus de proline. Les collagènes de type I, II et III sont les plus abondants et jouent un rôle structural fibrillaire dans divers organes, notamment la peau, les os et le cartilage. Les collagènes de type IV et VI sont non fibrillaires, forment un réseau de support des tissus interstitiels et constituent les membranes basales des couches des cellules épithéliales et endothéliales [117,118]. Le collagène exposé (les types I à VIII) agit comme un substrat et comme un agoniste pour, respectivement, l'adhésion plaquettaire *via* l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et l'activation plaquettaire *via* le récepteur GPVI [119–121]. Lors de l'activation des plaquettes, des concentrations élevées de collagène induisent l'activation de PLC γ 2 et la signalisation ultérieure de Ca²⁺ et de PKC, ce qui entraîne un changement de forme des plaquettes, une sécrétion granulaire et conduit à l'agrégation plaquettaire. À des concentrations plus faibles, l'activité du collagène se limite principalement à la production de TxA₂ [122,123]. Des doses modérées de collagène (\approx 10 ug/ml du plasma riche en plaquettes (PRP, *platelet-rich plasma*)) induisent la libération de Ca²⁺ des réserves du système tubulaire dense ainsi qu'un afflux de Ca²⁺ du milieu extracellulaire *via* l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ qui fonctionne en mode inverse lors de l'activation des plaquettes et de l'augmentation d'afflux de Na⁺ [124]. Comme c'est déjà mentionné, le collagène peut interagir avec le vWF lié au complexe GPIb/V/IX [118,125]. L'activation plaquettaire, la signalisation de

GPVI et des autres voies induisent un changement de conformation d' $\alpha 2\beta 1$ conduisant à sa transformation en un récepteur de haute affinité qui améliore la liaison des plaquettes à d'autres motifs de collagène [126].

1.4.1.2 La thrombine

Après la formation d'un bouchon plaquettaire, les cascades de coagulation induites par le TF mènent à la formation de la thrombine. La thrombine comprend deux exosites liant des anions (l'exosite I et l'exosite II) et une poche catalytique. L'exosite I se lie aux plusieurs substrats comme le fibrinogène et le PAR-1, tandis que l'exosite II se lie à l'héparine et au GPIIb α . La thrombine (i) clive le fibrinogène en fibrine qui forme un maillage polymérique entre les plaquettes, (ii) transforme le facteur de coagulation XIII en XIIIa ce qui stabilise le bouchon et (iii) active les plaquettes, en ciblant particulièrement les plaquettes du noyau du bouchon [116,127].

Etant un activateur plaquettaire, la thrombine se lie et active les PAR plaquettaires en clivant une seule liaison peptidique dans le domaine N-terminale, ce qui donne naissance à une nouvelle extrémité N-terminale pouvant interagir par voie intramoléculaire avec le corps du récepteur et induire par la suite une signalisation transmembranaire. Les plaquettes humaines expriment le PAR-1 et le PAR-4 qui sont activés, respectivement, par des concentrations de thrombine faibles et élevées. L'activation *via* PAR-1 est forte mais diminue rapidement, tandis que l'activation *via* PAR-4 est progressive et soutenue parce qu'elle dépend de la libération d'ADP. La signalisation de la thrombine débute en activant les protéines G_q/G₁₂/G_i et ensuite la PLC $\gamma 2$, la PI3K, le Rho et le Rap1. Après leur activation, même avec de faibles doses de thrombine, les récepteurs PAR sont rapidement phosphorylés et internalisés pour être dégradés par les lysosomes ou recyclés vers la membrane plasmique [128,129]. La thrombine se lie également au GPIIb α avec une forte affinité, améliorant le clivage et l'activation de PAR-1, les réactions de coagulation et le clivage du GPV à la surface des plaquettes. Le GPIIb α est exprimé de façon constitutive sur les plaquettes en association avec les sous-unités GPIIb β , GPIX et GPV, et sa signalisation intracellulaire implique la libération interne de Ca²⁺, la libération d'ATP/ADP, la signalisation de MAP Kinase (MAPK) et l'activation de Rho [127]. Les patients atteints du syndrome de Bernard-Soulier, ont les gènes GPIIb/IX/V mutés, et souffrent d'une agrégation réduite en réponse à la thrombine ainsi

qu'une augmentation de l'incidence des saignements [130]. Bien que le rôle du clivage du GPV dans l'activation des plaquettes soit controversé, il a été démontré qu'il est élevé dans les maladies cardiovasculaires [131].

1.4.1.3 L'ADP

L'ADP est l'un des premiers agonistes plaquettaires identifiés. Il se lie à trois récepteurs purinergiques: le P2Y1 couplé à G_q , le P2Y12 couplé à G_i et le canal calcique P2X1 [132]. La signalisation de l'ADP dans les plaquettes aboutit à de multiples réponses, notamment l'adhésion, le changement de forme, la sécrétion, l'influx et la mobilisation interne de Ca^{2+} , la production de TxA_2 , l'inhibition de l'AC et l'agrégation [133,134]. L'activation de P2Y1 et le P2Y12 mène à des fonctions similaires, mais ce dernier est impliqué dans la potentialisation de l'agrégation plaquettaire en présence d'autres agonistes plaquettaires [132]. Par conséquent, au niveau du noyau du bouchon hémostatique, la signalisation de P2Y12 n'active que partiellement les plaquettes localisées dans la coque sus-jacente [116]. Seul, le récepteur P2X1 n'induit pas l'agrégation plaquettaire mais provoque un influx de Ca^{2+} de courte durée, ce qui est suffisant pour stimuler la signalisation d'ERK, activer la MLCK et induire un changement de forme (l'activation précoce des plaquettes) [132].

1.4.1.4 Le TxA_2

Le TxA_2 appartient à la famille des lipides eicosanoïdes générés séquentiellement à partir de l'acide arachidonique (AA) par le PLA_2 , la cyclooxygénase 1/2 (COX-1 /2) et la TxA_2 synthase. L'AA est un acide gras polyinsaturé présent dans la membrane plasmique des cellules. Pendant l'inflammation, le PLA_2 clive l'AA qui est convertie en prostaglandine PGH_2 via l'enzyme COX. Il existe deux isoformes de COX, COX-1 et COX-2. Le premier est exprimé de façon constitutive dans les plaquettes, tandis que le second est inductible suite à l'inflammation. La PGH_2 est ensuite transformée en TxA_2 via la TxA_2 synthase [135]. Dans les plaquettes, le TxA_2 joue un rôle pro-thrombotique en agissant de manière autocrine et paracrine pour amplifier l'activation plaquettaire ainsi que l'action d'autres agonistes plaquettaires [136,137]. Ce rôle est régulé par les prostaglandines et conduit à l'accumulation des plaquettes dans la coquille du noyau du bouchon hémostatique [116]. Comme c'est mentionné précédemment, le TxA_2 agit sur le TP, un récepteur GPCR de deux isoformes (α et β) et exprimé dans différents tissus [138]. Les

plaquettes expriment TP- α couplé à G_q, dont sa ligature au TxA₂ joue un rôle dans la mobilisation interne du Ca²⁺, le changement de forme des plaquettes, la sécrétion, l'activation et l'agrégation plaquettaires [139].

1.4.2 Les amorceurs/potentialisateurs plaquettaires

Les amorceurs et les potentialisateurs (dérivés des plaquettes et non dérivés des plaquettes, respectivement) ne peuvent pas induire une agrégation plaquettaire à moins qu'ils ne soient combinés à des agonistes plaquettaires [140]. Récemment, il a été démontré que les amorceurs/potentialisateurs plaquettaires sont extrêmement régulés dans les maladies cardiovasculaires et peuvent être responsables de la résistance au traitement antiplaquettaire comme l'ASA [141].

1.4.2.1 Gas6

La protéine 6 spécifique à l'arrêt de croissance (gas 6, *growth arrest-specific 6 protein*) a été identifiée dans des fibroblastes embryonnaires des souris. Dans les plaquettes, gas 6 agit *via* le récepteur Tyro3-AXL-MER (*TAM receptor*), en augmentant la sécrétion plaquettaire, l'agrégation et la formation de thrombus, en présence de doses sous-optimales d'agonistes plaquettaires [142–146]. Malgré l'inhibition de la synthèse de TxA₂ par l'ASA, l'activité plaquettaire peut persister chez certains patients. Ce paradoxe est appelé la «pseudo-résistance à l'aspirine» et il est observé comme étant 9 à 10 fois plus significatif chez les sujets sains qui présentent des niveaux élevés de gas6 [147,148].

1.4.2.2 MMP-2

Les MMP appartiennent à une classe des protéases. Dans les maladies cardiovasculaires, elles sont impliquées dans le remodelage des tissus post-infarctus du myocarde ainsi que dans la progression des maladies athérotrombotiques. Lors de l'activation plaquettaire, MMP-2 est sécrétée par le compartiment cytosolique, agissant comme un amplificateur de l'agrégation plaquettaire en présence d'autres agonistes [149,150]. Son action d'amorçage est induite par l'activation de PI3K et persiste même avec des agents antiplaquettaires qui n'influencent pas sa sécrétion [151].

1.4.2.3 Leptine

La leptine est sécrétée par les tissus adipeux et les entérocytes. Elle fonctionne comme un régulateur de l'équilibre énergétique par l'inhibition de la faim et du stockage des graisses [152]. En présence d'agonistes plaquettaires, la leptine agit *via* son récepteur et potentialise l'activation et l'agrégation plaquettaires en activant les voies de signalisation suivantes: la PLC γ , la PKC, la PI3K et la MAPK [153,154].

1.4.2.4 PGE2

Comme mentionné ci-dessus, l'activation plaquettaire implique la libération de l'AA qui est métabolisé par les enzymes COX en prostaglandines PGH₂ et PGG₂. La PGH₂ est transformée non seulement en TxA₂ mais aussi en PGD₂, PGF_{2a} et PGE₂ [155]. Dans les plaquettes, la PGE₂ agit à travers l'isoforme EP₃ d'EP GPCR, en augmentant l'agrégation plaquettaire par l'activation de la PKC et l'inhibition de l'AC [156,157]. De plus, des niveaux élevés de PGE₂ sécrétée par les plaquettes chez certains patients compromettent l'efficacité des médicaments antiplaquettaires [158].

1.4.2.5 LDL

Les produits athérogènes générés par l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL, *low-density lipoprotein*) dans les conditions de stress oxydatif peuvent interagir avec le GPIV plaquettaire (CD36) en augmentant la réactivité plaquettaire en présence de doses sous-optimales d'agonistes [103,159]. Dans l'hyperlipidémie, le CD36 a un rôle thrombogène suite à son interaction avec les glycérophospholipides de choline oxydés pro-thrombotiques (oxPCcd36) [160].

1.4.2.6 Épinéphrine

L'épinéphrine est une hormone sécrétée par la glande surrénale. Elle possède des activités sympathomimétiques en agissant sur les récepteurs adrénergiques alpha et bêta [161]. Étant donné que les plaquettes expriment des récepteurs alpha 2-adrénergiques, elles sont ciblées par l'épinéphrine. Bien que l'hormone ne soit pas en elle-même capable d'induire un changement de forme, une sécrétion ou une agrégation des plaquettes, elle potentialise les réponses biochimiques et le processus d'agrégation déclenchés par les faibles doses d'agonistes plaquettaires

[162,163]. Tels effets de potentialisation sont associés à l'activation du facteur nucléaire- κ B (NF- κ B), qui modère l'activation et l'agrégation plaquettaires précoces sans agir sur le génome. (**Chapitre 3**) [164].

1.4.2.7 CD40L

Le CD40L est exprimé sur plusieurs cellules, y compris les lymphocytes T activés et les plaquettes activées. Il existe également sous forme soluble (s) appelée sCD40L [165]. Des niveaux élevés de CD40L exprimés par les plaquettes sont associés à l'athérosclérose, tandis que des taux plasmatiques élevés de sCD40L sont considérés comme un pronostic du développement de l'athérombose [166–168]. Le « *knock out* » du CD40L chez la souris retarde l'occlusion thrombotique après une lésion vasculaire et réduit la stabilité du thrombus. En revanche, l'administration de sCD40L inverse ces effets par des interactions avec l' α IIb β 3 activées [169]. Notre équipe a publié plusieurs articles concernant le rôle du sCD40L dans les fonctions plaquettaires, mettant l'accent sur son rôle d'amorceur plaquettaire et sa capacité d'échapper aux effets antiplaquettaires de l'ASA [170–173]. Nous détaillerons dans le **Chapitre 2** les différents rôles du CD40L.

Chapitre 2: Le CD40L

2.1 Introduction

CD40L, nommé aussi CD154, gp39, MTJA et TRAP, est une protéine transmembranaire de type II appartenant à la superfamille de TNF (*tumor necrosis factor*). Cette protéine a été originalement identifiée comme un ligand du récepteur CD40 avec un poids moléculaire variant entre 32 et 39 kDa en raison des modifications post-traductionnelles. Etant donné que l'axe CD40L-CD40 fut d'abord découvert dans les cellules immunitaires, ses premiers signaux identifiés étaient de nature immunologique [174,175]. De nombreuses études supplémentaires ont révélé l'expression de l'axe CD40L-CD40 dans des cellules non immunitaires et la présence d'autres récepteurs du CD40L comme l' α IIB β 3, l' α 5 β et le Mac-1. Ces études ont mené à la découverte du rôle thrombo-inflammatoire de CD40L en assurant l'interaction entre les plaquettes et le système immunitaire [176,177]. Ce chapitre décrit d'abord l'expression, la configuration et les récepteurs du CD40L et met l'accent enfin sur les implications de la signalisation du CD40L dans les plaquettes, en particulier suite à sa liaison au récepteur CD40.

2.2 L'expression du CD40L

CD40L est exprimé par plusieurs cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques telles que les lymphocytes B, les lymphocytes T activés, les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques (DCs, *dendritic cells*), les plaquettes activées, les CE et les SMC. Contrairement aux neutrophiles, les cellules exprimant constitutivement le CD40L telles que les lymphocytes B, les macrophages et les DCs, augmentent l'expression de ce ligand en réponse aux cytokines [178–181].

CD40L est composé d'un domaine C-terminal extracellulaire (215 acides aminés), d'un domaine transmembranaire (24 acides aminés) et d'une queue N-terminale cytoplasmique (22 acides aminés). Il ne se trouve pas uniquement sous forme membranaire mais existe aussi sous une forme soluble appelée CD40L soluble (sCD40L). Différentes formes de sCD40L ont été identifiées, ayant des poids moléculaires de 14, 18 et 31 kDa. Le sCD40L de 18 kDa est le plus répandu et généré par le clivage enzymatique du CD40L exprimé d'une façon non génomique à la surface des plaquettes après leur activation. Par conséquent, les plaquettes sont considérées comme la source principale de sCD40L, dont sa numération plasmatique chez un adulte sain est estimée entre 0,79 et 4,7 ng/ml par les techniques d'immunodosage [182,183]. Le clivage du

CD40L en sCD40L se fait précisément au niveau du résidu méthionine 113 du domaine extracellulaire, par les MMP2/9 dans les plaquettes ou par la désintégrine et la métalloprotéinase 10/17 (ADAM 10/17) dans les lymphocytes T. Les CD40L solubles et membranaires forment des homotrimères [106] pouvant se lier d'une façon plus forte au récepteur CD40, que leurs homologues monomères ou dimères. La liaison du CD40L à son récepteur CD40 induit la trimérisation du récepteur et génère de multiples signaux biologiques [175].

2.3 Les récepteurs du CD40L

Quatre récepteurs du CD40L ont été identifiés jusqu'à présent: le récepteur CD40 classique et les trois intégrines: l' α IIb β 3, l' α 5 β 1 et l' α M β 2 ou Mac-1 [184] (**Figure 2.1**). Cependant, seuls CD40, α IIb β 3 et α 5 β 1 sont exprimés sur les plaquettes.

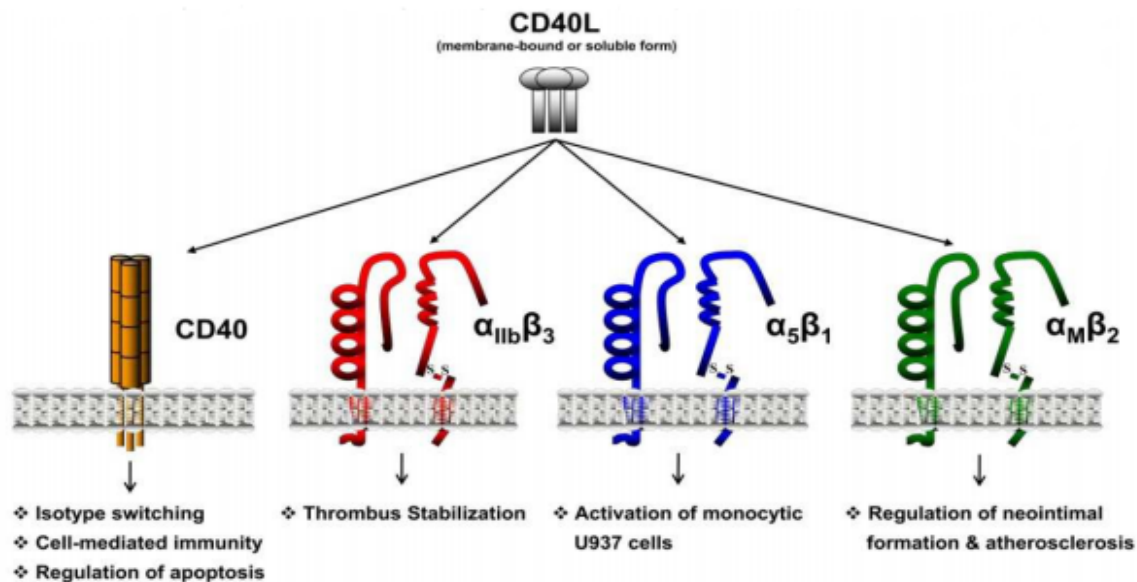


Figure 2.1 : Les récepteurs du CD40L. La liaison de CD40L au CD40, à l' α IIb β 3, à l' α 5 β 1 ou l' α M β 2(Mac-1) induit une pléthore d'événements physiologiques et pathologiques [184].

2.3.1 Le Mac-1

Mac-1 est une intégrine β 2 nommée aussi CR3, CD11b/CD18 ou α M β 2. Il est formé de 2 sous-unités (β 2 et α M) et principalement exprimé sur les neutrophiles, les monocytes, les

macrophages, les NK (*natural killer cells*) et certains sous-types de lymphocytes B. Le Mac-1 interagit également avec plusieurs autres ligands, notamment le fibrinogène, la fibronectine, l'héparine et l'ICAM-1, et participe à la cicatrisation des plaies, à la défense de l'hôte, aux interactions leucocytes-CE et aux réactions pro-inflammatoires [185–187].

Le CD40L se lie sélectivement à la sous-unité αM de Mac-1. Contrairement aux autres ligands de Mac-1, sa liaison au CD40L n'induit pas nécessairement une activation cellulaire. En effet, le rôle de l'axe CD40L/Mac-1, identique à celui trouvé dans les interactions leucocytes-CE, est plutôt adhésif contribuant à la migration cellulaire [188–190].

2.3.2 L' $\alpha 5\beta 1$

L' $\alpha 5\beta 1$ est un hétérodimère exprimé sur plusieurs cellules, notamment sur les monocytes, les macrophages, les CE et les plaquettes. La fibronectine, la vitronectine, l'angiopoïétine 2 et le CD40L sont parmi les ligands qui peuvent se lier à ce récepteur [165]. Il a été démontré que la liaison du CD40L à l' $\alpha 5\beta 1$ active la voie MAPK dans les leucocytes, stimulant la production des cytokines ainsi que la prolifération et la survie des cellules [176,191]. Dans les plaquettes, il a été rapporté que l'interaction CD40L- $\alpha 5\beta 1$ est impliquée dans l'activation plaquettaire. Cependant, cette étude n'a pas fourni des preuves supplémentaires si le récepteur CD40 est partiellement impliqué dans l'augmentation du taux d'expression des marqueurs d'activation des plaquettes [192].

2.3.3 L' $\alpha IIb\beta 3$

L' $\alpha IIb\beta 3$ (ou le GPIIb/IIIa) est une intégrine exclusivement exprimée sur les plaquettes. Les granules plaquettaires contiennent également des hétérodimères d' $\alpha IIb\beta 3$ qui s'expriment sur la membrane plasmique lors de l'activation plaquettaire. L'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ est impliquée dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaires en liant respectivement le vWF et le fibrinogène soluble. Lors de l'activation des plaquettes, les sous-unités α et β subissent des changements de conformation qui permettent une liaison de haute affinité du ligand. Ce récepteur est la cible de plusieurs médicaments antiplaquettaires comme l'abciximab et le tirofiban [165,193].

Le CD40L est aussi un ligand de l' $\alpha IIb\beta 3$. En effet, la liaison du CD40L à l' $\alpha IIb\beta 3$ induit la phosphorylation des résidus de tyrosines intracellulaires du récepteur, permettant la signalisation

«*outside-in*», l'activation de PI3K, la génération des microparticules, ainsi que la formation et la stabilisation du thrombus [169,194,195].

2.3.4 Le CD40

Le CD40 est une protéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille des récepteurs du TNF (TNFR, *TNF receptor*). Il est exprimé d'une façon constitutive et inductible sur les lymphocytes B, les macrophages, les neutrophiles, les CE, les SMC et les plaquettes. En revanche, les lymphocytes T et les DCs expriment le CD40 lors de l'activation cellulaire. Parmi les différents récepteurs du CD40L, CD40 constitue le principal récepteur ayant l'affinité la plus élevée pour ce ligand. Suite à son activation par son ligand, les monomères du CD40 sont regroupés en trimères [196,197]. Il existe cinq isoformes distinctes de CD40 présentes également sous formes membranaires ou clivées [198].

La liaison du CD40L au CD40 implique l'activation des TRAFs (*TNFR-associated factors*), des protéines adaptatrices qui s'associent aux TNFR, TLR, et aux récepteurs de l'IL-1. Les TRAF 1-6 sont recrutés dans le domaine cytoplasmique du CD40 où ils activent plusieurs voies de signalisation nommons par exemple les voies de NF- κ B, MAPK, PI3K et PLC γ . En outre, la signalisation intracellulaire induite par l'activation de CD40 *via* CD40L peut être indépendante de TRAF. En effet, l'interaction CD40/CD40L recrute la janus kinase 3 (JAK3) vers la queue cytoplasmique du récepteur ce qui active ensuite STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*).

Parmi ses fonctions immunitaires physiologiques, l'axe CD40L-CD40 est impliqué dans l'activation/prolifération des lymphocytes B, l'amélioration de l'expression des molécules adhésives dans les CE, la sécrétion des chimiokines dans les leucocytes, la génération des MMP dans les SMC et la modulation de l'activation des lymphocytes T [181,199,200].

2.4 L'implication de l'axe CD40L/CD40 dans les fonctions plaquettaires

L'équipe de Henn et ses collègues [201] ont été les premiers à attribuer un rôle modulateur physiologique à l'axe CD40L/CD40 montrant qu'il régule temporellement l'inflammation

indésirable pendant la thrombogenèse. En particulier, ils ont démontré que les plaquettes activées par un agoniste, expriment le CD40L qui déclenche une réaction inflammatoire dans les CE exprimant CD40. Une agrégation accrue permet alors des interactions plaquettaires entre le CD40L et le CD40, ce qui conduit dans quelques minutes à quelques heures à un clivage du CD40L [202] (**Figure 2.2**). Contrairement au CD40L membranaire, le sCD40L est incapable de déclencher des réactions inflammatoires dans les CE [201]. De même, Langer et ses collègues [203] ont montré que le CD40 plaquettaire a un rôle hémostatique primaire.

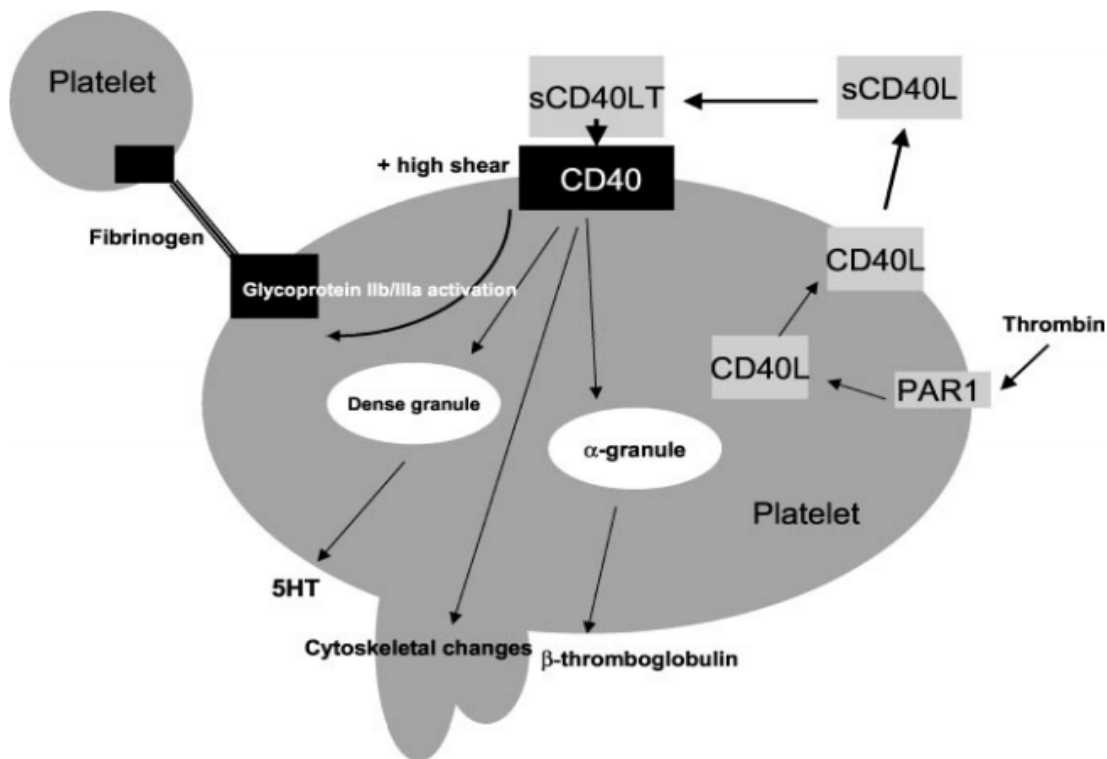


Figure 2.2 : Fonctions proposées de l'interaction CD40L-CD40 dans les plaquettes. Les plaquettes activées par un agoniste expriment le CD40L qui est clivé en surface dans quelques minutes à quelques heures, générant le sCD40L. Il est démontré que le sCD40L active modestement l' α IIb β 3 (ou le GPIIb/IIIa), déclenche des modifications du cytosquelette et induit une libération des granules α et des granules denses, ce qui favorise les événements inflammatoires ou thrombotiques [202].

Dans le contexte de la thrombo-inflammation, l'étude de Danese et ses collègues [204] a été la première à mettre en évidence l'effet inflammatoire direct des plaquettes *via* l'axe CD40L/CD40.

Ils ont montré que les lymphocytes qui expriment le CD40L activent le CD40 plaquettaire, ce qui déclenche la libération de RANTES (CCL5) qui se lie aux CE pour amplifier le recrutement des lymphocytes T [204]. D'une façon similaire, Inwald et ses collègues [205] ont montré que la liaison du sCD40L au CD40 induit l'expression de la P-sélectine et active partiellement l' α IIb β 3 sans induire à une agrégation plaquettaire [202] (**Figure 2.2**). De plus, Gerdes et ses collègues [206] ont montré que le CD40 plaquettaire est impliqué dans l'athérosclérose en déclenchant la formation d'agrégats plaquettaires-leucocytaires et l'activation des CE.

Notre équipe au laboratoire a publié quatre études concernant le rôle de l'axe sCD40L/CD40 dans les fonctions plaquettaires. Premièrement, Yacoub et ses collègues [170] ont démontré que les plaquettes expriment les TRAF-1, -2 et -6 et que la liaison de sCD40L induit le recrutement de TRAF-2 au CD40. Il a été démontré aussi que l'axe sCD40L/CD40/TRAF2 induit l'activation de Rac1 et de p38 MAPK, conduisant à l'expression de la P-sélectine et au changement de la forme des plaquettes [170,202] (**Figure 2.2**). En plus, ce même axe a permis l'augmentation de l'agrégation plaquettaire *ex vivo* et la formation de thrombus *in vivo* en présence des doses sous-optimales d'agonistes plaquettaires [170]. Deuxièmement, Hachem et ses collègues [171] ont montré que le sCD40L induit la phosphorylation de l'I κ B α , la sous-unité inhibitrice de NF- κ B qui, contrairement aux cellules nucléées, est impliquée dans des fonctions insaisissables n'affectant pas le génome (discutées plus en détail dans le **Chapitre 3**). L'activation de NF- κ B induite par le sCD40L s'est également révélée indépendante de l'axe sCD40L/CD40/TRAF2/Rac1/p38 MAPK et indispensable à l'expression de la P-sélectine ainsi qu'à la potentialisation de l'agrégation plaquettaire en réponse à de faibles doses d'agonistes plaquettaires [171]. L'étude de Kojok et ses collègues [172] a ensuite prouvé que l'activation de NF- κ B induite par sCD40L et la potentialisation de l'agrégation résultent toutes les deux exclusivement en aval de l'activation du récepteur CD40. Une deuxième étude récente de Kojok et ses collègues [173] a démontré que l'ASA réduit la sécrétion de TxA₂ plaquettaire renforcée par sCD40L, et l'agrégation plaquettaire potentialisée par sCD40L, en inhibant la phosphorylation de la MLC induite par des agonistes plaquettaires. À noter que les deux axes d'amorçage plaquettaire activés par l'axe sCD40L/CD40 (la p38 MAPK et le NF- κ B) n'ont pas été affectés par l'ASA [173]. Cela indique que le sCD40L pourrait être à l'origine de l'efficacité réduite du traitement antiplaquettaire régulier chez certains patients atteints de CAD [173]. Ces études récentes de l'équipe de Merhi et ses collègues [170–173] contredisent une étude précédente de André et ses collègues [169] qui a démontré que l'axe

sCD40L/CD40 n'est pas thrombogène puisque la formation du thrombus chez les souris CD40^{-/-} est intacte, contrairement aux souris CD40L^{-/-} qui développent une thrombogenèse retardée. En parallèle, ils ont montré aussi que le sCD40L se lie à l' α IIb β 3 aussi fort que le fibrinogène, et que cette liaison est plus susceptible de stimuler l'activation plaquettaire. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'activation plaquettaire par l'axe sCD40L/ α IIb β 3 n'ont pas été suffisamment expliqués [169]. De plus, l'étude utilise des plaquettes préactivées et une concentration de sCD40L quarante fois plus élevée que les concentrations utilisées dans nos études [169]. Ces contradictions peuvent suggérer que le CD40 et l' α IIb β 3 constituent, respectivement, les récepteurs d'affinité élevée et faible pour sCD40L.

Bien que la plupart des études confirment le rôle important des différents axes de sCD40L/CD40 plaquettaires dans la thrombo-inflammation, des études supplémentaires sont nécessaires pour décrire leurs voies de signalisation complètes et les effets moléculaires précis qu'ils entraînent au niveau des fonctions plaquettaires.

Chapitre 3 : Le NF- κ B

3.1 Introduction

Dans le cas d'athérosclérose et d'athérombose, les plaquettes activées libèrent de multiples médiateurs inflammatoires tels que la P-sélectine soluble, le sCD40L et l'IL-1 β . Ces molécules peuvent interagir avec les leucocytes et les CE et aggraver ainsi l'inflammation [184,207]. Au niveau moléculaire de la signalisation, l'initiation et la progression des maladies inflammatoires sont majoritairement modulées par le NF- κ B (*nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Le NF- κ B est un facteur de transcription largement caractérisé dans les cellules immunitaires parce qu'il assure différents processus cellulaires tels que la survie, la prolifération et l'activation des cellules. Il est également impliqué dans les maladies inflammatoires grâce à ses rôles affectant le génome[208]. Par exemple, l'activation de NF- κ B dans les CE pendant l'inflammation augmente l'expression des molécules d'adhésion et par conséquent augmente la liaison des leucocytes et des plaquettes. Dans les monocytes également, l'activation de NF- κ B induit leur différenciation en macrophages ainsi que l'expression des cytokines. Par ailleurs, le NF- κ B dans les neutrophiles prolonge la survie cellulaire et améliore sa fonction antibactérienne. Quant aux lymphocytes, le NF- κ B est impliqué dans la prolifération ainsi que dans l'expression des cytokines qui recrutent les plaquettes et stimulent les réponses inflammatoires et thrombotiques [164,209]. Par conséquent, le NF- κ B cellulaire agit comme un orchestrateur génomique des réactions thrombo-inflammatoires. Cependant, dans les cellules sanguines dépourvues de génome comme les plaquettes, le rôle de NF- κ B est moins caractérisé. Ce chapitre fait le bilan de plusieurs études démontrant le rôle du NF- κ B dans les fonctions plaquettaires ainsi que dans la thrombo-inflammation sans agir sur le génome.

3.2 Le NF- κ B: structure, régulation et activation

Le NF- κ B est une famille de protéines cytoplasmiques existant sous forme de dimères, et formées par des sous-unités qui se lient à l'ADN: le p50 (NF- κ B1), le p65 (RelA), le RelC, le p52 (NF κ B2) et le Rel B [164] (**Figure 3.1**). La voie canonique de NF- κ B est activée par plusieurs récepteurs tels que le TNFR, les TLR et le récepteur des cellules B (BCR) qui activent TAK1 (*TGF- β -activated kinase 1*). Dans cette voie, les dimères de NF- κ B (principalement p50:p65) sont associés à la sous-unité inhibitrice I κ B (α ou β) qui empêche leur activation. Notons que l'I κ B α est la forme la plus répandue de l'I κ B (*inhibitor of NF- κ B*). La voie non canonique est déclenchée

par plusieurs récepteurs tels que le récepteur de la lymphotoxine- β (LT β R) et le récepteur du facteur d'activation des cellules B (BAFFR) qui activent la kinase inductrice de NF- κ B (NIK, *NF- κ B-inducing kinase*). Dans cette voie, une des cinq sous-unités (principalement le RelB) s'associe au p100.

Généralement, l'activation de NF- κ B nécessite la kinase de l'I κ B (IKK, *I κ B kinase*). Dans la voie canonique, le TAK1 active l'IKK qui phosphoryle à son tour l'I κ B provoquant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Alors que dans la voie non canonique, le NIK active l'IKK qui phosphoryle le p100 provoquant son ubiquitination et son clivage par le protéasome en p52. Parmi les différents isoformes d'IKK, l'IKK β est la plus active. Suite à leur activation, les dimères de NF- κ B se déplacent vers le noyau où ils se lient à l'ADN et régulent l'expression des gènes inflammatoires et de survie [210–212]. En effet, les rôles de NF- κ B impliquant le génome sont bien caractérisés depuis sa découverte dans les lymphocytes B, il y a plus de 30 ans [164,213–217] (**Figure 3.1**).

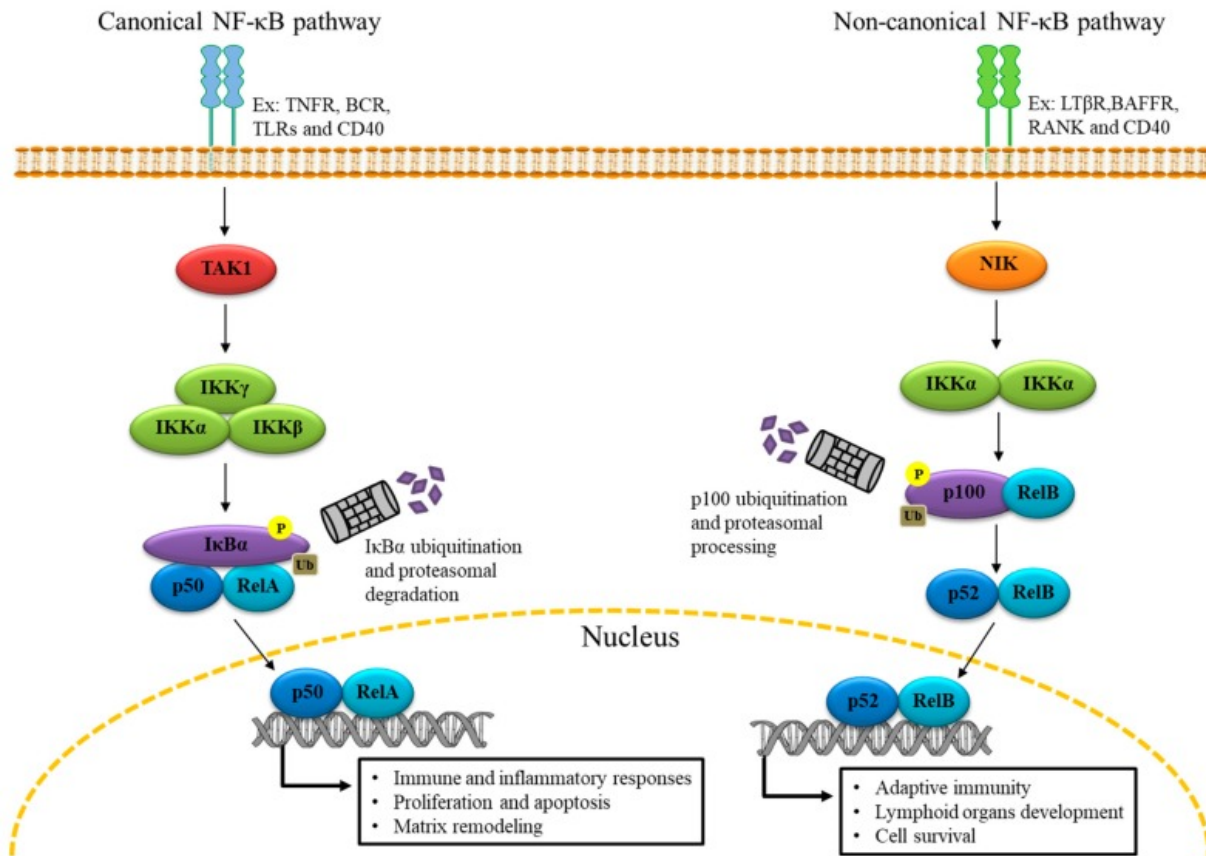


Figure 3.1 : L'activation de NF- κ B: la voie canonique et non canonique [164].

3.3 Le NF- κ B plaquettaire

3.3.1 Son expression

Bien que les plaquettes soient des fragments acellulaires dépourvus de noyaux, elles expriment l'IKK, l'I κ B et le NF- κ B [218]. Liu et ses collègues [219] ont été les premiers à montrer que la thrombine déclenche la dégradation de l'I κ B α suite à la phosphorylation de son résidu sérine 32. Des études ultérieures confirment cette découverte et renforcent l'idée que les plaquettes ne sont pas seulement les «restes des mégacaryocytes» [220–222]. Cela a été soutenu ensuite par la découverte d'autres facteurs de transcription dans les plaquettes en plus des mécanismes de traduction des microARN et des ARNm. Des recherches supplémentaires concernant le rôle de ces acteurs impliquant le génome ont conduit à la découverte que les plaquettes activées sont capables de synthétiser une quantité limitée de protéines suite à un signal comme celui de l'IL-1 β et le COX-1 [223,224,233,225–232].

3.3.2 Ses fonctions

La signalisation du NF- κ B dans les plaquettes implique l'activation de l'IKK et la dégradation de l'I κ B α après la stimulation par plusieurs agonistes ou amorceurs plaquettaires. Cependant, le rôle précis de NF- κ B dans les plaquettes reste énigmatique [164] (**Figure 3.2**). En effet, plusieurs études ont tenté d'étudier le rôle du NF- κ B dans les plaquettes en utilisant des souris « *knock-out* » ou des inhibiteurs pharmacologiques tels que les répresseurs de l'IKK (par exemple le BAY 11-7082) ou les inhibiteurs du protéasome (par exemple le MG132) [218,234,235]. Concernant l'approche pharmacologique, ce chapitre fait passer en revue les études utilisant les répresseurs de l'IKK uniquement. Cependant, **le Chapitre 4** abordera l'utilisation des inhibiteurs du protéasome.

3.3.2.1 La survie plaquettaire et l'apoptose

Les plaquettes humaines ont une durée de vie moyenne de 10 jours [236]. Dowling et ses collègues [237] expliquent cette courte durée de vie en utilisant un modèle de simulation qui montre que la sénescence plaquettaire est contrôlée par un mécanisme interne et non pas parce que les plaquettes sont soumises à de multiples coups de destruction dans la circulation. Ce mécanisme interne montre qu'après la formation des plaquettes, leurs protéines anti apoptotiques sont plus

nombreuses que leurs protéines apoptotiques. Cependant, avec le temps, et en absence des coups destructeurs externes, les plaquettes deviennent incapables de synthétiser davantage des protéines anti apoptotiques. Cela permet aux protéines apoptotiques de prospérer, perturbant ainsi la perméabilité de la membrane mitochondriale et déclenchant l'apoptose en initiant les signaux des caspases [238]. Bien que la régulation de ce mécanisme interne entre la vie et la mort plaquettaire soit partiellement comprise, une étude a démontré un rôle pour le protéasome [239] ainsi que pour le NF- κ B dans ce mécanisme. En effet, il a été prouvé que le traitement des plaquettes avec les inhibiteurs de l'IKK conduit à une augmentation significative des niveaux internes de Ca^{2+} . Simultanément, cela augmente le stress de l'ER et la perméabilité de la membrane mitochondriale, diminue les protéines anti apoptotiques et induit l'apoptose [240]. De plus, le NF- κ B joue un rôle dans la clairance des plaquettes, un mécanisme par lequel le corps maintient quotidiennement un nombre physiologique de plaquettes. Un des signaux d'élimination des plaquettes de la circulation est le clivage du GPIb α . En fait, son clivage de la surface des plaquettes est médiatisée par l'ADAM17 et se produit constamment dans des conditions physiologiques [241]. Une fois clivée, la GPIb α stimule la signalisation du GPIb-IX ce qui induit rapidement la clairance plaquettaire [242,243]. À cet égard, les plaquettes déficientes en IKK β sont incapables de cliver la GPIb α en réponse à la thrombine (mais pas à l'ADP ou au collagène). Cela suggère que le NF- κ B joue un rôle dans le clivage du GPIb α dans la signalisation de la thrombine [244].

3.3.2.2 L'amorçage, l'activation et l'agrégation plaquettaires

En général, la plupart des études montrent que l'inhibition de NF- κ B par les répresseurs de l'IKK empêche l'amorçage, l'activation et l'agrégation des plaquettes après leur stimulation avec des agonistes ou des amorceurs. Cela suggère que le NF- κ B plaquettaire a des rôles n'affectant pas le génome, mais qui contrôlent les fonctions plaquettaires. **Le tableau 3.1** regroupe ces différents rôles selon le répresseur de l'IKK et la molécule stimulatrice des plaquettes utilisés. Étant donné que le «*knock-out*» embryonnaire de NF- κ B est létal pour la plupart de ses gènes, très peu d'études ont abordé le «*knock-out*» de l'IKK, rapportant des résultats similaires [244,245] ou contradictoires [244] par rapport à l'approche pharmacologique.

Tableau 3.1 : Effets de l'inhibition de NF- κ B par les répresseurs de l'IKK sur l'amorçage, l'activation et l'agrégation plaquettaires

Agoniste amorceur	/ Inhibiteurs de l'IKK	Effets de l'inhibition	Références
Thrombine	BAY 11-7082	- Expression plus faible de la P-sélectine - Moins de production du TXA ₂ - Moins de libération d'ATP	[222]
	BAY 11-7082	- Inhibition de la phosphorylation d'ERK - Inhibition de la sécrétion des granules	[246]
	BAY 11-7082, BMS-345541	- Inhibition de la phosphorylation de SNAP-23 (inhibition de la sécrétion des granules) - Ralentissement de la formation du thrombus	[245,247]
	Inhibiteurs de MALT1	Inhibition de la formation du complexe SNARE	[248]
	L'inhibiteur de l'IKK VII	Suppression de la signalisation négative de VASP	[220]
	BAY 11-7082	- Réduction de la liaison du fibrinogène - Inhibition de l'agrégation plaquettaire - Inhibition de la rétraction du caillot	[221,222,249]
Collagène	BAY 11-7082	- Augmentation des niveaux d'AMPc - Amélioration de la signalisation négative de VASP - Suppression de la formation du TXA ₂ - Suppression de la libération d'ATP - Inhibition de l'expression de la P-sélectine - Suppression de la signalisation de Ca ²⁺	[221]
	L'inhibiteur de l'IKK VII	Suppression de la signalisation négative de VASP	[220]
	BAY 11-7082	- Réduction de la liaison du fibrinogène - Inhibition de l'agrégation plaquettaire - Inhibition de la rétraction du caillot	[221,222,249]
	Andrographolide	Interférence dans l'agrégation des plaquettes	[235,250]
	ADP	BAY 11-7082	Altération de l'activation plaquettaire à ses débuts
Épinéphrine	BAY 11-7082	Altération de l'activation plaquettaire à ses débuts	[222]

sCD40L	L'inhibiteur l'IKK VII	de	- Inhibition de l'expression de la P-sélectine - Inhibition de la potentialisation de l'agrégation plaquettaire en présence des doses sous-optimales de collagène	[171]
	BAY 11-7082		Inhibition de la potentialisation de l'agrégation plaquettaire en présence des doses sous-optimales de collagène	[171]
	BAY 11-7082		Inhibition de la potentialisation de l'agrégation plaquettaire en présence des doses sous-optimales de thrombine	[172]

3.3.2.2 Une fonction au-delà des plaquettes

La RT-PCR et les études des puces à ADN des plaquettes humaines hautement purifiées ont identifié plus de 2500 transcrits d'ARNm [227,251,252]. Les plaquettes humaines ont également des microARN impliqués dans la modulation de l'activité des plaquettes [253–256] lors de la stimulation par des agonistes plaquettaires [257].

Le NF- κ B s'est avéré être une cible et un modulateur des microARN dans les plaquettes. Par exemple, le miR-223, le miR-199a, le miR-155 et le miR-124a empêchent l'expression d'IKK. En revanche, le NF- κ B module le miR-29b qui joue un rôle dans la suppression des tumeurs [258].

L'ARN, y compris le microARN, peut se déplacer dans des microvésicules intracellulaires qui peuvent être expulsées vers le domaine extérieur, agissant comme des navettes messagères [259]. De même, il a été démontré que les plaquettes activées libèrent des microvésicules/microparticules qui portent des microARN fonctionnels. Les microparticules plaquettaires (PMP, *platelet microparticles*) peuvent ensuite être transmises aux cellules nucléées telles que les CE où elles interfèrent dans les fonctions cellulaires [260–262]. Une étude récente a démontré que la thrombine induit la libération de PMP pour protéger contre l'athérosclérose *via* le miR-223 qui induit directement l'expression des molécules d'adhésion dans les CE [261]. Cela peut suggérer que le NF- κ B, pendant l'activation plaquettaire par des agonistes, peut également être

transporté dans des microvésicules plaquettaires, libéré et transmis à des cellules nucléées où il peut agir de manière impliquant le génome pour réguler certaines conditions pathologiques.

Pour conclure, des études supplémentaires sont nécessaires pour déchiffrer exactement et avec plus de précision les voies de signalisation et les fonctions de NF- κ B plaquettaire dans les plaquettes et dans d'autres cellules [164] (**Figure 3.2**). Ces investigations sont importantes parce que le NF- κ B peut être une cible thérapeutique dans les maladies thrombo-inflammatoires.

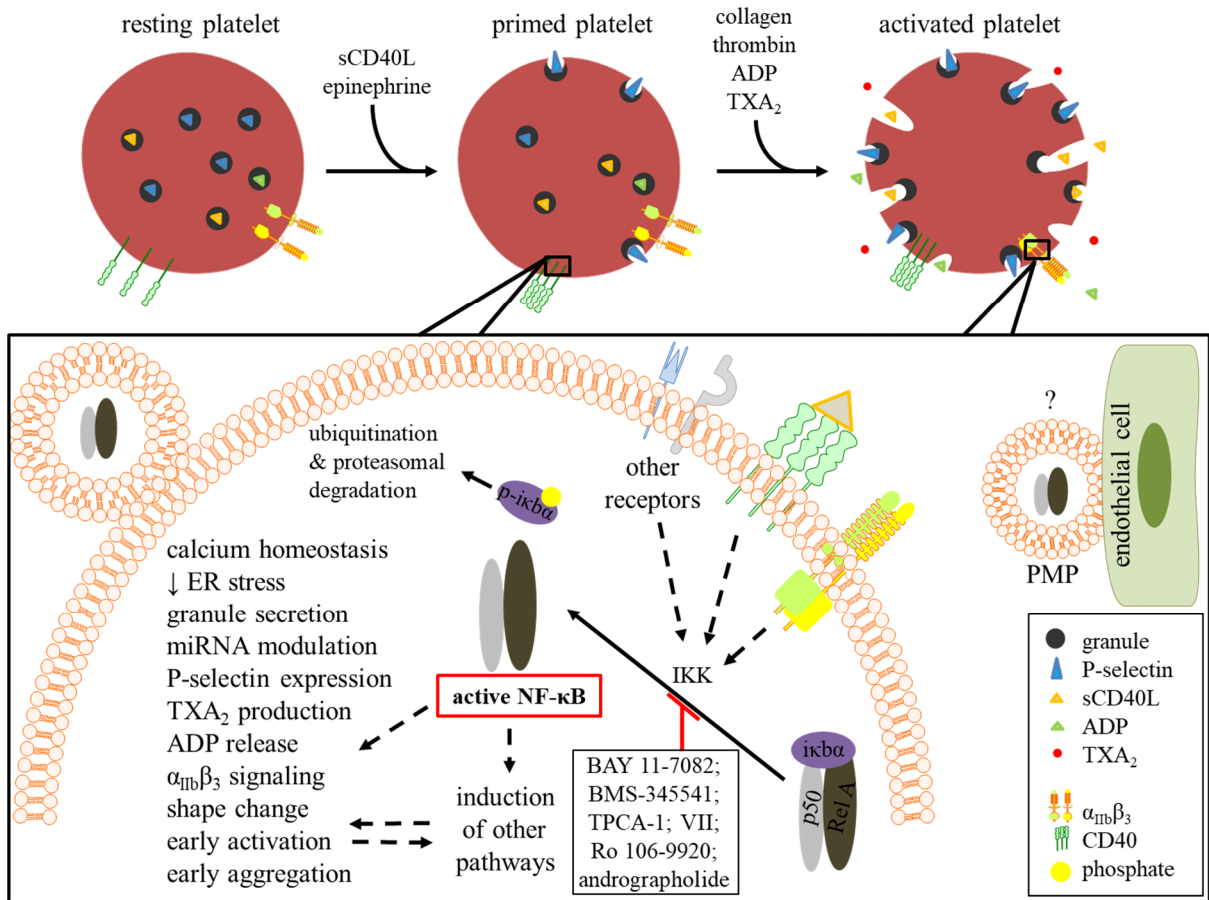


Figure 3.2 : Les rôles possibles du NF- κ B plaquettaire [164].

Chapitre 4: Le protéasome

4.1 Le protéasome

4.1.1 Structure et fonctions cellulaires

La dégradation des protéines est nécessaire pour les cellules eucaryotes parce qu'elle leur permet d'éliminer ou de recycler les protéines anormales/inutiles, mais aussi d'assurer plusieurs autres fonctions. Ces processus sont assurés dans la cellule par les endosomes, les lysosomes et le protéasome. Le protéasome est une protéase multi-catalytique 26S cytosolique (2,4 MDa) constituée de deux coiffes régulatrices 19S flanquant une sous-unité protéolytique 20S centrale (environ 750 kDa).

La sous-unité de régulation 19S est formée par l'association de 2 multimères: le couvercle et la base. Le couvercle comprend jusqu'à 10 sous-unités non ATPasiques. Cependant, la base contient 2 sous-unités non-ATPasiques et 6 sous-unités homologues ATPasiques formant des anneaux hexamériques; elle est responsable de l'assemblage des particules régulatrices 19S à la particule centrale 20S, permettant la formation et l'activation du protéasome 26S.

La particule centrale 20S est composée de 28 sous-unités hétérogènes assemblées en 4 anneaux: 2 anneaux bêta internes et 2 anneaux alpha non catalytiques formant des pores du côté extérieur. Chaque anneau est donc formé de 7 sous-unités [263] (**Figure 4.1**). Parmi les sous-unités bêta, 3 ont des activités protéolytiques de type caspase, trypsine et chymotrypsine ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$, respectivement). Seul le noyau protéolytique 20S effectue une dégradation indépendante de l'ubiquitine. Une fois assemblé aux particules régulatrices 19S formant ainsi le protéasome 26S, le noyau 20S dégrade spécifiquement les protéines conjuguées à l'ubiquitine d'une manière dépendante de l'ATP.

L'ubiquitine (environ 8 kDa) est une séquence protéique de 76 acides aminés exprimée dans les cellules eucaryotes. Sa conjugaison aux protéines est catalysée séquentiellement par l'enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1), l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et l'ubiquitine ligase (E3). Tout d'abord, l'enzyme E1 se lie et active l'ubiquitine en consommant de l'ATP. Ensuite, l'E2 forme un complexe intermédiaire avec l'ubiquitine activée. Enfin, l'E3, molécule d'échafaudage, interagit à la fois avec le complexe E2-ubiquitine et le substrat protéique, facilitant

ainsi le transfert de l'ubiquitine de l'E2 au substrat. Une liaison iso-peptidique se forme ainsi entre le résidu glycine en c-terminale de l'ubiquitine et les résidus consensus de lysines dans le substrat. La liaison de l'ubiquitine détermine le devenir des protéines. Par exemple, la liaison de l'ubiquitine aux résidus de lysines 11, 29 et 48 marque la dégradation protéasomique. La liaison aux autres résidus module l'activité, la localisation ou l'interaction/échafaudage des protéines [264,265]. En plus, le protéasome intervient dans le processus de « *deubiquitination* » [266–269], assuré par les enzymes DUBs (*deubiquitinases/deubiquitinating enzymes*) qui sont associées au 19S [270–272]. L'ensemble du protéasome, ubiquitines et ses enzymes forment le « *ubiquitin-proteasome system* » (UPS) [272] (**Figure 4.2**).

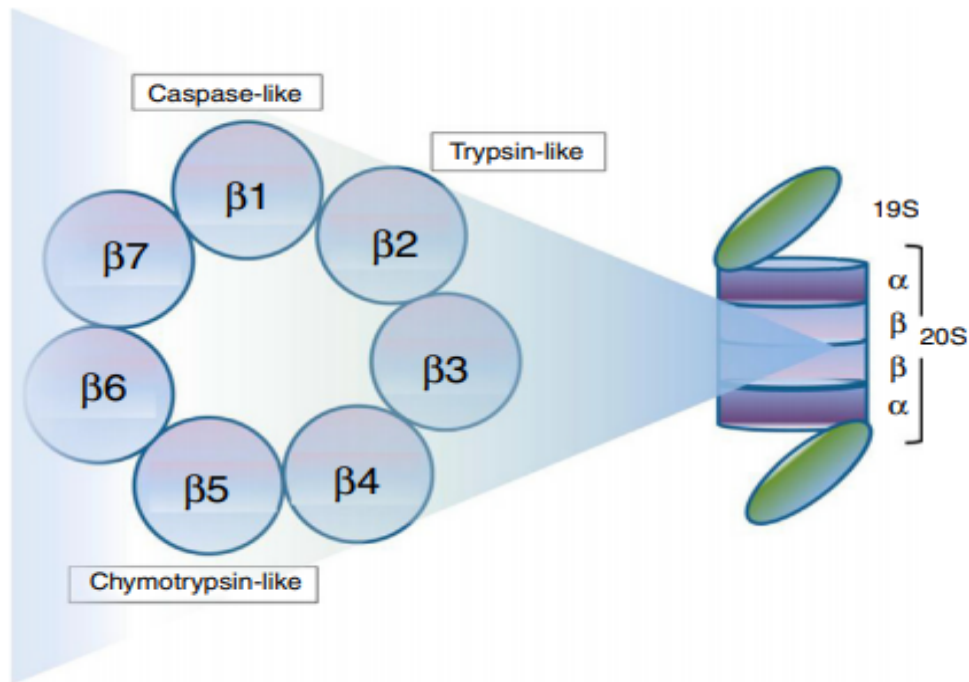


Figure 4.1 : La structure du protéasome 26S [263].

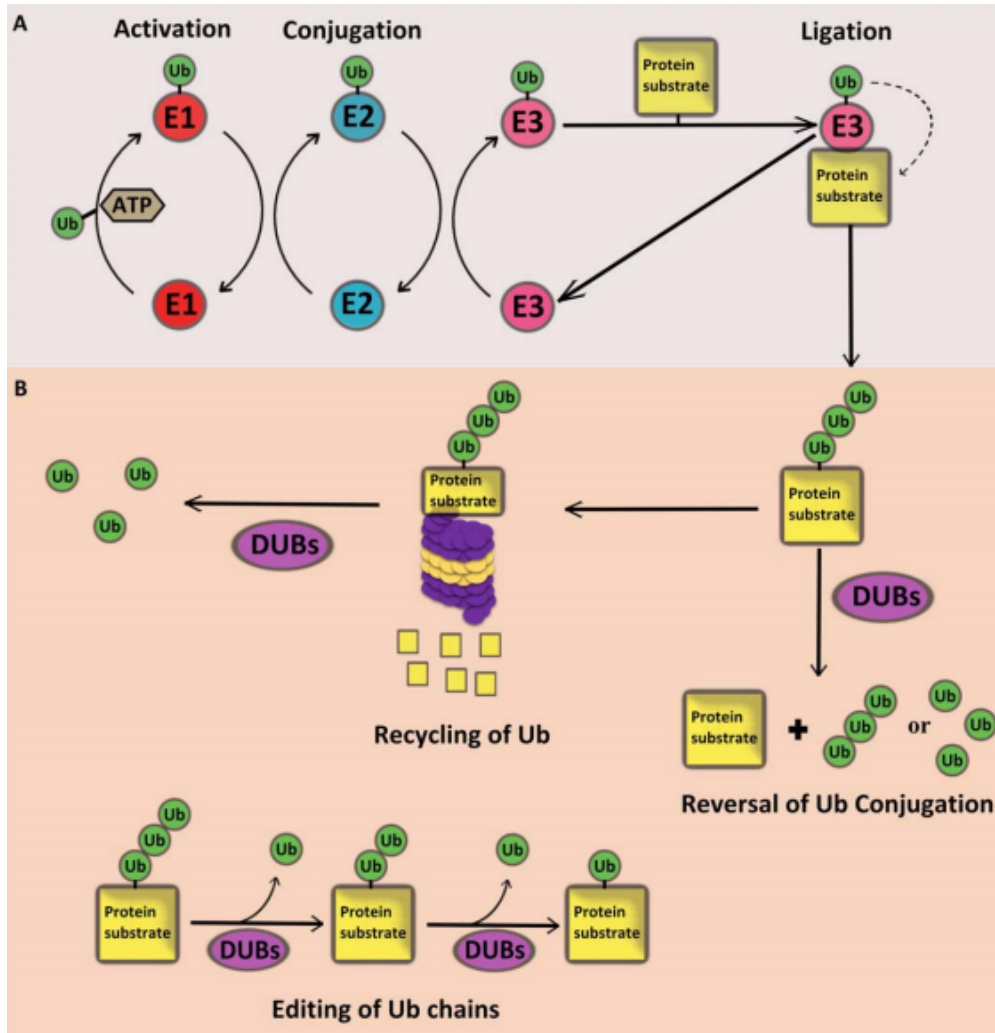


Figure 4.2 : La voie de l'UPS et les fonctions des DUBs [272].

Pour mieux comprendre l'importance de la dégradation/clivage des protéines par le protéasome, les chercheurs ont développé plusieurs méthodologies, y compris l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques tels que l'époxomicine, la lactacystine, le DCI, la HgCl₂, le bortézomib (PS-341), le carfilzomib, le MG132, le PCMB, le PSI (*benzyloxycarbonyl -Ile-Glu (O- tert. -Butyl) -Ala -leucinal*) et l'acide mersalyl. Le **tableau 4.1** présente quelques inhibiteurs de protéasome et décrit leurs effets principaux [273–279].

Tableau 4.1 : Les antagonistes du protéasome et leurs caractéristiques

Inhibiteur	Propriétés	Liaison protéasomique et activités ciblées	Autres effets cellulaires
Bortézomib	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibiteur de première classe - Approuvé par la FDA (Velcade ®) comme traitement de première ligne du myélome multiple 	<ul style="list-style-type: none"> - Se lie d'une façon réversible au protéasome 26S et à l'immunoprotéasome - Activité semblable à la : chymotrypsine> caspase> trypsine 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de NF-κB - Induit l'apoptose cellulaire due à l'accumulation des protéines, à l'induction du stress et à la perturbation du cycle cellulaire
Carfilzomib	<ul style="list-style-type: none"> - Nouvelle génération - Son usage est approuvé par la FDA (Kyprolis ®) contre le myélome multiple récidive - Moins toxique que le bortézomib 	<ul style="list-style-type: none"> - Se lie d'une façon irréversible au protéasome 20S et à l'immunoprotéasome - Activité semblable à la chymotrypsine 	<ul style="list-style-type: none"> - Apoptose cellulaire
Lactacystin	<ul style="list-style-type: none"> - Isolé des <i>Actinomycètes</i> du sol - Prodrogue, métabolisée en β-lactone (Omuralide) <i>in vivo</i> - Inhibe les protéases non protéasomiques comme la cathepsine 	<ul style="list-style-type: none"> - Se lie d'une façon irréversible au protéasome 20S et à l'immunoprotéasome - Toutes les activités, avec préférence à l'activité semblable à la chymotrypsine 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibe la croissance cellulaire - Apoptose cellulaire - Régulation négative de NF-κB
Époxomicine	<ul style="list-style-type: none"> - Isolé de la souche <i>Actinomycetes</i> - Spécifique 	<ul style="list-style-type: none"> - Se lie d'une façon irréversible au protéasome 20S - Toutes les activités, avec préférence à l'activité semblable à la chymotrypsine 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibe la signalisation de NF-κB
MG132	<ul style="list-style-type: none"> - Peptide aldéhyde isolé des herbes médicinales chinoises - Premier choix pour étudier l'UPS dans des lignées cellulaires humaines 	<ul style="list-style-type: none"> - Se lie d'une façon irréversible au protéasome 20S - Toutes les activités, avec préférence à l'activité semblable à la chymotrypsine 	<ul style="list-style-type: none"> - Arrêt du cycle cellulaire et apoptose - Inhibe l'activation de NF-κB

En se basant sur des études abordant les approches pharmacologiques, il a été constaté que la dégradation des protéines par le protéasome n'élimine pas seulement les protéines aberrantes, mais régule également (i) la transduction du signal par la désensibilisation des récepteurs, (ii) l'activité enzymatique, (iii) la progression du cycle cellulaire, (iv) la croissance/différenciation des cellules, (v) l'apoptose, (vi) la transcription/réparation génique et (vii) la présentation des antigènes (l'immunoprotéasome) [266,267,280–284].

4.1.2 L'axe protéasome/NF- κ B

Comme c'est déjà mentionné précédemment, la signalisation de NF- κ B canonique (*via* l'hétérodimère p65:p50) et non canonique (*via* l'hétérodimère p52:RelB) est modulée par le protéasome. En effet, les inhibiteurs du protéasome sont également des inhibiteurs du NF- κ B (**Tableau 4.1**). Cependant, une analyse comparant les deux classes principales d'inhibiteurs de NF- κ B, les inhibiteurs de protéasome (ou les répresseurs de dégradation de l'I κ B; par exemple le MG132) et les inhibiteurs d'IKK (ou les répresseurs de phosphorylation de l'I κ B; par exemple le BAY 11-7082), a montré que les inhibiteurs de protéasome sont plus efficaces pour atténuer l'activité de NF- κ B [285].

Le protéasome active le NF- κ B, non seulement *via* la dégradation de la sous-unité inhibitrice I κ B α (la voie canonique de NF- κ B), mais aussi *via* le clivage des sous-unités précurseurs de NF- κ B, le p105 et le p100, en p50 (NF- κ B 1) et p52 (NF- κ B 2) respectivement (la voie non canonique de NF- κ B) [286].

En somme, les fonctions de l'axe NF- κ B/protéasome impliquent principalement le génome. Ces fonctions ne se limitent pas seulement à la transcription active des gènes mais également à la répression de la transcription. Dans cette dernière, les homodimères inhibiteurs p50 s'assemblent et entrent en compétition avec les hétérodimères activateurs p65 pour le même site de liaison à l'ADN. En outre, presque toutes les sous-unités de NF- κ B sont ubiquitinées principalement par les ligases E3, et leur ubiquitination sert de marqueur soit pour le clivage protéasomique soit pour exécuter autres fonctions hors de notre intérêt. Cependant, la plupart des recherches étudie l'ubiquitination de l'I κ B α et de p65 (RelA) [287]. À noter que, contrairement à l'I κ B α , la protéine p65 est partiellement dégradée lors de l'activation de la voie de NF- κ B. En effet, la dégradation de p65 se produit principalement dans sa fraction nucléaire pour

contrôler l'expression des gènes [288]. Une autre différence observée est que la dégradation protéasomique se produit pour le p65 total, mais pas pour le p65 phosphorylé (Ser536), ce dernier semblant exister et fonctionner indépendamment de l'IkBa [289].

4.2 Le protéasome plaquettaire

4.2.1 Aperçu

Bien que leur capacité de synthèse protéique soit limitée, les plaquettes possèdent des mécanismes de dégradation protéiques distincts et collaboratifs. Ceux-ci comprennent la calpaïne, les caspases, les MMP, les protéases de surface, les protéases de lysosome et le protéasome [290]. Yukawa et ses collègues [291] ont été les premiers à purifier le protéasome plaquettaire par chromatographie sur colonne. Des investigations ultérieures ont confirmé que les plaquettes expriment les protéasomes 20S et 26S [292]; l'immunoprotéasome [293]; des systèmes fonctionnels de mono et polyubiquitination [294,295]; des ARNm liés à l'UPS [230]; et des DUBs [296]. Pourtant, le rôle de la dégradation ou le clivage des protéines par le protéasome dans ces fragments cellulaires anucléés reste encore énigmatique.

4.2.2 Les activateurs et les régulateurs

Le protéasome plaquettaire est constitutivement actif. Toutefois, plusieurs agonistes plaquettaires augmentent son activité [284] tels que le collagène et la thrombine qui induisent, respectivement, une augmentation de 10 et de 7 fois l'activité protéasomique de type chymotrypsine [284]. Quant à l'ADP, il double l'activité protéasomique [297]. Les récepteurs plaquettaires comme le TLR4 (lipopolysaccharides), la PAR1 (thrombine), le GPIb-IX-V (thrombine et vWF) et le P2Y₁₂ (ADP) communiquent avec le protéasome [294]. Au niveau intracellulaire, l'activité du protéasome est régulée par la production d'AMPc et dépend de la PKA [298]. La voie de PLC γ et les effecteurs dépendants du Ca²⁺, tels que la calpaïne et la PKC, sont aussi impliqués dans la régulation du protéasome [284]. *In vivo*, l'ATP et le Mg²⁺ sont généralement nécessaires pour induire une activité protéasomique [299–301] mais pas dans le cas des plaquettes [291]. D'autres régulateurs du protéasome intra plaquettaire ont été aussi purifiés. Yukawa et ses collègues [291] ont isolé un complexe polypeptidique (170 kDa) des plaquettes. Ce complexe potentialise et améliore de manière dose-dépendante les activités

protéasomiques de type chymotrypsine et trypsine [291]. Ils ont ensuite décrit le fonctionnement du complexe, démontrant qu'il fonctionne de la même façon qu'un effecteur allostérique positif [302].

4.3 Les fonctions du protéasome plaquettaire

Comme dans les autres cellules, le protéasome plaquettaire 26S assure des activités dépendantes de l'ATP, de type chymotrypsine, trypsine et caspase, responsables de la protéolyse de multiples protéines régulatrices et, par conséquent, régule une pléthore de fonctions plaquettaires [303].

4.3.1 La production et la viabilité des plaquettes

Le protéasome régule la production et la durée de vie des plaquettes. Ceci est démontré dans une expérience montrant que l'inhibition du protéasome diminue le nombre des plaquettes et réduit à moitié la demi-vie plaquettaire. Simultanément, des changements sont observés dans les marqueurs apoptotiques (par exemple l'exposition de PS, la régulation positive de la protéine pro-apoptotique BAX et la diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial) et au niveau de la clairance médiée par les macrophages [164,239]. En outre, le bortézomib, étant le premier inhibiteur du protéasome utilisé en pratique clinique comme traitement de deuxième ligne du myélome multiple [304], induit une thrombocytopénie chez les patients en intervenant exclusivement dans la formation des pro-plaquettes en augmentant les niveaux des petites GTPases Rho activées, régulateurs négatifs de la formation des pro-plaquettes [305–307]. Après l'arrêt du bortézomib, la micro angiopathie thrombotique associée au médicament est abolie chez les patients [308]. Ces données suggèrent que le protéasome est impliqué dans les états plaquettaires physiologiques et physiopathologiques, régulant globalement la thrombopoïèse plaquettaire et la viabilité des plaquettes [309].

4.3.2 L'activation et l'agrégation plaquettaires

4.3.2.1 Le cas des conditions pathologiques

L'étude des caractéristiques du protéasome plaquettaire dans des états pathologiques permet de mieux comprendre le degré de contribution du protéasome dans l'activation plaquettaire. Par

exemple, la septicémie induite par l'*E. coli* augmente l'activité protéasomique dans les plaquettes [310]. Dans des conditions hémolytiques, les niveaux accrus du stress oxydatif dans les plaquettes sont associés à (i) une activité protéasomique réduite et une ubiquitination accrue des protéines, (ii) une augmentation des niveaux de BAX et (iii) une mort prématurée des plaquettes [311]. Dans les CAD, les patients présentent une diminution de l'expression de la sous-unité du protéasome plaquettaire de type 8, un homologue de la sous-unité $\beta 5$ constitutive du protéasome 20S qui s'intègre, lors de l'induction, dans les protéasomes nouvellement assemblés [312]. Chez les patients atteints de la thrombocytopénie liée au gène ANKRD26, des structures cytoplasmiques particulières (PaCS, *particulate cytoplasmic structures*) cloisonnées de protéasome sont observées dans les plaquettes présentant également des réponses réduites d'agrégation [313]. Cependant, il faudrait une validation supplémentaire pour savoir si ces caractéristiques sont les causes ou les conséquences des pathologies.

4.3.2.2 Le cas des inhibiteurs du protéasome

Les antagonistes pharmacologiques ciblant l'activité protéasomique offrent un aperçu plus clair de l'impact du protéasome sur l'activation plaquettaire. En utilisant l'inhibiteur de protéasome I (PSI), Dupré et ses collègues [280] ont montré que le protéasome désensibilise les plaquettes au PAF (*platelet-activating factor*), un puissant médiateur des phospholipides associé à de multiples maladies inflammatoires, *via* une régulation négative du récepteur de PAF couplé à l'ubiquitine lors de la stimulation du ligand. Un autre rôle de régulation négative du protéasome dans l'activation des plaquettes est aussi montré. En utilisant le MG132, il a été démontré que le protéasome dégrade le CD36, un stimulateur de l'activation plaquettaire, en réponse aux ligands d'anti-agrégation [314]. En outre, il a été démontré que le bortézomib atténue les signalisations inhibitrices plaquettaires tels que la phosphorylation de VASP qui entrave l'activation des plaquettes en réduisant l'expression de la P-sélectine et la liaison du fibrinogène à son récepteur $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [315].

En revanche, plusieurs autres études montrent un rôle de régulateur positif du protéasome dans l'activation plaquettaire. En utilisant le PSI et le MG132 dans les mégacaryocytes, Mitchell et ses collègues [316] ont montré que la biogenèse de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ est régulée par le protéasome *via* la dégradation des sous-unités pro- αIIb mal repliées. Bien que ceci a été contredit par les études de Koessler et ses collègues [297,315] utilisant de différentes doses d'agonistes, l'utilisation du

bortézomib confère au complexe de protéase un rôle dans l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP (par la dégradation des régulateurs de l'eNOS et la prévention de la production de NO, un antagoniste des récepteurs de l'ADP) ainsi que la libération d'ATP entraîné par le collagène [317]. Ceci, parallèlement à l'amélioration de la fonction endothéliale et au blocage de l'activation de NF- κ B dans les cellules vasculaires et sanguines, pourrait expliquer la réduction des événements thromboemboliques *in vivo* lors de l'antagonisme protéasomique [318]. De la même manière, le traitement à l'époxomicine du PRP a diminué l'agrégation des plaquettes stimulées par le collagène d'une manière dépendante du NF- κ B [319]. De plus, la pré-administration de MG132 à des souris ou le traitement de leurs plaquettes par MG132 et leur réinjection retardent la thrombose occlusive induite. *In vitro*, cela est attribué à l'inhibition du clivage des régulateurs du cytosquelette tels que la Filamine A, qui relie le complexe GPIb-IX-V aux filaments d'actine du cytosquelette, et la Taline-1, qui participe à la propagation plaquettaire. Ainsi, les deux protéines s'accumulent dans le cytoplasme (sous forme ubiquitinées et sous forme native non clivée), provoquant globalement une réduction de (i) l'adhérence et la propagation plaquettaire, (ii) la libération des microparticules exprimant la PS, (iii) l'agrégation et (iv) le clivage de GPIIb α et la rétraction du caillot par rapport au contrôle positif (des plaquettes stimulées avec de la thrombine à faible dose) [294]. Karim et ses collègues [248] ont également montré une diminution (i) de l'activation de l' α IIB β 3, (ii) de la formation du complexe SNARE et, par conséquent, de l'exposition à la P-sélectine (un marqueur de la libération de granules), (iii) des niveaux de Ca²⁺ interne et (iv) de l'agrégation dans les plaquettes prétraitées par MG132 et puis stimulées avec de faibles doses de collagène ou de thrombine. À noter que les deux études démontrent que plusieurs marqueurs d'activation et d'agrégation ne sont pas affectés par l'antagonisme protéasomique en réponse à des doses plus élevées de thrombine (supérieures à 0,05 U/ml). Cela suggère un lien plus faible entre le protéasome et le récepteur à faible affinité de la thrombine PAR1 par rapport au récepteur à haute affinité de la thrombine GPIb-IX-V [248,294].

Cependant, d'autres études démontrent que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par le collagène, à l'aide du PSI, n'est pas médiée par l'inhibition du protéasome plaquettaire, mais plutôt par des actions indirectes [320], telles que la limitation de l'activité de NF- κ B [319]. Comme c'est déjà expliqué dans le **Chapitre 3**, le protéasome est responsable de l'activation de NF- κ B par la dégradation du phospho-I κ B (la sous-unité inhibitrice du NF- κ B)

ubiquitiné dans la voie canonique, ou par le clivage de phospho-p100 (un membre de la famille de NF- κ B) ubiquitiné dans la voie non canonique. En effet, l'activation plaquettaire médiée par le collagène *via* le récepteur GPVI est signalée par la tyrosine kinase de rate (Syk) qui phosphoryle plusieurs protéines adaptatrices de la voie de signalisation. Lors de la liaison du GPVI, la kinase Syk est ubiquitinée mais non dégradée; son activité est 5 fois plus élevée [321]. Cette explication est soutenue par des observations ne montrant aucun effet de l'inhibition du protéasome sur les marqueurs d'activation des plaquettes (par exemple la P-sélectine) [284].

En somme, les données disponibles jusqu'à présent suggèrent que le protéasome n'influence pas directement l'activation plaquettaire, puisque les voies d'activation des plaquettes les plus prononcées se trouvent en amont ou fonctionnent en parallèle avec le protéasome. D'autre part, cela pourrait indiquer que le protéasome pourrait être un acteur important dans l'amorçage des plaquettes principalement grâce à l'activation de NF- κ B.

Chapitre 5 : Projet de recherche

5.1 Problématique

Les plaquettes sont parmi les principaux acteurs impliqués dans les maladies inflammatoires chroniques. Dans l'athérombose par exemple, les plaquettes présentent une activation et une agrégation exacerbées, ce qui favorise la formation d'une boucle athérombrogène pro-inflammatoire et conduit finalement à l'infarctus du myocarde, à des accidents vasculaires cérébraux et à la mort [322]. La thérapie antiplaquettaire avec l'aspirine (ASA) est donc utilisée en prévention secondaire des maladies cardiovasculaire, plus particulièrement chez les patients atteints de CAD [323]. Cependant, des événements thromboemboliques se produisent souvent chez de nombreux patients traités par l'ASA, conduisant ainsi à des événements coronariens et ischémiques lorsqu'il est utilisé en prévention secondaire. Ce phénomène nommé « la résistance à l'aspirine » est causé par la pharmacocinétique des médicaments, les polymorphismes des cibles thérapeutiques, les interactions médicamenteuses, la non-conformité des patients aux médicaments et les stimuli inflammatoires [324–326]. Dans ce dernier cas, les plaquettes, dans un environnement pro-inflammatoire, sont amorcées [141] en réponse à plusieurs médiateurs thrombo-inflammatoires tels que le CD40L et son récepteur classique, le CD40.

Le CD40L est exprimé par plusieurs cellules impliquées dans les processus athérombotiques, incluant les plaquettes. Le CD40L est présent aussi, dans la circulation sanguine, sous forme soluble (sCD40L) principalement dérivée des plaquettes activées. Initialement, l'axe CD40L/CD40 a été découvert dans les cellules immunitaires et donc son rôle a été limité aux réponses immunitaires seulement. Cependant, suite à la découverte du CD40L dans les plaquettes et à l'identification d'autres récepteurs du CD40L, le rôle athérombrogène du CD40L a émergé, confirmé par plusieurs publications [108,184,203,205] et par des études cliniques associant les taux plasmatiques élevés du CD40L aux CAD [165,180].

Notre équipe de recherche a précédemment prouvé que le sCD40L seul n'induit pas l'agrégation plaquettaire, mais agit plutôt comme un amorceur qui amplifie les réactions plaquettaires en présence des stimuli physiologiques tels que des doses sous-optimales d'agonistes plaquettaires. Moléculairement, nous avons découvert que la signalisation de sCD40L dans les

plaquettes impliquait la voie du NF- κ B [171,172]. En effet, le NF- κ B est fortement impliqué dans les maladies athérotrombotiques parce qu'il agit au niveau de la transcription des gènes de survie et de prolifération dans les cellules vasculaires et sanguines [164]. Le NF- κ B existe dans le cytoplasme sous forme de dimères (p65 et p50) inactivés par l'inhibiteur I κ B α et régulés par la kinase d'I κ B (IKK). Suite à des signaux inflammatoires, l'IKK phosphoryle l'I κ B α , entraînant son ubiquitination et donc sa dégradation par le protéasome, une machinerie protéolytique dont son rôle ne se limite pas seulement à la modulation du NF- κ B, mais implique aussi de multiples fonctions de signalisation et de régulation [211,267,290]. Lorsque la forme phosphorylée d'I κ B α (p-I κ B α) est dégradé, le NF- κ B activé se déplace vers le noyau pour agir sur le génome [327]. Cependant, bien que les plaquettes soient dépourvues de génome, plusieurs chercheurs ont corroboré la présence du facteur de transcription NF- κ B dans les plaquettes par différentes techniques, et ont par la suite montré son implication dans la signalisation et les fonctions plaquettaires [171,172,218,221,222,235,244,245,328,329]. Au niveau de la signalisation du sCD40L, notre équipe a précédemment émis l'hypothèse que l'axe sCD40L/CD40/NF- κ B est un amorceur plaquettaire. Sous cette hypothèse, notre première étude a vérifié la présence du NF- κ B plaquettaire (p65 et I κ B) et a montré son implication dans la régulation de la potentialisation de l'agrégation et la sécrétion plaquettaires induite par sCD40L, à l'aide de deux inhibiteurs de l'IKK (l'inhibiteur de l'IKK VII et le BAY 11-7082) [171]. En respectant la même hypothèse dans notre étude ultérieure, nous avons montré que les anticorps monoclonaux ciblant soit le sCD40L soit le CD40 abolissent l'activation du NF- κ B [171,172]. Dans une approche génomique, nous avons également montré que les plaquettes de souris CD40^{-/-} présentent une activation déficiente de NF- κ B en réponse à msCD40L [172]. Dans les études d'agrégation, un anticorps monoclonal contre l'interaction entre le sCD40L et le CD40 a inhibé la potentialisation de l'agrégation plaquettaire avec sCD40L, de la même manière que l'inhibition de NF- κ B en utilisant le BAY 11-7082 [172]. De plus, nous avons récemment démontré que la voie de signalisation de NF- κ B activée par le sCD40L n'est pas affectée par l'ASA [173]. La somme de ces données indique que l'augmentation de l'activation et l'agrégation plaquettaires, en présence du sCD40L, résulte de l'induction du NF- κ B.

Dans cette étude, nous avons validé davantage l'implication du NF- κ B dans les effets d'amorçage plaquettaire du sCD40L en ciblant pharmacologiquement un régulateur principal du

NF- κ B, le protéasome. Pour cela, nous avons surveillé l'activation du NF- κ B par sCD40L en suivant la dégradation de l'I κ B en présence de l'inhibiteur du protéasome, le MG132. Nous avons également comparé les effets du MG132 et du BAY 11-7082 sur la potentialisation de l'agrégation plaquettaire et de la rétraction du caillot en réponse au sCD40L. Cette étude apporte une preuve supplémentaire de l'importance du NF- κ B dans l'amorçage plaquettaire. Il permet également de délimiter le rôle de l'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome dans les fonctions plaquettaires et d'étudier les mécanismes par lesquels il amorce les plaquettes, tout en les rendant hyperactives et résistantes ou moins sensibles à la thérapie antiplaquettaire dans les états thrombo-inflammatoires.

5.2 Hypothèse

L'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome orchestre l'amorçage plaquettaire de manière non génomique, ce qui dispose les plaquettes à une activation et une agrégation prononcées.

5.3 Objectifs

I. Évaluer l'interaction entre le NF- κ B et le protéasome dans la signalisation plaquettaire induite par le sCD40L

II. Délimiter l'impact de l'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome dans les fonctions plaquettaires, en particulier, l'agrégation plaquettaire et la rétraction du caillot

5.4 Méthodes

5.4.1 Les réactifs et les anticorps

Les anticorps anti-p38 MAPK, anti-phospho-p38 MAPK^{thréonine (180/182)}, anti-phospho-I κ B α ^{sérine (32/36)}, anti-I κ B α (44D4), anti-Taline-1 (C45F1) et anti- β -actine ont été achetés du Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Le collagène a été acheté de Chrono-Log Corp. (Havertown, PA). L' α -thrombine, le fibrinogène, le BAY 11-7082 (inhibiteur d'IKK) et le MG132 (inhibiteur de protéasome) ont été prises du Sigma-Aldrich (Oakville, Canada) et enfin, le sCD40L humain recombinant a été acheté de R&D Systems (Minneapolis, MN).

5.4.2 Préparation des plaquettes humaines

Le sang veineux a été prélevé des volontaires sains, de l'un ou l'autre sexe, qui n'ont pas pris des médicaments interférant avec les plaquettes depuis au moins 3 semaines du début de l'expérience. Tous les donneurs de sang ont fourni un consentement éclairé et écrit et qui est conforme au protocole approuvé par le Comité d'éthique humaine de l'Institut de Cardiologie de Montréal dans le cadre de la Déclaration d'Helsinki (**Annexe I**). Les plaquettes lavées ont été préparées comme décrit précédemment [170,171]. En bref, le plasma riche en plaquettes (PRP) a été obtenu par centrifugation du sang total anti-coagulé par l'acide citrate-dextrose. Les plaquettes ont été ensuite isolées du PRP puis traitées avec 1 μ g/mL de prostaglandine E₁, lavées avec le tampon citrate de sodium HBSS-Hank et finalement remises en suspension dans du tampon HBSS-Hank contenant 2 mmol/l de MgCl₂ et 2 mmol/l de CaCl₂. Les plaquettes ont été laissées au repos à 37° C pendant au moins 30 minutes avant chaque manipulation.

5.4.3 Immunobuvardage de type *western*

Pour évaluer les niveaux protéiques de phospho-I κ B α , I κ B α , phospho-p38 MAPK, p38 MAPK, β -actine et Taline-1, les plaquettes (10⁹/mL) ont été préparées comme indiqué auparavant puis lysées immédiatement en ajoutant 1/4 du volume de tampon de charge SDS-PAGE (4X) contenant 5% de β -mercaptoéthanol. Tous les échantillons ont été bouillis pendant 5 minutes. Les lysats des protéines ont été séparés par des gels de SDS-PAGE 6% (pour Taline-1) ou 10% (pour phospho-I κ B α , I κ B α et phospho-p38 MAPK) et puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été bloquées avec du lait en poudre écrémé de 5% pendant

1 heure puis lavées 3 fois avec du TBS-Tween (NaCl 150 mmol/l, Tris 20 mmol/l, pH 7,4, Tween–20 de 0,1%), et incubées par la suite avec la concentration recommandée d'anticorps primaires pendant une nuit à 4° C selon le protocole fourni. Le jour suivant, les membranes ont été lavées puis marquées par un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de « *horseradish* » pendant 1 heure, et puis lavées de nouveau. L'activité de la peroxydase a été détectée par la technique de la chimioluminescence améliorée (PerkinElmer Life Sciences, Hopkinton, MA). Toutes les membranes ont été lavées, bloquées avec du lait 5% et incubées en présence d'un anticorps primaire contre la β -actine (témoin de charge pour l'IkBa, le phospho-IkBa et la Taline-1) ou la p38 MAPK totale (contrôle de charge pour la phospho-p38 MAPK). La densité optique (OD) a été calculée à l'aide du logiciel ImageJ 1.52a. Pour l'IkBa, le phospho-IkBa et la phospho-p38 MAPK ; l'OD a été étudiée par rapport au contrôle de chargement correspondant. Cependant, pour la Taline-1, le clivage a été quantifié par l'OD du rapport (= bande de 190 kDa normalisée à l'actine / bande de 235 kDa normalisée à l'actine) normalisé par rapport au témoin expérimental.

5.4.4 Mesure de l'agrégation plaquettaire

Les plaquettes humaines isolées et lavées ont été préparées à une concentration de 250×10^6 /ml. L'agrégation a été effectuée dans un agrégomètre optique à 4 canaux (Chrono-Log Corp., Havertown, PA) sous cisaillement (1000 rpm) à 37° C. Les plaquettes en suspension ont été prétraitées avec des inhibiteurs pendant 10 minutes. Pour les études d'agrégation seulement, les plaquettes ont été stimulées avec des doses appropriées (sous-optimales ou maximales) de collagène ou de thrombine indiquées dans les légendes des figures. Pour les études de potentialisation de l'agrégation (l'amorçage plaquettaire), les plaquettes ont été traitées par sCD40L (1 ug/ml) pendant 30 minutes à 37° C [172,173]. L'agrégation a été ensuite déclenchée en utilisant des doses sous-optimales d'agonistes, qui n'induisent pas une agrégation supérieure à 30%. À noter que ces doses ont été sélectionnées avant chaque expérience à partir de la courbe dose-agrégation plaquettaire en réponse à une gamme d'agonistes (**Annexe II**), comme décrit précédemment [170–173]. Le pourcentage d'agrégation a été enregistré au moment de la stabilisation de l'agrégation plaquettaire (environ 8 minutes après l'ajout de l'agoniste).

5.4.5 Essai de rétraction du caillot fibrino-plaquettaire

Par de légères modifications des protocoles précédents [85,248], les plaquettes lavées ont été isolées à une concentration de 150×10^6 /ml et remises en suspension dans du tampon contenant 10 mM d'Hepes, 140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 0,5 mM de MgCl₂, 5 mM de NaHCO₃, 10 mM de glucose et 7,4 de pH. Du CaCl₂, à une concentration finale 1 mM, a été ajouté extemporanément. Des cuvettes en verre pour l'agrégation plaquettaire ont été utilisées pour ce test. Un coussin de polyacrylamide de 10 % (p/v) a été appliqué en couches au fond des cuvettes pour éviter l'adhérence du caillot. Après la polymérisation du coussin, les cuvettes ont été soigneusement rincées avec de l'eau distillée. Les plaquettes lavées et remises en suspension ont été distribuées dans les cuvettes en aliquotes de 500 ul auxquelles du fibrinogène d'une concentration finale de 500 ug/ml, a été ajouté. Suite à cette manipulation réalisée à 37° C, la formation et la rétraction des caillots ont été initiées par pipetage de 0,025 U/ml de thrombine. La réaction a été développée à la température ambiante et surveillée pendant 45 min. Les photos des caillots rétractés ont été prises à l'aide d'un appareil photo numérique. La quantification de la rétraction a été réalisée par évaluation de la zone du caillot à l'aide du logiciel ImageJ 1.52a. Les données ont été traitées en utilisant GraphPad Prism 5.03 et exprimées en pourcentage de rétraction = $[(\text{aire plaquettaire } t_0 - \text{aire plaquettaire } t) / \text{aire plaquettaire } t_0] \times 100$.

5.4.6 Analyses statistiques

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide de GraphPad Prism 5.03. Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm SEM. Les comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le test d'ANOVA à une ou à deux voies suivies d'un test de Bonferroni pour les comparaisons avec un seul groupe. Chaque expérience (n) représente les données obtenues d'un donneur de sang. Les tests statistiques spécifiques utilisés, la moyenne des données, le nombre (n) d'expériences et les valeurs *P* sont indiqués dans les légendes des figures. Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

5.5 Résultats

5.5.1 Le sCD40L induit la dégradation du phospho-I κ B α plaquettaire

Nous avons montré qu'une pré-incubation de 30 min des plaquettes avec le sCD40L potentialise significativement leur agrégation en réponse à des doses sous-optimales d'agonistes plaquettaires comme le collagène et la thrombine [172]. Nous avons attribué cet effet d'amorçage plaquettaire à deux voies de signalisation, la p38 MAPK [170] et le NF- κ B [171]. Récemment, nous avons montré que l'activation du NF- κ B, évaluée par la phosphorylation de P65 et d'I κ B α en réponse à sCD40L, résulte exclusivement de l'activation du récepteur CD40 [172] et ne sera pas affectée par l'agent antiplaquettaire standard, l'aspirine (ASA) [173]. Les hétérodimères du NF- κ B sont inactivés par les sous-unités inhibitrices I κ B (α et β), l'I κ B α étant la plus abondante [327]. Suite à des signaux inflammatoires, la kinase d'I κ B (IKK) phosphoryle l'I κ B α au niveau des résidus sérines 33 et 36, provoquant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome et conduisant finalement à l'activation du NF- κ B [330]. Puisque le NF- κ B joue un rôle non génomique dans les plaquettes [164], nous avons opté dans ce projet pour évaluer son rôle potentiel dans l'amorçage plaquettaire. Ici, la surveillance temporelle de l'I κ B α lors du traitement avec le sCD40L ou la thrombine a montré que la phosphorylation de l'I κ B α atteint un pic significatif à 5 minutes, mais commence par la suite à diminuer jusqu'à atteindre des niveaux non significatifs à 30 minutes (**Figure 5.1-A**). Cette baisse est due à la dégradation des protéines et non à la déphosphorylation, comme indiqué avec les niveaux d'I κ B α totaux correspondants qui chutent également de manière significative à 30 minutes (**Figure 5.1-B**). Ces résultats pourraient expliquer la nécessité d'une période de 30 minutes, pour que le NF- κ B soit significativement activé, et donc pour que le sCD40L potentialise l'agrégation plaquettaire.

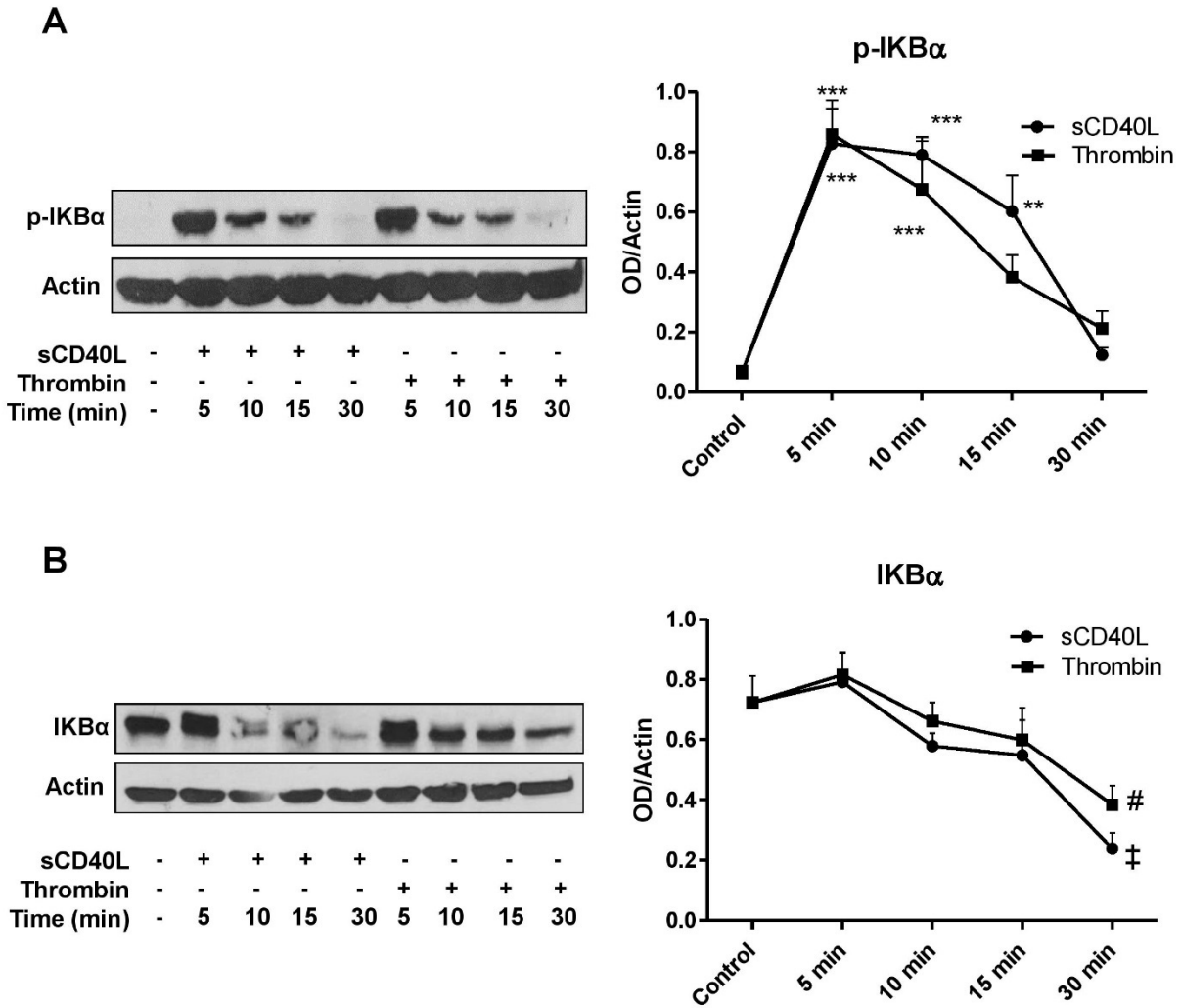


Figure 5.1 : La dégradation du phospho-IkB α et d'IkB α dans les plaquettes activées par la thrombine ou amorcées par le sCD40L. Les plaquettes humaines lavées (10^9 /ml) ont été amorcées par sCD40L (1 μ g/ml) ou activées par la thrombine (0,1 U/ml) pendant 5, 10, 15 et 30 minutes. Les lysats plaquettaires ont été séparés par SDS-PAGE 10% pour étudier l'expression de (A) p-IkB α et (B) IkB α total. Les transferts d'actine, utilisés comme contrôle de charge, proviennent des membranes dénudées utilisées pour les empreintes de p-IkB α et d'IkB α . Les courbes représentent la moyenne des données de transfert normalisées à l'actine et exprimées en densité optique (OD) ($n=5$, moyenne \pm SEM). *** $P<0,0001$ ** $P<0,001$ ‡ $P<0,0037$ # $P<0,05$ (vs. contrôle) (ANOVA à une voie suivie du test de post-comparaison de Bonferroni).

5.5.2 L'axe sCD40L/CD40/NF- κ B plaquettaire est régulé par l'IKK et le protéasome

Pour valider que le protéasome est responsable de la dégradation du p-I κ B α lors du traitement par sCD40L, nous avons prétraité les plaquettes avec du MG132 (0.1% (v/v) DMSO), le premier inhibiteur protéasomique utilisé pour étudier le système ubiquitine-protéasome (UPS) dans les cellules humaines [273,275,278,279]. Une dose de 10 μ M a entraîné une perte de la dégradation de p-I κ B α (**Figure 5.2-A**) et d'I κ B α totale (**Figure 5.2-B**) 30 minutes après l'incubation du sCD40L. La phosphorylation d'I κ B α en réponse au sCD40L était régulée par l'IKK, comme cela est évident avec l'utilisation du BAY 11-7082 (0.01% (v/v) DMSO), un inhibiteur de l'IKK [222,285] (**Figure 5.2-C**). Ces données montrent que l'axe sCD40L/CD40/NF- κ B dans les plaquettes est régulé par l'IKK et le protéasome, comme c'est le cas dans les cellules nucléées. Les effets du DMSO, utilisé pour solubiliser le MG132 et le BAY 11-7082, sur la dégradation d'I κ B α sont présentés en **Annexe III**.

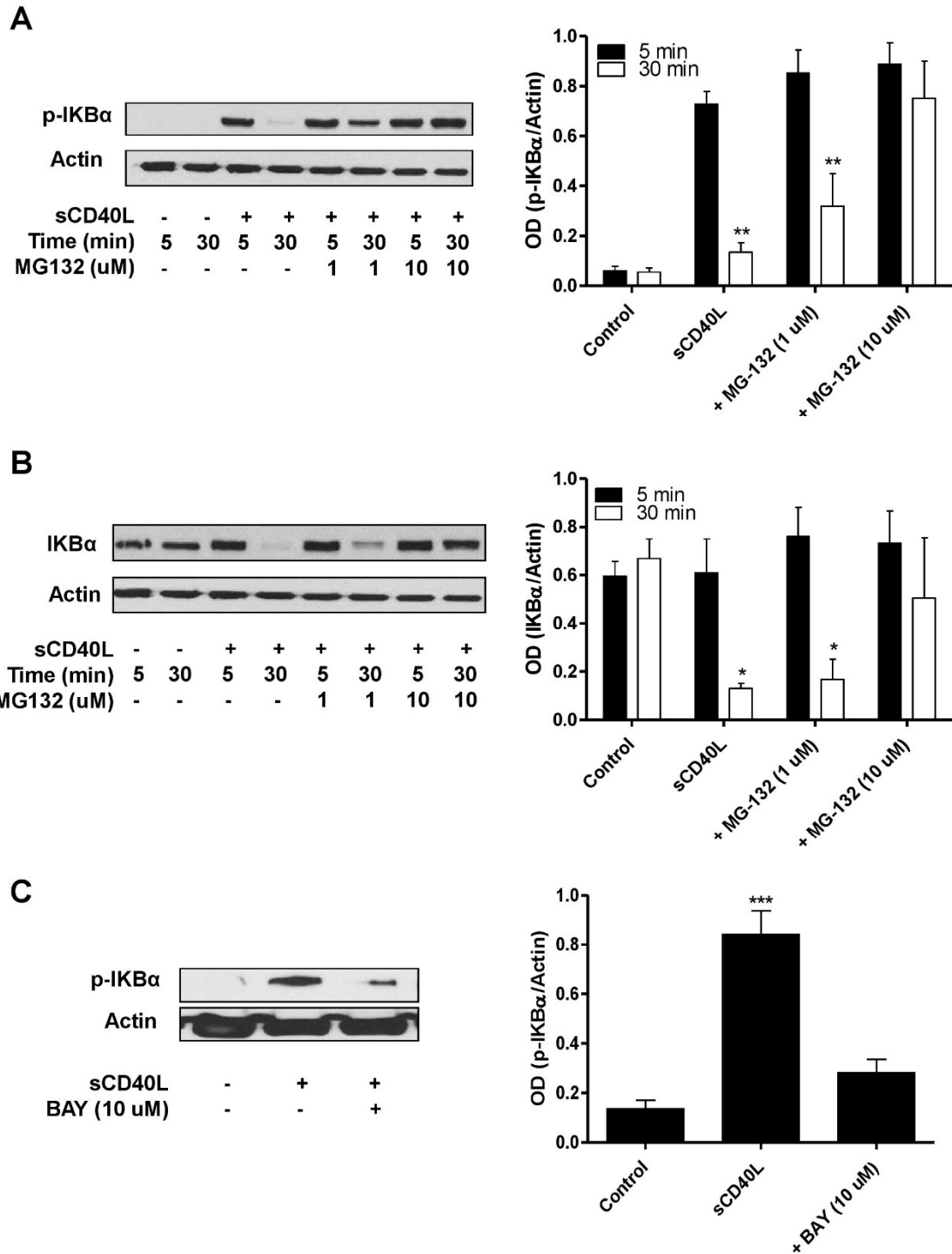


Figure 5.2 : Modulation de l'axe sCD40L/CD40/NF- κ B dans les plaquettes. Les plaquettes humaines lavées (10^9 /ml) ont été prétraitées avec (A, B) MG132 (1 ou 10 μ M ; 0.1% (v/v) DMSO) puis amorcées par le sCD40L (1 μ g/ml) pendant 5 ou 30 minutes (n=4), ou prétraitées avec (C) BAY 11- 7082 (10 μ M ; 0.01% (v/v) DMSO) puis amorcées par sCD40L (1 μ g/ml) pendant 5 minutes (n=5). Les lysats plaquettaire ont été séparés par SDS-PAGE 10% pour étudier l'expression de p-IkB α et d'IkB α comme indiqué ci-dessus. Les transferts d'actine, utilisés comme contrôle de charge, proviennent des membranes dénudées utilisées pour les empreintes de p-IkB α et d'IkB α . Les histogrammes représentent la moyenne des données

de transfert normalisées à l'actine et exprimées en OD (moyenne \pm SEM). **P<0,001 *P<0,01 (vs. 5 min) (ANOVA à deux voies) ***P<0,0001 (vs. contrôle) (ANOVA à une voie suivie du test de post-comparaison de Bonferroni).

5.5.3 L'activation de la p38 MAPK et le clivage protéasomique de la Taline-1, induits par sCD40L, ne sont pas régulés par NF- κ B

L'axe sCD40L/CD40/p38 MAPK est un amorceur des fonctions plaquettares [170]. Auparavant, nous avons montré en utilisant le BAY 11-7082 et l'inhibiteur de p38 MAPK (SB203580), que les voies NF- κ B et p38 MAPK fonctionnent indépendamment. Ici, nous validons ces données en inhibant le protéasome (**Figure 5.3-A**). De plus, comme il a été démontré que le NF- κ B régule les activités protéasomiques augmentées par le collagène, y compris le clivage des protéines du cytosquelette impliquées dans la dynamique de l'actine plaquettaire comme la Taline-1 [294,319], nous avons évalué si le sCD40L peut d'une façon similaire induire le clivage de Taline-1 *via* l'activation du NF- κ B. Par rapport aux conditions basales, le sCD40L a augmenté significativement et d'environ 6 fois et à un taux similaire au collagène (témoin positif), le clivage protéasomique de la sous-unité de Taline-1 de 235 kDa à 190 kDa. De l'autre côté, l'inhibition du NF- κ B par BAY 11-7082 (10 μ M) n'a pas diminué significativement le clivage protéasomique de Taline-1, augmenté par sCD40L (**Figure 5.3-B**). Cela signifie que l'interaction entre le protéasome et le NF- κ B est unilatérale, puisque le protéasome régule le NF- κ B mais pas l'inverse.

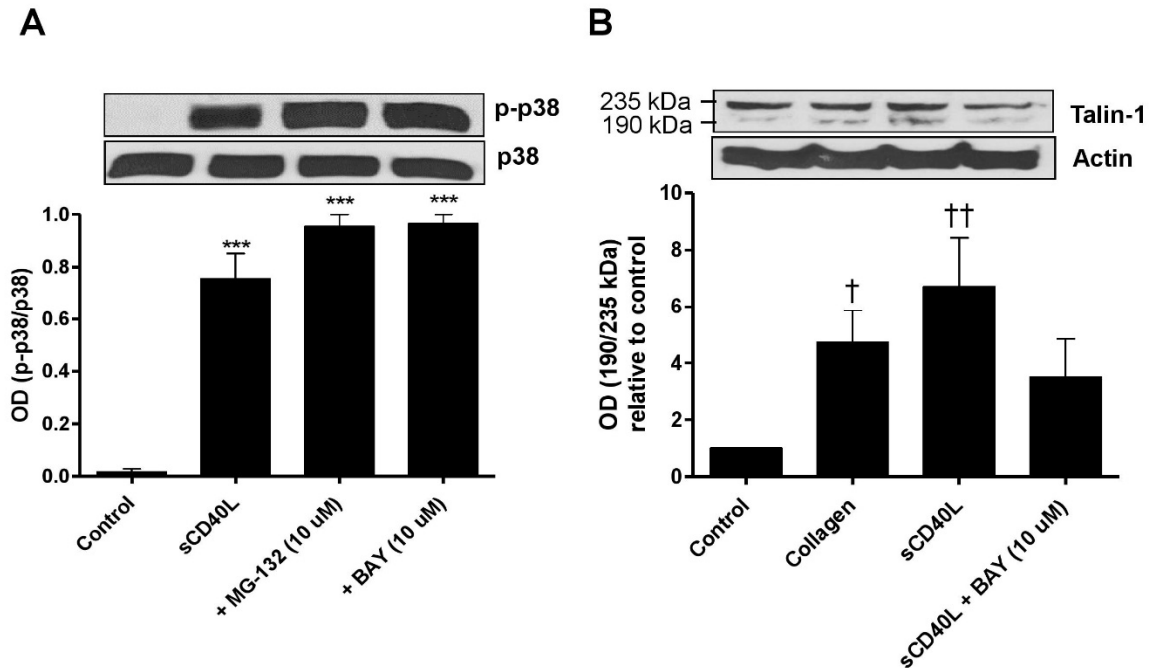


Figure 5.3 : Influence de l'axe sCD40L/NF- κ B sur la signalisation fonctionnelle des plaquettes. Les plaquettes humaines lavées (10^9 /ml) ont été prétraitées avec le MG132 (10 uM) ou le BAY 11-7082 (10 uM), puis amorcées par le sCD40L (1 ug/ml) ou activées par le collagène (1 ug/ml). **(A)** Effet de l'axe sCD40L/NF- κ B sur la signalisation de p38 MAPK (n=3). **(B)** Effet de l'axe sCD40L/NF- κ B sur le protéasome; le collagène a été utilisé comme contrôle positif pour l'induction du clivage protéasomique de Taline-1 (n=5). Les lysats plaquettaire ont été séparés par SDS-PAGE 10% et étudiés pour l'expression du p-p38 ou de Taline-1 comme indiqué ci-dessus. Les transferts de p38 et de l'actine (contrôles de charge), proviennent des membranes dénudées utilisées respectivement pour les empreintes de p-p38 et de Taline-1. Les histogrammes représentent la moyenne des données de transfert normalisées à l'actine et exprimées en OD, et le clivage de Taline-1 a été quantifié par OD du rapport (= bande de 190 kDa normalisée à l'actine / bande de 235 kDa normalisée à l'actine) normalisé par rapport au contrôle (moyenne \pm SEM). ***P<0,0001 ††P<0,00327 †P<0,0327 (vs. contrôle) (ANOVA à une voie suivie du test de post-comparaison de Bonferroni).

5.5.4 L'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome potentialise l'agrégation plaquettaire

Nous avons déjà montré que la répression de l'IKK *via* le BAY 11-7082 diminue la potentialisation de l'agrégation plaquettaire induite par le sCD40L en présence des doses sous-optimales de collagène [171] et de thrombine [172]. Cependant, comme l'IKK peut activer la sécrétion cellulaire/plaquettaire indépendamment du NF- κ B [245,331], et étant donné que l'effet des inhibiteurs du protéasome est plus important que celui des inhibiteurs d'IKK dans l'atténuation des fonctions de NF- κ B [285], nous avons décidé de valider le rôle de NF- κ B dans l'agrégation/amorçage plaquettaire *via* l'antagonisme du protéasome. Principalement, nous avons étudié ici l'effet du MG132 sur l'agrégation plaquettaire après avoir validé que le DMSO, véhicule utilisé pour solubiliser le MG132, n'a pas d'effet sur l'agrégation plaquettaire (**Annexe III**) dans ses concentrations utilisées. En effet, l'inhibition du protéasome n'a eu aucun effet sur l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine (**Figure 5.4-A**) ou le collagène (**Figure 5.4-B**) à des fortes doses (0,1 U/ml et 4,8 ug/ml respectivement), même à une concentration de 25 uM de MG132. Ensuite, nous avons évalué l'effet de l'inhibition du protéasome sur la potentialisation de l'agrégation plaquettaire induite par le sCD40L. En réponse à de faibles doses de thrombine (0,036 U/ml), le MG132 a entraîné une perte significative de l'effet d'amorçage plaquettaire du sCD40L (**Figure 5.4-C**). De même, en réponse à des doses sous-optimales de collagène (0,7 ug/ml), le MG132 a diminué de manière significative les effets d'amorçage plaquettaire du sCD40L (**Figure 5.4-D**). Dans l'ensemble, la somme de ces nouveaux résultats avec nos résultats précédents montrant la même réduction de la potentialisation de l'agrégation plaquettaire avec le BAY 11-7082 confirme que le sCD40L potentialise l'agrégation plaquettaire par l'activation du NF- κ B et probablement par d'autres fonctions de protéasome indépendantes de NF- κ B.

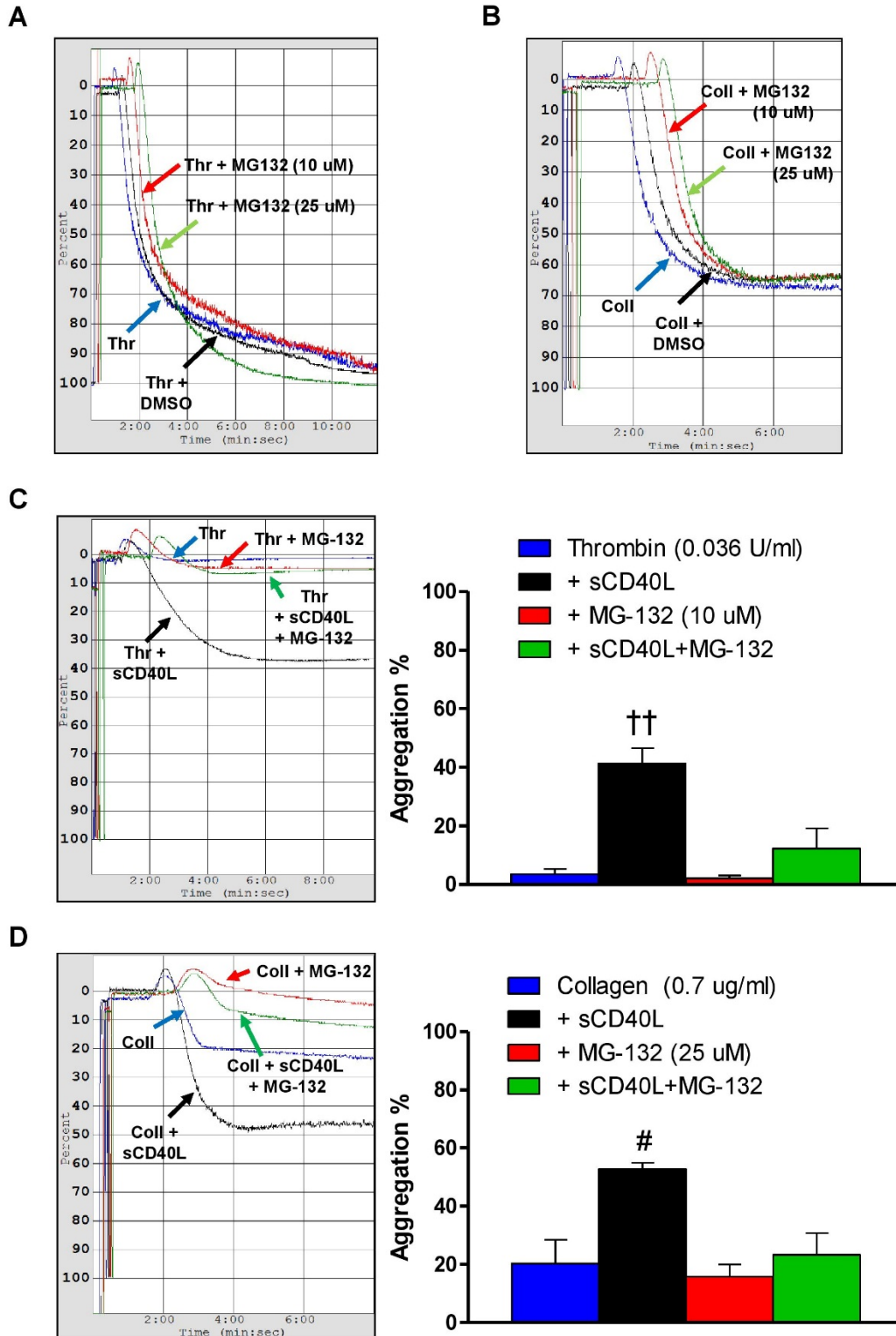


Figure 5.4 : L'inhibition du protéasome réduit la potentialisation de l'agrégation plaquettaire induite par sCD40L. Les plaquettes humaines lavées ($250 \times 10^6/\text{ml}$) ont été prétraitées avec du MG-132 ou du DMSO (0,1% v/v) pendant 10 min puis contrôlées soit pour l'agrégation plaquettaire induite par (A) la

thrombine (0,1 U/ml) ou **(B)** le collagène (4,8 ug/ml), ou pour l'agrégation plaquettaire potentialisée par 30 minutes de prétraitement avec le sCD40L (1 ug/ml) et déclenchée par **(C)** la thrombine (0,036 U/ml) ou **(D)** le collagène (0,7 ug/ml). Les histogrammes représentent la moyenne du pourcentage d'agrégation ($n > 4$, moyenne \pm SEM) obtenue à partir des courbes d'agrégation correspondantes semblables à celles présentées en C et D. †† $P < 0,002$ # $P < 0,04$ (vs. autres groupes) (ANOVA à une voie suivie du test de post-comparaison de Bonferroni).

5.5.5 L'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome augmente la rétraction du caillot fibrino-plaquettaire

La thrombine convertit le fibrinogène en fibrine qui interagit avec le cytosquelette plaquettaire *via* l'intégrine α IIb β 3. Cette interaction physiologique produit une force de contraction dans le maillage de la fibrine, induisant une rétraction du caillot fibrine-plaquettes pour rapprocher les bords de la brèche vasculaire [84,85]. Puisque le sCD40L exacerbe l'activation et l'agrégation plaquettaires, nous avons proposé l'hypothèse ici que le sCD40L peut agir de la même manière lors de la rétraction du caillot et ainsi surveiller le processus pendant 45 minutes. En effet, le sCD40L a augmenté la rétraction du caillot de fibrine-plaquettes en présence des doses sous-optimales de thrombine (0,025 U/ml) d'environ 2 fois par rapport à la thrombine seule. Cet effet d'amorçage impliquait le couple NF- κ B/protéasome, puisque le prétraitement avec le MG132 (10 uM) ou le BAY 11-7082 (10 uM) a entravé considérablement la rétraction du caillot (**Figure 5.5**).

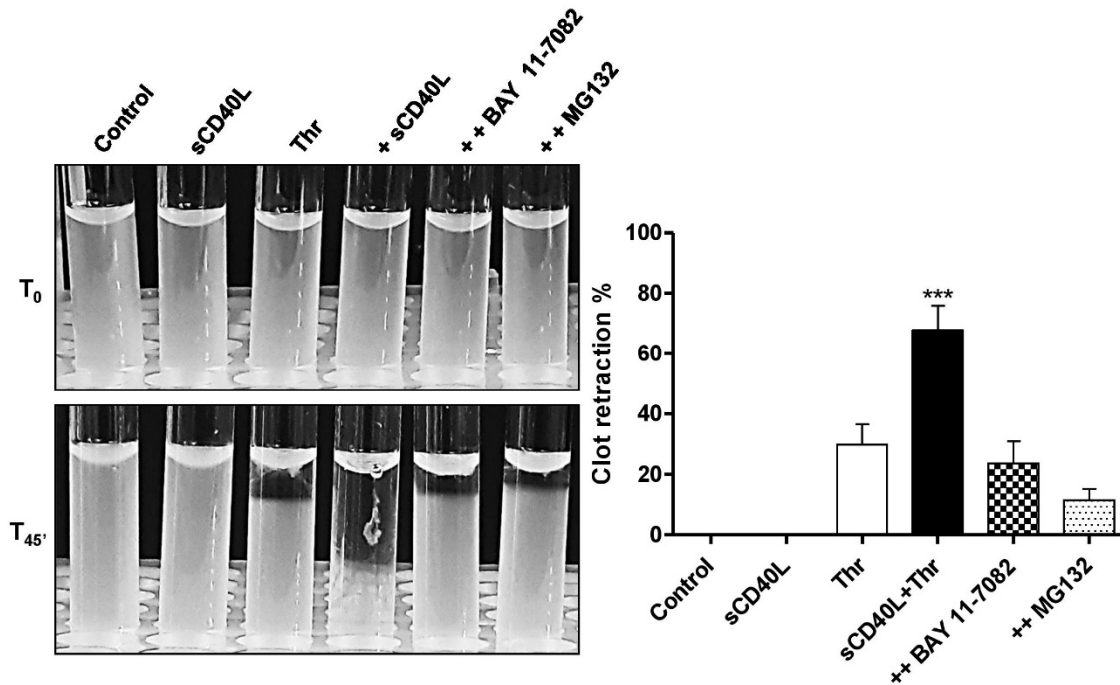


Figure 5.5 : L'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome augmente la rétraction du caillot fibrino-plaquettaire. Les plaquettes humaines lavées ($150 \times 10^6/\text{ml}$), auxquelles 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fibrinogène ont été ajoutés, ont été prétraitées pendant 15 min avec le BAY 11-7082 (10 μM) ou le MG 132 (10 μM) puis stimulées avec du sCD40L (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pendant 30 min. La formation de caillots fibrine-plaquettes a été induite par la thrombine (0,025 U/ml). Ensuite, la rétraction du caillot fibrine-plaquettes a été surveillée pendant 45 min. L'histogramme est représentatif de la moyenne du % de rétraction du caillot obtenu par $([\text{zone de caillot } t_0 - \text{zone de caillot } t] / \text{zone de caillot } t_0] \times 100)$ ($n=5$, moyenne \pm SEM). *** $P < 0,0001$ (vs autres groupes) (ANOVA à une voie suivie du test de post-comparaison de Bonferroni).

5.6 Discussion

Des taux plasmatiques élevés d'amorceurs plaquettaire prédisent des événements thromboemboliques [165,180]. Nous avons montré que le sCD40L est un amorceur plaquettaire qui potentialise l'agrégation plaquettaire en présence des doses sous-optimales de stimuli physiologiques [170]. Du point de vue moléculaire, cette capacité coïncide avec l'induction de la libération granulaire et du changement de la forme plaquettaire, mais pas avec l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ni avec l'influx de Ca^{2+} [170], des éléments essentiels de l'activation plaquettaire [332]. De plus, l'agrégation plaquettaire potentialisée par le sCD40L entraîne l'activation de deux voies distinctes, la p38 MAPK et le NF- κ B [171]. En effet, bien que les plaquettes soient dépourvues de génome, plusieurs chercheurs ont corroboré la

présence du facteur de transcription NF- κ B dans les plaquettes par différentes techniques (western blot, immunofluorescence, test de l'activité du NF- κ B et IKK β « *knock-out* » souris) et ont par la suite montré son implication dans la signalisation et les fonctions plaquettaires [171,172,218,221,222,235,244,245,328,329]. En termes de l'axe CD40/CD40L plaquettaire, bien que le sCD40L interagisse avec plusieurs récepteurs plaquettaires comme l' α 5 β 1, l' α IIb β 3 et le CD40, nous avons démontré, en évaluant la phosphorylation de P65 et d'I κ B α , que le sCD40L active le NF- κ B uniquement *via* le récepteur CD40 [172]. Dans les cellules nucléées, le rôle de NF- κ B sur le génome et son implication dans les maladies thrombo-inflammatoires sont bien établis. Cependant, le NF- κ B semble agir dans les plaquettes, indépendamment du génome, d'une manière moins comprise, révélée principalement par l'inhibition de l'IKK qui active le NF- κ B par phosphorylation de sa molécule inhibitrice régulatrice (I κ B α) [164,248]. Par exemple, l'inhibition de NF- κ B dans les plaquettes humaines lavées stimulées par l'agoniste plaquettaire le plus puissant, la thrombine, en utilisant un inhibiteur d'IKK, le BAY 11-7082, affecte uniquement le changement de forme des plaquettes [218] et la sécrétion et l'agrégation plaquettaires [222]. Le prétraitement avec du BAY 11-7082 réduit également l'agrégation, stimulé par le collagène, des plaquettes humaines lavées [328] ou des plaquettes dans le PRP humain [222,319]. Dans la présente étude, nous avons utilisé des plaquettes humaines lavées pour étudier le rôle de NF- κ B dans l'amorçage des plaquettes par le sCD40L *via* l'antagonisme de l'IKK et l'inhibition du protéasome. Le protéasome est une machinerie protéolytique cytosolique responsable d'une pléthore de rôles de signalisation et de fonctions distinctes, comme la dégradation de la forme phosphorylée de la sous-unité régulatrice I κ B α et donc l'activation de NF- κ B [211,286,327]. De plus, les inhibiteurs du protéasome ont un effet plus important que celui des inhibiteurs de l'IKK [285], ces derniers ayant des effets indépendants de NF- κ B dans les plaquettes [248].

Parmi les membres de la famille NF- κ B, l'I κ B α est le plus convenable pour surveiller l'activation différentielle de NF- κ B [218,219]. Nous avons montré par nos expériences présentées ci-dessus qu'un délai de 30 minutes est nécessaire pour une dégradation significative du phospho-I κ B α lors de l'amorçage ou l'activation des plaquettes. Pour éliminer la possibilité de déphosphorylation, nous avons démontré que la fraction totale de l'I κ B α diminue au même rythme que celui du phospho-I κ B α pendant 30 minutes. En revanche, Spinelli et ses collègues [218] ont

montré que les plaquettes humaines régulent positivement leur I κ B α totale lors de la stimulation avec un agoniste. Ces contradictions ne peuvent être justifiées que par la différence des sources des anticorps utilisés, d'autant plus que deux autres études valident nos résultats [220,328]. Il faut noter aussi que cette période de temps nécessaire pour une activation significative de NF- κ B se confond avec la période de pré-incubation décrite par notre équipe, suite à laquelle le sCD40L potentialise significativement l'agrégation plaquettaire stimulée par de faibles doses de collagène ou de thrombine [172]. Nous avons également constaté que, de la même manière que dans les plaquettes stimulées par des agonistes [220,319,333], la dégradation du phospho-I κ B α dans les plaquettes amorcées par sCD40L est médiée par le protéasome et régulée par l'IKK, comme démontré avec l'utilisation, respectivement, d'un inhibiteur de protéasome, le MG132, et d'un inhibiteur de l'IKK, le BAY 11-7082.

Au niveau de la signalisation plaquettaire, nous avons évalué les effets de l'inhibition du NF- κ B sur l'activation des isoformes de p38 MAPK par sCD40L. En effet, les quatre isoformes de p38 MAPK se trouvent dans les plaquettes, alpha et bêta étant les plus abondantes [334], et régulent l'amorçage plaquettaire par sCD40L en induisant un changement de forme et une sécrétion plaquettaires [170]. En utilisant le BAY 11-7082, notre équipe a précédemment montré que le /NF- κ B fonctionne indépendamment de /p38 MAPK [171]. Ici, nous validons ces données *via* l'inhibition du protéasome. Outre l'induction de la dégradation du phospho-I κ B α , nous montrons que le sCD40L améliore d'autres fonctions du protéasome comme le clivage de Taline-1, une protéine adaptatrice impliquée dans la dynamique de changement de la forme plaquettaire [294,310]. Grundler et ses collègues [319] ont également démontré que le collagène augmente le clivage de Taline-1 par le protéasome. Ils ont montré aussi que le NF- κ B régule le clivage de Taline-1 comme un mécanisme de « *negative feedback* » dans les plaquettes stimulées par le collagène [319]. Cependant, nos données montrent que dans les plaquettes stimulées par sCD40L, le NF- κ B régule de manière insignifiante le clivage de Taline-1. Ces résultats contradictoires peuvent être liés à la différence des concentrations de BAY 11-7082 utilisées dans leur étude (25 μ M) et la nôtre (10 μ M). À noter que des études menées par nous et par autres confirment qu'une concentration d'environ 10 μ M de BAY 11-7082 permet d'assurer complètement son rôle dans les plaquettes [172,221,245,328,335]. Il convient de noter que le

clivage de la Taline-1 dans l'état de base peut être expliqué par le fait que le protéasome plaquettaire est constitutivement actif et que la stimulation plaquettaire ne fait qu'augmenter l'activité du protéasome [284,294]. Le même clivage de la Taline-1 de base en réponse au collagène peut être observé ailleurs [319,333]. Il convient de noter également que les niveaux de la sous-unité de 235 kDa n'ont pas montré une diminution significative entre les conditions expérimentales, par rapport à l'augmentation indiquée dans les niveaux de la sous-unité de 190 kDa. De la même manière, les résultats de Grundler et ses collègues [333] ne montre aucune diminution de la sous-unité 235 kDa contrairement à une augmentation de la sous-unité 190 kDa. Cela peut s'expliquer par le temps d'incubation du stimulus utilisé (≈ 10 min), qui n'entraîne pas de changements détectables dans la sous-unité de 235 kDa, contrairement à la sous-unité de 190 kDa, selon une étude montrant le clivage de Taline-1 avec le temps en réponse à la thrombine [336]. En effet, les auteurs montrent que le clivage de la Taline-1 est dépendant du temps, et que l'incubation plaquettaire avec de la thrombine pendant moins de 15 minutes n'induit pas de changements détectables dans la sous-unité 235 kDa, contrairement à la sous-unité clivée 190 kDa [336].

Plusieurs études ont attribué au protéasome un rôle dans l'agrégation plaquettaire, montrant qu'il fonctionne en parallèle mais pas en amont des cascades de signalisation de l'activation plaquettaire [284,315,319,320,328]. Nous validons ces données en montrant que l'inhibition du protéasome par le MG132 n'affecte pas l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine ou le collagène. Nous ajoutons en outre un aperçu du rôle du protéasome dans l'amorçage des plaquettes par le sCD40L. Nous y montrons que le protéasome régule la potentialisation de l'agrégation plaquettaire en présence de faibles doses de thrombine ou de collagène. Cet effet est principalement assuré *via* l'activation de NF- κ B. Ceci est démontré par l'utilisation de MG132 dans notre étude actuelle et de BAY 11-7082 dans nos études précédentes [171,172]. Un mécanisme d'action suggéré qui explique comment le NF- κ B potentialise l'agrégation plaquettaire sans agir sur le génome est l'induction de l'assemblage du complexe protéique SNARE qui initie la sécrétion de granules plaquettaires [66,69,337–339]. Cela pourrait être démontré par nos données montrant que l'activation du NF- κ B par sCD40L augmente la sécrétion de granules plaquettaires [170,171], ou par les données de Karim et ses collègues [245,248] démontrant que l'inhibition du NF- κ B empêche l'assemblage du complexe SNARE

induit par la thrombine. Un autre mécanisme d'action possible est que le NF- κ B pourrait moduler la synthèse *de novo* des protéines en interagissant avec les microARN plaquettaires [164,253]. Dans tous les cas, la signalisation du NF- κ B plaquettaire activé reste insuffisamment expliquée. Par conséquent, des tests de validation supplémentaires sont nécessaires pour résoudre ce problème. Il est également nécessaire de noter une limitation de l'étude qu'à ce jour, le NF- κ B ne peut être étudié qu'en surveillant les événements de signalisation indirects liés au NF- κ B (par exemple la phosphorylation et/ou la dégradation des sous-unités de NF- κ B) et en utilisant simultanément les inhibiteurs d'IKK ou du protéasome. Malheureusement, les modèles transgéniques ne sont pas disponibles car le « *knock-out* » de NF- κ B est embryonnairement létal pour la plupart de ses gènes. Dans ce contexte, bien que nos données suggèrent que le NF- κ B pourrait réguler l'amorçage plaquettaire, il existe toujours une possibilité que l'utilisation d'antagonistes pharmacologiques puisse entraîner des effets secondaires potentiels inconnus. Remarquable également, d'autres mécanismes liés au protéasome et qui sont indépendants de NF- κ B pourraient être impliqués dans la potentialisation de l'agrégation plaquettaire tels que (i) l'activation des tyrosine kinases plaquettaires [321], (ii) l'atténuation de la signalisation plaquettaire négative [315] et (iii) l'amélioration du clivage des microparticules et de l'adhésion plaquettaire [294].

Comme l'agrégation plaquettaire, la rétraction du caillot est impliquée dans le maintien de l'hémostase *in vivo* [84]. Il a été démontré que l'inhibition de NF- κ B par MG132 [248,294] ou par des concentrations élevées de BAY 11-7082 [218] entrave la rétraction du caillot induite par la thrombine *via* des mécanismes mal expliqués tels que l'inhibition du changement de forme des plaquettes. Ici, nos résultats montrent que le prétraitement des plaquettes avec le sCD40L exacerbe la rétraction du caillot en réponse à la thrombine *in vitro*. Fait intéressant, l'inhibition de NF- κ B par le MG132 ou le BAY 11-7082 réduit cet effet, démontrant que l'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome module encore une autre fonction plaquettaire *via*, probablement, l'induction du changement de forme des plaquettes [170] ou d'autres mécanismes moléculaires qui nécessitent des investigations supplémentaires. La **Figure 5.6** récapitule nos données générées jusqu'à présent sur le rôle de l'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome dans les fonctions plaquettaires.

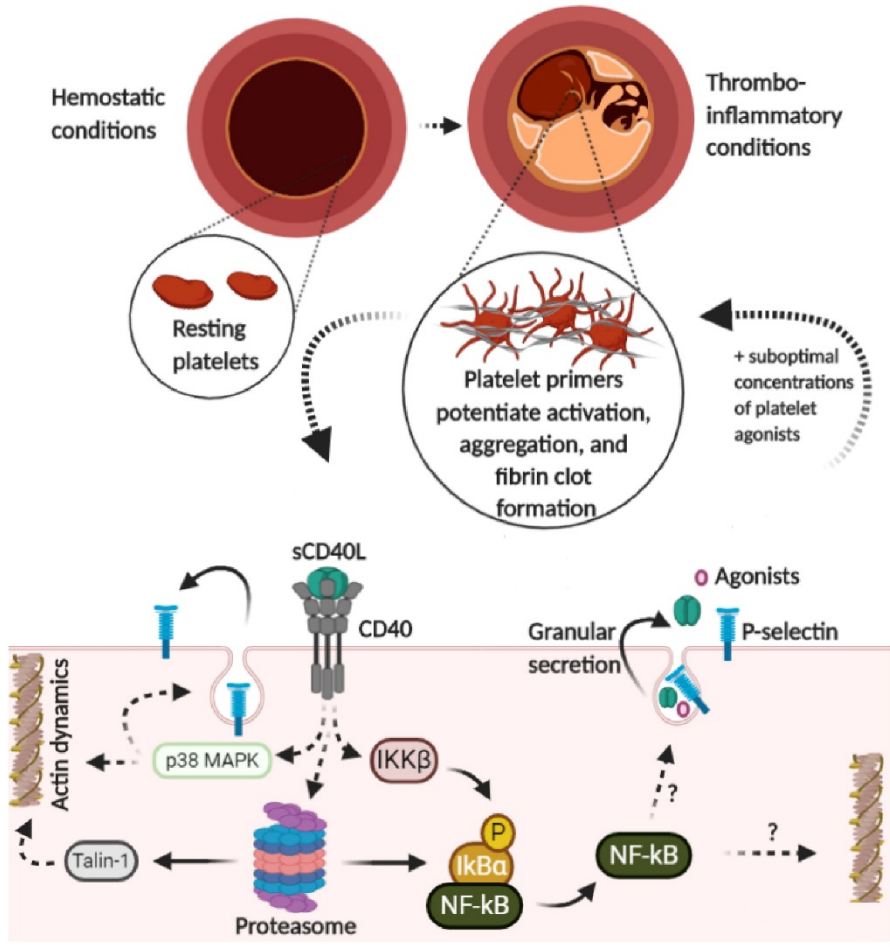


Figure 5.6 : L'axe sCD40L/NF-κB/protéasome est un amorceur plaquettaire. Dans les conditions basales, les plaquettes se trouvent au repos. Dans les conditions athérombrotiques, des niveaux élevés d'amorceurs plaquettaires, comme le sCD40L, sont détectés dans le plasma des patients. Le sCD40L, qui est principalement dérivé des plaquettes, active la voie NF-κB dans les plaquettes exclusivement *via* le récepteur CD40. La voie de NF-κB est régulée par l'IKK qui phosphoryle l'IκBα, induisant sa dégradation par le protéasome dans 30 minutes. Par conséquent, le NF-κB est libéré pour agir sans affecter le génome, probablement en induisant une sécrétion granulaire d'agonistes et d'amorceurs plaquettaires, ce qui conduit également à l'expression de la P-sélectine à la surface des plaquettes. En plus d'activer le NF-κB, le protéasome clive la Taline-1, qui joue un rôle dans le changement de forme des plaquettes. L'axe sCD40L/CD40/NF-κB/protéasome fonctionne indépendamment de l'axe sCD40L/CD40/p38 MAPK qui amorce également les plaquettes en régulant la dynamique de l'actine et en induisant l'expression de la P-sélectine. Dans l'ensemble, les effets d'amorçage de sCD40L, en combinaison avec de faibles doses d'agonistes plaquettaires, potentialisent l'activation et l'agrégation plaquettaires et augmentent la formation de caillots plaquettes-fibrine.

5.7 Conclusion

Le sCD40L est un amorceur plaquettaire aussi puissant que la thrombine pour induire la dégradation de p-I κ B et par conséquent l'activation de NF- κ B dans les plaquettes. La dégradation de p-I κ B est régulée par l'IKK et le protéasome, comme dans les cellules nucléées, et se produit pendant une période de 30 minutes après laquelle le sCD40L potentialise l'agrégation plaquettaire en réponse à des doses sous-optimales d'agonistes plaquettaires. Le sCD40L induit la phosphorylation du p38 MAPK et le clivage protéasomique de Talin-1 indépendamment de NF- κ B. Bien que l'inhibition de NF- κ B n'affecte pas l'agrégation plaquettaire, elle réduit la potentialisation de l'agrégation plaquettaire par le sCD40L en présence de faibles doses d'agonistes plaquettaires. Le NF- κ B est également responsable de l'exacerbation de la rétraction du caillot de fibrine par le sCD40L en présence de faibles doses de thrombine. Par conséquent, l'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome fonctionne indépendamment du génome dans les plaquettes en régulant, *via* des mécanismes encore peu clairs, l'amorçage plaquettaire. Le ciblage de cet axe représente donc une nouvelle cible thérapeutique dans les maladies thrombo-inflammatoires.

5.8 Directives Futures

Ce projet de recherche a identifié de nouveaux rôles pour le sCD40L dans la régulation des fonctions plaquettaires. En utilisant une approche pharmacologique, il a également mis en évidence l'implication de l'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome sans agir sur le génome plaquettaire au niveau de la potentialisation de l'agrégation plaquettaire et l'exacerbation de la rétraction du caillot de fibrine. Cependant, il est toujours important d'aborder les limites de notre étude en utilisant des approches non pharmacologiques afin de valider que les effets d'amorçage observés avec le sCD40L sont directement régulés par le NF- κ B.

Puisque notre équipe et d'autres avons montré que le sCD40L induit l'expression de surface de la P-sélectine contenue dans les granules des plaquettes [170,171,205,340], l'étude de la formation du complexe SNARE qui précède la sécrétion granulaire et qui se produit entre les protéines VAMP localisées sur les vésicules plaquettaires et les protéines SNAP/Syntaxine sur la membrane plaquettaire, pourrait (i) expliquer au niveau moléculaire comment le sCD40L induit la sécrétion granulaire et (ii) vérifier si le couple NF- κ B/protéasome est aussi impliqué dans ce

processus de sécrétion. Cela pourrait enfin déchiffrer les mécanismes par lesquels le sCD40L amorce les fonctions plaquettaires.

De plus, l'évaluation de l'interaction entre la P-sélectine plaquettaire induite par le sCD40L et le PSGL-1 exprimé sur les leucocytes [205] pourrait attribuer à l'axe NF- κ B/protéasome une autre fonction n'affectant pas le génome, soit les interactions plaquettes-leucocytes et ses conséquences amplificatrices des réactions thrombo-inflammatoires. Dans l'ensemble, ces recherches élargiront non seulement nos connaissances sur les fonctions de l'axe sCD40L/NF- κ B/protéasome sans impliquer le génome dans les plaquettes, mais aussi offriront de nouvelles cibles thérapeutiques chez les patients atteints de CAD dont les plaquettes ne répondent pas ou moins à la thérapie conventionnelle d'ASA.

Les futurs projets à explorer sont également de savoir si les plaquettes des patients atteints de CAD présentent une activation permanente de NF- κ B au départ en raison des niveaux élevés de sCD40L et si le ciblage de NF- κ B améliore leur réactivité aux agents antiplaquettaires tels que l'ASA.

Bibliographie

- [1] World Health Organization, Cardiovascular diseases, (2019). https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1 (accessed December 14, 2019).
- [2] Health Canada, Heart Disease in Canada - Canada.ca, (2013). <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/diseases-conditions/heart-disease-canada.html> (accessed December 14, 2019).
- [3] D. Nguyen, B.M. Coull, Thrombosis, in: *Prim. Cerebrovasc. Dis. Second Ed.*, Elsevier Inc., 2017: pp. 108–113. doi:10.1016/B978-0-12-803058-5.00021-7.
- [4] H. Schulze, R.A. Shivdasani, Mechanisms of thrombopoiesis, *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 1717–1724. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01426.x.
- [5] E. Yamada, The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen, *Cells Tissues Organs.* 29 (1957) 267–290. doi:10.1159/000141169.
- [6] J.N. George, Platelets, *Lancet.* 355 (2000) 1531–1539. doi:10.1016/S0140-6736(00)02175-9.
- [7] J.C. Zapata, D. Cox, M.S. Salvato, The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014) e2858. doi:10.1371/journal.pntd.0002858.
- [8] T.J. Kunicki, Platelet glycoprotein antigens and immune receptors., *Prog. Clin. Biol. Res.* 283 (1988) 87–123. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3062636> (accessed February 4, 2020).
- [9] A.D. Michelson, Platelets, Elsevier Inc., 2013. doi:10.1016/C2010-0-64795-X.
- [10] J.G. White, W.J. Conard, The fine structure of freeze-fractured blood platelets., *Am. J. Pathol.* 70 (1973) 45–56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1903921/pdf/amjpathol00257-0049.pdf> (accessed February 4, 2020).
- [11] J. Boyles, J.E.B. Fox, D.R. Phillips, P.E. Stenberg, Organization of the cytoskeleton in resting, discoid platelets: Preservation of actin filaments by a modified fixation that prevents osmium damage, *J. Cell Biol.* 101 (1985) 1463–1472. doi:10.1083/jcb.101.4.1463.
- [12] D.M. Kenney, R.W. Linck, The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: Structure and composition of the isolated marginal microtubular band, *J. Cell Sci.* 78 (1985) 1–22. <https://jcs.biologists.org/content/joces/78/1/1.full.pdf> (accessed February 4, 2020).
- [13] J.H. Hartwig, Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation, *J. Cell Biol.* 118 (1992) 1421–1441. doi:10.1083/jcb.118.6.1421.
- [14] J.E.B. Fox, Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelets. Identification of one of the glycoproteins as glycoprotein Ib, *J. Clin. Invest.* 76 (1985) 1673–1683. doi:10.1172/JCI112153.

- [15] J.L. Richardson, R.A. Shivdasani, C. Boers, J.H. Hartwig, J.E. Italiano, Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production, *Blood*. 106 (2005) 4066–4075. doi:10.1182/blood-2005-06-2206.
- [16] P. Handagama, R.M. Scarborough, M.A. Shuman, D.F. Bainton, Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet alpha-granules is mediated by alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa), *Blood*. 82 (1993) 135–8. doi:10.1182/blood.V82.1.135.bloodjournal821135.
- [17] G. Berger, J.M. Massé, E.M. Cramer, Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V, *Blood*. 87 (1996) 1385–1395. doi:10.1182/blood.v87.4.1385.bloodjournal8741385.
- [18] D.M. Maynard, H.F.G. Heijnen, M.K. Horne, J.G. White, W.A. Gahl, Proteomic analysis of platelet α -granules using mass spectrometry, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 1945–1955. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02690.x.
- [19] A. McNicol, S.J. Israels, Platelet dense granules: Structure, function and implications for haemostasis, *Thromb. Res.* 95 (1999) 1–18. doi:10.1016/S0049-3848(99)00015-8.
- [20] S.J. Israels, J.M. Gerrard, Y. V Jacques, A. McNicol, B. Cham, M. Nishibori, D.F. Bainton, Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140)., *Blood*. 80 (1992) 143–52. doi:10.1182/blood.V80.1.143.143.
- [21] T. Youssefian, J.M. Massé, F. Rendu, J. Guichard, E.M. Cramer, Platelet and megakaryocyte dense granules contain glycoproteins Ib and IIb-IIIa, *Blood*. 89 (1997) 4047–4057. doi:10.1182/blood.v89.11.4047.
- [22] R.C. Jin, B. Voetsch, J. Loscalzo, Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function, *Microcirculation*. 12 (2005) 247–258. doi:10.1080/10739680590925493.
- [23] D. Ribatti, E. Crivellato, Giulio Bizzozero and the discovery of platelets, *Leuk. Res.* 31 (2007) 1339–1341. doi:10.1016/j.leukres.2007.02.008.
- [24] B. Furie, B.C. Furie, Mechanisms of thrombus formation, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 938–949. doi:10.1056/NEJMra0801082.
- [25] P.S. Frenette, C. V. Denis, L. Weiss, K. Jurk, S. Subbarao, B. Kehrel, J.H. Hartwig, D. Vestweber, D.D. Wagner, P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 1413–1422. doi:10.1084/jem.191.8.1413.
- [26] P.S. Frenette, R.C. Johnson, R.O. Hynes, D.D. Wagner, Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: An interaction mediated by endothelial P-selectin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 7450–7454. doi:10.1073/pnas.92.16.7450.
- [27] R.K. Andrews, J.A. López, M.C. Berndt, Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (1997) 91–105. doi:10.1016/s1357-2725(96)00122-7.

- [28] G.M. Romo, J.F. Dong, A.J. Schade, E.E. Gardiner, G.S. Kansas, C.Q. Li, L. V. McIntire, M.C. Berndt, J.A. López, The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P- selectin, *J. Exp. Med.* 190 (1999) 803–813. doi:10.1084/jem.190.6.803.
- [29] B. Nieswandt, S.P. Watson, Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor?, *Blood.* 102 (2003) 449–461. doi:10.1182/blood-2002-12-3882.
- [30] M.H. Kroll, J.D. Hellums, L. V. McIntire, A.I. Schafer, J.L. Moake, Platelets and shear stress, *Blood.* 88 (1996) 1525–1541. doi:10.1182/blood.v88.5.1525.bloodjournal8851525.
- [31] R.W. Farndale, P.R.M. Siljander, D.J. Onley, P. Sundaresan, C.G. Knight, M.J. Barnes, Collagen-platelet interactions: Recognition and signalling, *Biochem. Soc. Symp.* (2003) 81–94. doi:10.1042/bss0700081.
- [32] C.A. Siedlecki, B.J. Lestini, K. Kottke-Marchant, S.J. Eppell, D.L. Wilson, R.E. Marchant, Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor, *Blood.* 88 (1996) 2939–2950. doi:10.1182/blood.v88.8.2939.bloodjournal8882939.
- [33] S. Miyata, S. Goto, A.B. Federici, J. Ware, Z.M. Ruggeri, Conformational changes in the A1 domain of von Willebrand factor modulating the interaction with platelet glycoprotein Iba, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 9046–9053. doi:10.1074/jbc.271.15.9046.
- [34] D. Varga-Szabo, I. Pleines, B. Nieswandt, Cell adhesion mechanisms in platelets., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) 403–12. doi:10.1161/ATVBAHA.107.150474.
- [35] K. Suzuki-Inoue, Y. Kato, O. Inoue, K.K. Mika, K. Mishima, Y. Yatomi, Y. Yamazaki, H. Narimatsu, Y. Ozaki, Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 25993–26001. doi:10.1074/jbc.M702327200.
- [36] J.M.E.M. Cosemans, R. Van Kruchten, S. Olieslagers, L.J. Schurgers, F.K. Verheyen, I.C.A. Munnix, J. Waltenberger, A. Angelillo-Scherrer, M.F. Hoylaerts, P. Carmeliet, J.W.M. Heemskerk, Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization, *J. Thromb. Haemost.* 8 (2010) 1797–1808. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03935.x.
- [37] X. Du, Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex, *Curr. Opin. Hematol.* 14 (2007) 262–269. doi:10.1097/MOH.0b013e3280dce51a.
- [38] S.P. Watson, J.M.J. Herbert, A.Y. Pollitt, GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity, *J. Thromb. Haemost.* 8 (2010) 1456–1467. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03875.x.
- [39] J.M. Freyssinet, F. Toti, Formation of procoagulant microparticles and properties, *Thromb. Res.* 125 (2010). doi:10.1016/j.thromres.2010.01.036.
- [40] O. Morel, N. Morel, J.M. Freyssinet, F. Toti, Platelet microparticles and vascular cells interactions: A checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses, *Platelets.*

- 19 (2008) 9–23. doi:10.1080/09537100701817232.
- [41] R. Bobe, R. Bredoux, E. Corvazier, C. Lacabaratz-Porret, V. Martin, T. Kovacs, J. Enouf, How many Ca²⁺ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets, *Platelets*. 16 (2005) 133–150. doi:10.1080/09537100400016847.
- [42] C.D. Nobes, A. Hall, Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell*. 81 (1995) 53–62. doi:10.1016/0092-8674(95)90370-4.
- [43] G. Pula, M. Krause, Role of Ena/VASP Proteins in Homeostasis and Disease, in: *Handb. Exp. Pharmacol.*, Springer, 2008: pp. 39–65. doi:10.1007/978-3-540-72843-6_3.
- [44] L.F. Brass, D.R. Manning, K. Cichowski, C.S. Abrams, Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond., *Thromb. Haemost.* 78 (1997) 581–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9198220> (accessed February 4, 2020).
- [45] H. Ishihara, A.J. Connolly, D. Zeng, M.L. Kahn, Y.W. Zheng, C. Timmons, T. Tram, S.R. Coughlin, Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans, *Nature*. 386 (1997) 502–506. doi:10.1038/386502a0.
- [46] D.T. Hung, T.K.H. Vu, V.I. Wheaton, K. Ishii, S.R. Coughlin, Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation, *J. Clin. Invest.* 89 (1992) 1350–1353. doi:10.1172/JCI115721.
- [47] C. Léon, B. Hechler, C. Vial, C. Leray, J.P. Cazenave, C. Gachet, The P2Y₁ receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells., *FEBS Lett.* 403 (1997) 26–30. doi:10.1016/s0014-5793(97)00022-7.
- [48] M.L. Kahn, Y.W. Zheng, W. Huang, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff, R. V. Farese, C. Tam, S.R. Coughlin, A dual thrombin receptor system for platelet activation, *Nature*. 394 (1998) 690–694. doi:10.1038/29325.
- [49] A. Habib, G.A. Fitzgerald, J. Maclouf, Phosphorylation of the thromboxane receptor α , the predominant isoform expressed in human platelets, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 2645–2651. doi:10.1074/jbc.274.5.2645.
- [50] M.P. Mahaut-Smith, S. Jones, R.J. Evans, The P2X₁ receptor and platelet function, *Purinergic Signal.* 7 (2011) 341–356. doi:10.1007/s11302-011-9224-0.
- [51] S.M. Schoenwaelder, Y. Yuan, P. Cooray, H.H. Salem, S.P. Jackson, Calpain cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin α (IIb) β 3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin clots, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 1694–1702. doi:10.1074/jbc.272.3.1694.
- [52] M. Vanwijk, E. Vanbavel, A. Sturk, R. Nieuwland, Microparticles in cardiovascular diseases, *Cardiovasc. Res.* 59 (2003) 277–287. doi:10.1016/S0008-6363(03)00367-5.
- [53] S. Nair, K. Ghosh, B. Kulkarni, S. Shetty, D. Mohanty, Glanzmann’s thrombasthenia:

- Updated, Platelets. 13 (2002) 387–393. doi:10.1080/0953710021000024394.
- [54] W. Bergmeier, T. Goerge, H.W. Wang, J.R. Crittenden, A.C.W. Baldwin, S.M. Cifuni, D.E. Housman, A.M. Graybiel, D.D. Wagner, Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1699–1707. doi:10.1172/JCI30575.
- [55] J.R. Crittenden, W. Bergmeier, Y. Zhang, C.L. Piffath, Y. Liang, D.D. Wagner, D.E. Housman, A.M. Graybiel, CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation, *Nat. Med.* 10 (2004) 982–986. doi:10.1038/nm1098.
- [56] M. Chrzanowska-Wodnicka, S.S. Smyth, S.M. Schoenwaelder, T.H. Fischer, G.C. White, Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 680–687. doi:10.1172/JCI22973.
- [57] P.E.J. van der Meijden, J.W.M. Heemskerk, Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives, *Nat. Rev. Cardiol.* 16 (2019) 166–179. doi:10.1038/s41569-018-0110-0.
- [58] J.E.B. Fox, S.J. Shattil, R.L. Kinlough-Rathbone, M. Richardson, M.A. Packham, D.A. Sanan, The platelet cytoskeleton stabilizes the interaction between α IIb β 3 and its ligand and induces selective movements of ligand-occupied integrin, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 7004–7011. doi:10.1074/jbc.271.12.7004.
- [59] J. Han, C.J. Lim, N. Watanabe, A. Soriani, B. Ratnikov, D.A. Calderwood, W. Puzon-McLaughlin, E.M. Lafuente, V.A. Boussiotis, S.J. Shattil, M.H.H. Ginsberg, Reconstructing and Deconstructing Agonist-Induced Activation of Integrin α IIb β 3, *Curr. Biol.* 16 (2006) 1796–1806. doi:10.1016/j.cub.2006.08.035.
- [60] M. Bouaouina, Y. Lad, D.A. Calderwood, The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate β 1 and β 3 integrins, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 6118–6125. doi:10.1074/jbc.M709527200.
- [61] A. Banno, M.H. Ginsberg, Integrin activation, *Biochem. Soc. Trans.* 36 (2008) 229–234. doi:10.1042/BST0360229.
- [62] N.J. Anthis, K.L. Wegener, F. Ye, C. Kim, B.T. Goult, E.D. Lowe, I. Vakonakis, N. Bate, D.R. Critchley, M.H. Ginsberg, I.D. Campbell, The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction, *EMBO J.* 28 (2009) 3623–3632. doi:10.1038/emboj.2009.287.
- [63] G.L. Reed, M.L. Fitzgerald, J. Polgar, Molecular mechanisms of platelet exocytosis: Insights into the “secrete” life of thrombocytes, *Blood.* 96 (2000) 3334–3342. doi:10.1182/blood.V96.10.3334.h8003334_3334_3342.
- [64] S.H. Chun, J.P. Polgar, G.L. Reed, Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 25286–25291. doi:10.1074/jbc.M004204200.
- [65] G.L. Reed, A.K. Houn, M.L. Fitzgerald, Human platelets contain SNARE proteins and a

- Sec1p homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation: implications for platelet secretion., *Blood*. 93 (1999) 2617–26. doi:10.1182/blood.V93.8.2617.
- [66] J. Polgár, S.-H. Chung, G.L. Reed, Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion., *Blood*. 100 (2002) 1081–3. doi:10.1182/blood.v100.3.1081.
- [67] P.P. Lemons, D. Chen, A.M. Bernstein, M.K. Bennett, S.W. Whiteheart, Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery., *Blood*. 90 (1997) 1490–500. doi:10.1182/blood.V90.4.1490.
- [68] Q. Ren, H.K. Barber, G.L. Crawford, Z.A. Karim, C. Zhao, W. Choi, C.-C. Wang, W. Hong, S.W. Whiteheart, Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction., *Mol. Biol. Cell*. 18 (2007) 24–33. doi:10.1091/mbc.e06-09-0785.
- [69] D. Chen, A.M. Bernstein, P.P. Lemons, S.W. Whiteheart, Molecular mechanisms of platelet exocytosis: Role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release, *Blood*. 95 (2000) 921–929. doi:10.1182/blood.v95.3.921.003k17_921_929.
- [70] H. Heijnen, P. van der Sluijs, Platelet secretory behaviour: As diverse as the granules... or not?, *J. Thromb. Haemost.* 13 (2015) 2141–2151. doi:10.1111/jth.13147.
- [71] F. Schimmöller, I. Simon, S.R. Pfeffer, Rab GTPases, directors of vesicle docking, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 22161–22164. doi:10.1074/jbc.273.35.22161.
- [72] S.W. Whiteheart, T. Schraw, E.A. Matveeva, N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) structure and function., *Int. Rev. Cytol.* 207 (2001) 71–112. doi:10.1016/s0074-7696(01)07003-6.
- [73] T.C. Südhof, J.E. Rothman, Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins, *Science* (80-.). 323 (2009) 474–477. doi:10.1126/science.1161748.
- [74] J.R. O'Brien, Prostaglandins and platelets., *Lancet*. 1 (1968) 149. doi:10.1146/annurev.me.31.020180.000513.
- [75] L.K. Jennings, Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis, *Thromb. Haemost.* 102 (2009) 248–257. doi:10.1160/TH09-03-0192.
- [76] L.F. Brass, L. Zhu, T.J. Stalker, Minding the gaps to promote thrombus growth and stability, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3385–3392. doi:10.1172/JCI26869.
- [77] M. De Virgilio, W.B. Kiosses, S.J. Shattil, Proximal, selective, and dynamic interactions between integrin α IIb β 3 and protein tyrosine kinases in living cells, *J. Cell Biol.* 165 (2004) 305–311. doi:10.1083/jcb.200402064.
- [78] D.R. Phillips, L. Nannizzi-Alaimo, K.S. Prasad, Beta3 tyrosine phosphorylation in α IIb β 3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling., *Thromb. Haemost.* 86 (2001) 246–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487013> (accessed

February 5, 2020).

- [79] J. Gao, Regulation of the pp72syk protein tyrosine kinase by platelet integrin alpha IIb beta 3, *EMBO J.* 16 (1997) 6414–6425. doi:10.1093/emboj/16.21.6414.
- [80] D.A. Law, F.R. DeGuzman, P. Heiser, K. Ministri-Madrid, N. Killeen, D.R. Phillips, Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in α IIb β 3 signalling and platelet function, *Nature.* 401 (1999) 808–811. doi:10.1038/44599.
- [81] A. Obergefell, K. Eto, A. Mocsai, C. Buensuceso, S.L. Moores, J.S. Brugge, C.A. Lowell, S.J. Shattil, Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with α IIb β 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton, *J. Cell Biol.* 157 (2002) 265–275. doi:10.1083/jcb.200112113.
- [82] S.P. Jackson, The growing complexity of platelet aggregation, *Blood.* 109 (2007) 5087–5095. doi:10.1182/blood-2006-12-027698.
- [83] Z.M. Ruggeri, Platelet adhesion under flow., *Microcirculation.* 16 (2009) 58–83. doi:10.1080/10739680802651477.
- [84] K.L. Tucker, T. Sage, J.M. Gibbins, Clot retraction, *Methods Mol. Biol.* 788 (2012) 101–107. doi:10.1007/978-1-61779-307-3_8.
- [85] S. Osdoit, J.P. Rosa, Fibrin Clot Retraction by Human Platelets Correlates with α IIb β 3 Integrin-dependent Protein Tyrosine Dephosphorylation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6703–6710. doi:10.1074/jbc.M008945200.
- [86] S.M. Schoenwaelder, S.P. Jackson, Y. Yuan, M.S. Teasdale, H.H. Salem, C.A. Mitchell, Tyrosine kinases regulate the cytoskeletal attachment of integrin alpha IIb beta 3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin polymers., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 32479–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7798249> (accessed March 8, 2020).
- [87] M.W. Meyer, K. Gong, M.C. Herzberg, Streptococcus sanguis-induced platelet clotting in rabbits and hemodynamic and cardiopulmonary consequences., *Infect. Immun.* 66 (1998) 5906–14. doi:10.1128/IAI.66.12.5906-5914.1998.
- [88] A. McNicol, A. Agpalza, E.C.G. Jackson, H. Hamzeh-Cognasse, O. Garraud, F. Cognasse, Streptococcus sanguinis-induced cytokine release from platelets, *J. Thromb. Haemost.* 9 (2011) 2038–2049. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04462.x.
- [89] D. Cox, S.W. Kerrigan, S.P. Watson, Platelets and the innate immune system: Mechanisms of bacterial-induced platelet activation, *J. Thromb. Haemost.* 9 (2011) 1097–1107. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04264.x.
- [90] O. Shannon, E. Hertzén, A. Norrby-Teglund, M. Mörgelin, U. Sjöbring, L. Björck, Severe streptococcal infection is associated with M protein-induced platelet activation and thrombus formation, *Mol. Microbiol.* 65 (2007) 1147–1157. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05841.x.

- [91] M.P. Brennan, A. Loughman, M. Devocelle, S. Arasu, A.J. Chubb, T.J. Foster, D. Cox, Elucidating the role of *Staphylococcus epidermidis* serine-aspartate repeat protein G in platelet activation, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 1364–1372. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03495.x.
- [92] S. Russwurm, J. Vickers, A. Meier-Hellmann, P. Spangenberg, D. Bredle, K. Reinhart, W. Lösche, Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction, *Shock.* 17 (2002) 263–268. doi:10.1097/00024382-200204000-00004.
- [93] M. Koupenova, O. Vitseva, C.R. MacKay, L.M. Beaulieu, E.J. Benjamin, E. Mick, E.A. Kurt-Jones, K. Ravid, J.E. Freedman, Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis, *Blood.* 124 (2014) 791–802. doi:10.1182/blood-2013-11-536003.
- [94] R. Aslam, E.R. Speck, M. Kim, A.R. Crow, K.W.A. Bang, F.P. Nestel, H. Ni, A.H. Lazarus, J. Freedman, J.W. Semple, Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor- α production in vivo, *Blood.* 107 (2006) 637–641. doi:10.1182/blood-2005-06-2202.
- [95] G. Andonegui, S.M. Kerfoot, K. McNagny, K.V.J. Ebbert, K.D. Patel, P. Kubes, Platelets express functional Toll-like receptor-4, *Blood.* 106 (2005) 2417–2423. doi:10.1182/blood-2005-03-0916.
- [96] A.Z. Zucoloto, C.N. Jenne, Platelet-Neutrophil Interplay: Insights Into Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Driven Coagulation in Infection, *Front. Cardiovasc. Med.* 6 (2019). doi:10.3389/fcvm.2019.00085.
- [97] S.R. Clark, A.C. Ma, S.A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M.M. Kelly, K.D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G.D. Sinclair, E.M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. DeVinney, C.J. Doig, F.H.Y. Green, P. Kubes, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood, *Nat. Med.* 13 (2007) 463–469. doi:10.1038/nm1565.
- [98] A. Korniluk, O. Koper, H. Kemon, V. Dymicka-Piekarska, From inflammation to cancer, *Ir. J. Med. Sci.* 186 (2017) 57–62. doi:10.1007/s11845-016-1464-0.
- [99] L.J. Gay, B. Felding-Habermann, Contribution of platelets to tumour metastasis, *Nat. Rev. Cancer.* 11 (2011) 123–134. doi:10.1038/nrc3004.
- [100] D. Prisco, R. Paniccchia, M. Coppo, M. Filippini, I. Francalanci, T. Brunelli, P. Comeglio, R. Abbate, Platelet activation and platelet lipid composition in pulmonary cancer, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids.* 53 (1995) 65–68. doi:10.1016/0952-3278(95)90085-3.
- [101] A.D. Blann, D. Gurney, M. Wadley, D. Bareford, P. Stonelake, G.Y.H. Lip, Increased soluble P-selectin in patients with haematological and breast cancer: A comparison with fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and von Willebrand factor, *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 12 (2001) 43–50. doi:10.1097/00001721-200101000-00007.
- [102] L.K. Jennings, Role of Platelets in Atherothrombosis, *Am. J. Cardiol.* 103 (2009) 4A-10A.

doi:10.1016/j.amjcard.2008.11.017.

- [103] G. Davì, C. Patrono, G. Davì, C. Patrono, Platelet activation and atherothrombosis., *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 2482–2492. doi:10.1056/NEJMra071014.
- [104] M. Gawaz, H. Langer, A.E. May, Platelets in inflammation and atherogenesis, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3378–3384. doi:10.1172/JCI27196.
- [105] Z.S. Kaplan, S.P. Jackson, The role of platelets in atherothrombosis., *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2011 (2011) 51–61. doi:10.1182/asheducation-2011.1.51.
- [106] U. Schönbeck, P. Libby, CD40 signaling and plaque instability, *Circ. Res.* 89 (2001) 1092–1103. doi:10.1161/hh2401.101272.
- [107] G. Li, J.M. Sanders, E.T. Phan, K. Ley, I.J. Sarembock, Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express P-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient mice, *Am. J. Pathol.* 167 (2005) 1511–1518. doi:10.1016/S0002-9440(10)61237-0.
- [108] U. Schönbeck, G.K. Sukhova, K. Shimizu, F. Mach, P. Libby, Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 7458–7463. doi:10.1073/pnas.97.13.7458.
- [109] D.E. Gutstein, V. Fuster, Pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture., *Cardiovasc. Res.* 41 (1999) 323–33. doi:10.1016/s0008-6363(98)00322-8.
- [110] J. Zhou, M. Chew, H.B. Ravn, E. Falk, Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes, *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* 59 (1999) 3–11. doi:10.3109/00365519909168321.
- [111] J.W.M. Heemskerk, E.M. Bevers, T. Lindhout, Platelet activation and blood coagulation, *Thromb. Haemost.* 88 (2002) 186–193. doi:10.1055/s-0037-1613209.
- [112] W.S. Nesbitt, E. Westein, F.J. Tovar-Lopez, E. Tolouei, A. Mitchell, J. Fu, J. Carberry, A. Fouras, S.P. Jackson, A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation, *Nat. Med.* 15 (2009) 665–673. doi:10.1038/nm.1955.
- [113] M.J. Davies, A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease, *Circulation.* 82 (1990) II38-46.
- [114] J. Hirsh, Hyperreactive Platelets and Complications of Coronary Artery Disease, *N. Engl. J. Med.* 316 (1987) 1543–1544. doi:10.1056/NEJM198706113162410.
- [115] P. Hamet, R. Skuherska, S.C. Pang, J. Tremblay, Abnormalities of Platelet Function in Hypertension and Diabetes, *Hypertension.* 6 (1985) II135-42. doi:10.1161/01.hyp.7.6_pt_2.ii135.
- [116] J. Shen, S. Sampietro, J. Wu, J. Tang, S. Gupta, C.N. Matzko, C. Tang, Y. Yu, L.F. Brass, L. Zhu, T.J. Stalker, Coordination of platelet agonist signaling during the hemostatic response in vivo, *Blood Adv.* 1 (2017) 2767–2775.

doi:10.1182/bloodadvances.2017009498.

- [117] R.W. Farndale, J.J. Sixma, M.J. Barnes, P.G. De Groot, The role of collagen in thrombosis and hemostasis, *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004) 561–573. doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00665.x.
- [118] R.W. Farndale, Collagen-induced platelet activation, *Blood Cells, Mol. Dis.* 36 (2006) 162–165. doi:10.1016/j.bcmd.2005.12.016.
- [119] L.F. Morton, A.R. Peachey, M.J. Barnes, Platelet-reactive sites in collagens type I and type III. Evidence for separate adhesion and aggregatory sites, *Biochem. J.* 258 (1989) 157–163. doi:10.1042/bj2580157.
- [120] A.W. Poole, S.P. Watson, Regulation of cytosolic calcium by collagen in single human platelets, *Br. J. Pharmacol.* 115 (1995) 101–106. doi:10.1111/j.1476-5381.1995.tb16326.x.
- [121] S.A. Santoro, J.J. Walsh, W.D. Staatz, K.J. Baranski, Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation, *Cell Regul.* 2 (1991) 905–913. doi:10.1091/mbc.2.11.905.
- [122] S.P. Watson, B. Reep, R.T. McConnell, E.G. Lapetina, Collagen stimulates [3H]inositol triphosphate formation in indomethacin-treated human platelets, *Biochem. J.* 226 (1985) 831–837. doi:10.1042/bj2260831.
- [123] S.E. Rittenhouse, C.L. Allen, Synergistic activation by collagen and 15-hydroxy-9 alpha,11 alpha-peroxidoprostanoic acid (PGH₂) of phosphatidylinositol metabolism and arachidonic acid release in human platelets., *J. Clin. Invest.* 70 (1982) 1216–24. doi:10.1172/jci110720.
- [124] D.E. Roberts, A. McNicol, R. Bose, Mechanism of Collagen Activation in Human Platelets, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 19421–19430. doi:10.1074/jbc.M308864200.
- [125] R.A.P. Romijn, B. Bouma, W. Wuyster, P. Gros, J. Kroon, J.J. Sixma, E.G. Huizinga, Identification of the Collagen-binding Site of the von Willebrand Factor A3-domain, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 9985–9991. doi:10.1074/jbc.M006548200.
- [126] A. Madamanchi, S.A. Santoro, M.M. Zutter, $\alpha 2\beta 1$ Integrin, in: *I Domain Integrins*, Springer, 2014: pp. 41–60. doi:10.1007/978-94-017-9153-3_3.
- [127] T. Lisman, C. Weeterings, P.G. De Groot, Platelet aggregation: Involvement of thrombin and fibrin(ogen), *Front. Biosci.* 10 (2005) 2504–2517. doi:10.2741/1715.
- [128] A.W.Y. Chung, P. Jurasz, M.D. Hollenberg, M.W. Radomski, Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets, *Br. J. Pharmacol.* 135 (2002) 1123–1132. doi:10.1038/sj.bjp.0704559.
- [129] H. Andersen, D.L. Greenberg, K. Fujikawa, W. Xu, D.W. Chung, E.W. Davie, Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 11189–11193.

doi:10.1073/pnas.96.20.11189.

- [130] G.A. Jamieson, T. Okumura, Reduced thrombin binding and aggregation in Bernard-Soulier platelets., *J. Clin. Invest.* 61 (1978) 861–864. doi:10.1172/JCI109000.
- [131] V. Wolff, B. Aleil, M. Giroud, J.L. Lorenzini, N. Meyer, M.L. Wiesel, J.P. Cazenave, F. Lanza, Soluble platelet glycoprotein V is a marker of thrombosis in patients with ischemic stroke., *Stroke.* 36 (2005). doi:10.1161/01.str.0000155738.02753.4d.
- [132] S. Murugappan, S.P. Kunapuli, The role of ADP receptors in platelet function, *Front. Biosci.* 11 (2006) 1977–1986. doi:10.2741/1939.
- [133] R.N. Puri, R.W. Colman, ADP-induced platelet activation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32 (1997) 437–502. doi:10.3109/10409239709082000.
- [134] J. Jin, T.M. Quinton, J. Zhang, S.E. Rittenhouse, S.P. Kunapuli, Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A2 generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin α IIb β 3 and ADP receptors, *Blood.* 99 (2002) 193–198. doi:10.1182/blood.V99.1.193.
- [135] E.M. Smyth, Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease., *Clin. Lipidol.* 5 (2010) 209–219. doi:10.2217/clp.10.11.
- [136] M. Negishi, Y. Sugimoto, A. Ichikawa, Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1259 (1995) 109–119. doi:10.1016/0005-2760(95)00146-4.
- [137] N. Nakahata, Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology, *Pharmacol. Ther.* 118 (2008) 18–35. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.01.001.
- [138] M.K. Raychowdhury, M. Yukawa, L.J. Collins, S.H. McGrail, K.C. Kent, J.A. Ware, Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 19256–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8034687> (accessed January 22, 2020).
- [139] D. Rucker, A.S. Dhamoon, Physiology, Thromboxane A2, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30969639> (accessed January 22, 2020).
- [140] P. Gresele, E. Falcinelli, S. Momi, Potentiation and priming of platelet activation: a potential target for antiplatelet therapy, *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (2008) 352–360. doi:10.1016/j.tips.2008.05.002.
- [141] T.A. Blair, S.F. Moore, I. Hers, Circulating primers enhance platelet function and induce resistance to antiplatelet therapy, *J. Thromb. Haemost.* 13 (2015) 1479–1493. doi:10.1111/jth.13022.
- [142] G. Manfioletti, C. Brancolini, G. Avanzi, C. Schneider, The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related

- to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade., *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 4976–4985. doi:10.1128/mcb.13.8.4976.
- [143] G. Wu, Z. Ma, Y. Cheng, W. Hu, C. Deng, S. Jiang, T. Li, F. Chen, Y. Yang, Targeting Gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment, *Mol. Cancer.* 17 (2018). doi:10.1186/s12943-018-0769-1.
- [144] W.R. Gould, S.M. Baxi, R. Schroeder, Y.W. Peng, R.J. Leadley, J.T. Peterson, L.A. Perrin, Gas6 receptors Axl, Sky and Mer enhance platelet activation and regulate thrombotic responses, *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 733–741. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01186.x.
- [145] A. Angelillo-Scherrer, P.G. De Frutos, C. Aparicio, E. Melis, P. Savi, F. Lupu, J. Arnout, M. Dewerchin, M.F. Hoylaerts, J.M. Herbert, D. Collen, B. Dahlbäck, P. Carmeliet, Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis, *Nat. Med.* 7 (2001) 215–221. doi:10.1038/84667.
- [146] A. Angelillo-Scherrer, L. Burnier, N. Flores, P. Savi, M. DeMol, P. Schaeffer, J.M. Herbert, G. Lemke, S.P. Goff, G.K. Matsushima, H.S. Earp, C. Vesin, M.F. Hoylaerts, S. Plaisance, D. Collen, E.M. Conway, B. Wehrle-Haller, P. Carmeliet, Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 237–246. doi:10.1172/JCI22079.
- [147] X. Muñoz, V. Obach, B. Hurtado, P.G. de Frutos, Á. Chamorro, N. Sala, Association of specific haplotypes of GAS6 gene with stroke, *Thromb. Haemost.* 98 (2007) 406–412. doi:10.1160/TH06-12-0681.
- [148] L. Burnier, D. Borgel, A. Angelillo-Scherrer, P. Fontana, Plasma levels of the growth arrest-specific gene 6 product (Gas6) and antiplatelet drug responsiveness in healthy subjects, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 2283–2284. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02155.x.
- [149] G. Sawicki, E.J. Sanders, E. Salas, M. Wozniak, J. Rodrigo, M.W. Radomski, Localization and translocation of MMP-2 during aggregation of human platelets., *Thromb. Haemost.* 80 (1998) 836–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843180> (accessed January 27, 2020).
- [150] G. Sawicki, E. Salas, J. Murat, H. Miszta-Lane, M.W. Radomski, Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation, *Nature.* 386 (1997) 616–619. doi:10.1038/386616a0.
- [151] E. Falcinelli, G. Guglielmini, M. Torti, P. Gresele, Intraplatelet signaling mechanisms of the priming effect of matrix metalloproteinase-2 on platelet aggregation, *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 2526–2535. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01614.x.
- [152] M.D. Klok, S. Jakobsdottir, M.L. Drent, The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: A review, *Obes. Rev.* 8 (2007) 21–34. doi:10.1111/j.1467-789X.2006.00270.x.

- [153] C. Dellas, K. Schäfer, I.K. Rohm, M. Lankeit, M. Leifheit, D.J. Loskutoff, G. Hasenfuss, S. V Konstantinides, Leptin signalling and leptin-mediated activation of human platelets: importance of JAK2 and the phospholipases Cgamma2 and A2., *Thromb. Haemost.* 98 (2007) 1063–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000612> (accessed January 27, 2020).
- [154] H.S. Elbatarny, 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.* 289 (2005). doi:10.1152/ajpendo.00125.2005.
- [155] P. Gresele, H. Deckmyn, G.G. Nenci, J. Vermynen, Thromboxane synthase inhibitors, thromboxane receptor antagonists and dual blockers in thrombotic disorders, *Trends Pharmacol. Sci.* 12 (1991) 158–163. doi:10.1016/0165-6147(91)90533-X.
- [156] R. Vezza, R. Roberti, G.G. Nenci, P. Gresele, Prostaglandin E2 potentiates platelet aggregation by priming protein kinase C., *Blood.* 82 (1993) 2704–13. doi:10.1182/blood.V82.9.2704.2704.
- [157] H. Ma, A. Hara, C.Y. Xiao, Y. Okada, O. Takahata, K. Nakaya, Y. Sugimoto, A. Ichikawa, S. Narumiya, F. Ushikubi, Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3, *Circulation.* 104 (2001) 1176–1180. doi:10.1161/hc3601.094003.
- [158] P. Gresele, D. Blockmans, H. Deckmyn, J. Vermynen, 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.* 246 (1988) 301–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3134542> (accessed January 27, 2020).
- [159] E.A. Podrez, T. V. Byzova, M. Febbraio, R.G. Salomon, Y. Ma, M. Valiyaveetil, E. Poliakov, M. Sun, P.J. Finton, B.R. Curtis, J. Chen, R. Zhang, R.L. Silverstein, S.L. Hazen, Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype, *Nat. Med.* 13 (2007) 1086–1095. doi:10.1038/nm1626.
- [160] S.P. Jackson, A.C. Calkin, The clot thickens—oxidized lipids and thrombosis, *Nat. Med.* 13 (2007) 1015–1016. doi:10.1038/nm0907-1015.
- [161] F.E.R. Simons, First-aid treatment of anaphylaxis to food: Focus on epinephrine, *J. Allergy Clin. Immunol.* 113 (2004) 837–844. doi:10.1016/j.jaci.2004.01.769.
- [162] A. Spalding, H. Vaitkevicius, S. Dill, S. MacKenzie, A. Schmaier, W. Lockette, Mechanism of epinephrine-induced platelet aggregation, *Hypertension.* 31 (1998) 603–607. doi:10.1161/01.HYP.31.2.603.
- [163] F. Lanza, A. Beretz, A. Stierlé, D. Hanau, M. Kubina, J.P. Cazenave, Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent., *Am. J. Physiol.* 255 (1988) H1276-88. doi:10.1152/ajpheart.1988.255.6.H1276.

- [164] K. Kojok, A.E.H. El-Kadiry, Y. Merhi, Role of NF- κ B in platelet function, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). doi:10.3390/ijms20174185.
- [165] N.A. Michel, A. Zirlik, D. Wolf, CD40L and Its Receptors in Atherothrombosis—An Update, *Front. Cardiovasc. Med.* 4 (2017). doi:10.3389/fcvm.2017.00040.
- [166] C. Heeschen, S. Dimmeler, C.W. Hamm, M.J. Van den Brand, E. Boersma, A.M. Zeiher, M.L. Simoons, Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1104–1111. doi:10.1056/NEJMoa022600.
- [167] F. Cipollone, A. Mezzetti, E. Porreca, C. Di Febbo, M. Nutini, M. Fazio, A. Falco, F. Cuccurullo, G. Davì, Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy., *Circulation.* 106 (2002) 399–402. doi:10.1161/01.cir.0000025419.95769.f0.
- [168] M.B.I. Lobbes, E. Lutgens, S. Heeneman, K.B.J.M. Cleutjens, M.E. Kooi, J.M.A. van Engelshoven, M.J.A.P. Daemen, P.J. Nelemans, 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.* 187 (2006) 18–25. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.11.005.
- [169] P. André, K.S. Srinivasa Prasad, C. V. Denis, M. He, J.M. Papalia, R.O. Hynes, D.R. Phillips, D.D. Wagner, CD40L stabilizes arterial thrombi by a β 3 integrin-dependent mechanism, *Nat. Med.* 8 (2002) 247–252. doi:10.1038/nm0302-247.
- [170] D. Yacoub, A. Hachem, J.-F. Théorêt, M.-A. Gillis, W. Mourad, Y. Merhi, Enhanced levels of soluble CD40 ligand exacerbate platelet aggregation and thrombus formation through a CD40-dependent tumor necrosis factor receptor-associated factor-2/Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 2424–33. doi:10.1161/ATVBAHA.110.216143.
- [171] A. Hachem, D. Yacoub, Y. Zaid, W. Mourad, Y. Merhi, Involvement of nuclear factor κ B in platelet CD40 signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425 (2012) 58–63. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.049.
- [172] K. Kojok, S. El Akoum, M. Mohsen, W. Mourad, Y. Merhi, CD40L Priming of Platelets via NF- κ B Activation is CD40- and TAK1-Dependent., *J. Am. Heart Assoc.* 7 (2018) e03677. doi:10.1161/JAHA.118.009636.
- [173] K. Kojok, M. Mohsen, A.E.H. El Kadiry, W. Mourad, Y. Merhi, Aspirin Reduces the Potentiating Effect of CD40L on Platelet Aggregation via Inhibition of Myosin Light Chain, *J. Am. Heart Assoc.* 9 (2020). doi:10.1161/JAHA.119.013396.
- [174] U. Schönbeck, P. Libby, The CD40/CD154 receptor/ligand dyad, *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2001) 4–43. doi:10.1007/PL00000776.
- [175] S.X. Anand, J.F. Viles-Gonzalez, J.J. Badimon, E. Cavusoglu, J.D. Marmur, Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease., *Thromb. Haemost.* 90 (2003) 377–84. doi:10.1160/TH03-05-0268.

- [176] C. Léveillé, M. Bouillon, W. Guo, J. Bolduc, E. Sharif-Askari, Y. El-Fakhry, C. Reyes-Moreno, R. Lapointe, Y. Merhi, J.A. Wilkins, W. Mourad, CD40 ligand binds to $\alpha 5\beta 1$ integrin and triggers cell signaling, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 5143–5151. doi:10.1074/jbc.M608342200.
- [177] A. Zirlik, C. Maier, N. Gerdes, L. MacFarlane, J. Soosairajah, U. Bavendiek, I. Ahrens, S. Ernst, N. Bassler, A. Missiou, Z. Patko, M. Aikawa, U. Schönbeck, C. Bode, P. Libby, K. Peter, CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1, *Circulation.* 115 (2007) 1571–1580. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.683201.
- [178] F. Mach, U. Schönbeck, G.K. Sukhova, T. Bourcier, J.Y. Bonnefoy, J.S. Pober, P. Libby, 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.* 94 (1997) 1931–1936. doi:10.1073/pnas.94.5.1931.
- [179] P. André, L. Nannizzi-Alaimo, S.K. Prasad, D.R. Phillips, Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease., *Circulation.* 106 (2002) 896–9. doi:10.1161/01.cir.0000028962.04520.01.
- [180] B. Zhang, T. Wu, M. Chen, Y. Zhou, D. Yi, R. Guo, The CD40/CD40L system: A new therapeutic target for disease, *Immunol. Lett.* 153 (2013) 58–61. doi:10.1016/j.imlet.2013.07.005.
- [181] R. Elgueta, M.J. Benson, V.C. De Vries, A. Wasiuk, Y. Guo, R.J. Noelle, Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system, *Immunol. Rev.* 229 (2009) 152–172. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.
- [182] G. Van Kooten, J. Banchereau, CD40-CD40 ligand, *J. Leukoc. Biol.* 67 (2000) 2–17. doi:10.1002/jlb.67.1.2.
- [183] R. Chaturvedi, M. Gupta, A. Jain, T. Das, S. Prashar, Soluble CD40 ligand: a novel biomarker in the pathogenesis of periodontal disease, *Clin. Oral Investig.* 19 (2014) 45–52. doi:10.1007/s00784-014-1216-3.
- [184] D. Yacoub, G.S. Hassan, N. Alaadine, Y. Merhi, W. Mourad, CD40 Ligand and Its Receptors in Atherothrombosis, in: E. Gaxiola (Ed.), *Tradit. Nov. Risk Factors Atherothrombosis*, InTech, 2012: p. 82.
- [185] F. Rosetti, T.N. Mayadas, The many faces of Mac-1 in autoimmune disease, *Immunol. Rev.* 269 (2016) 175–193. doi:10.1111/imr.12373.
- [186] S.M. Kanse, R.L. Matz, K.T. Preissner, K. Peter, Promotion of leukocyte adhesion by a novel interaction between vitronectin and the $\beta 2$ integrin Mac-1 ($\alpha M\beta 2$, CD11b/CD18), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 2251–2256. doi:10.1161/01.ATV.0000146529.68729.8b.
- [187] R. Ehlers, V. Ustinov, Z. Chen, X. Zhang, R. Rao, F.W. Luscinskas, J. Lopez, E. Plow, D.I. Simon, Targeting platelet-leukocyte interactions: Identification of the integrin Mac-1

- binding site for the platelet counter receptor glycoprotein Ib α , *J. Exp. Med.* 198 (2003) 1077–1088. doi:10.1084/jem.20022181.
- [188] H. Alturaihi, G. S. Hassan, L. Al-Zoobi, S. Salti, Y. Darif, D. Yacoub, S. El Akoum, M. Oudghiri, Y. Merhi, W. Mourad, Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals, *Eur. J. Immunol.* 45 (2015) 592–602. doi:10.1002/eji.201444941.
- [189] D. Wolf, N. Bukosza, D. Engel, M. Poggi, F. Jehle, N.A. Michel, Y.C. Chen, C. Colberg, N. Hoppe, B. Dufner, L. Boon, H. Blankenbach, I. Hilgendorf, C. von Zur Muhlen, J. Reinöhl, B. Sommer, T. Marchini, M.A. Febbraio, C. Weber, C. Bode, K. Peter, E. Lutgens, A. Zirlik, Inflammation, but not recruitment, of adipose tissue macrophages requires signalling through Mac-1 (CD11B/CD18) in diet-induced obesity (DIO), *Thromb. Haemost.* 117 (2017) 325–338. doi:10.1160/TH16-07-0553.
- [190] D. Wolf, J.D. Hohmann, A. Wiedemann, K. Bledzka, H. Blankenbach, T. Marchini, K. Gutte, K. Zeschky, N. Bassler, N. Hoppe, A.O. Rodriguez, N. Herr, I. Hilgendorf, P. Stachon, F. Willecke, D. Duerschmied, C. Von Zur Muhlen, D.A. Soloviev, L. Zhang, C. Bode, E.F. Plow, P. Libby, K. Peter, A. Zirlik, 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.* 109 (2011) 1269–1279. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247684.
- [191] L. Loubaki, A. Semlali, M. Boisvert, E. Jacques, S. Plante, F. Aoudjit, W. Mourad, J. Chakir, Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/ α 5 β 1 interaction, *Mol. Immunol.* 47 (2010) 2112–2118. doi:10.1016/j.molimm.2010.03.011.
- [192] D. Simic, N. Bogdan, F. Teng, M. Otieno, Blocking α 5 β 1 Integrin Attenuates sCD40L-Mediated Platelet Activation, *Clin. Appl. Thromb.* 23 (2017) 607–614. doi:10.1177/1076029615624549.
- [193] F.H. Epstein, J. Lefkovits, E.F. Plow, E.J. Topol, Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine, *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 1553–1559. doi:10.1056/NEJM199506083322306.
- [194] K.S.S. Prasad, P. Andre, Y. Yan, D.R. Phillips, The platelet CD40L/GP IIb-IIIa axis in atherothrombotic disease, *Curr. Opin. Hematol.* 10 (2003) 356–361. doi:10.1097/00062752-200309000-00006.
- [195] M.J.E. Kuijpers, N.J.A. Mattheij, L. Cipolla, J.P. Van Geffen, T. Lawrence, M.M.P.C. Donners, L. Boon, D. Lievens, M. Torti, H. Noels, N. Gerdes, J.M.E.M. Cosmans, E. Lutgens, J.W.M. Heemskerk, Platelet CD40L Modulates Thrombus Growth Via Phosphatidylinositol 3-Kinase β , and Not Via CD40 and I κ B Kinase α , *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35 (2015) 1374–1381. doi:10.1161/ATVBAHA.114.305127.
- [196] D. Bruemmer, U. Riggers, J. Holzmeister, M. Grill, F. Lippek, U. Settmacher, V. Regitz-Zagrosek, E. Fleck, K. Graf, Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions., *Am. J. Cardiol.* 87 (2001) 21–7. doi:10.1016/s0002-9149(00)01266-2.

- [197] M.R. Alderson, R.J. Armitage, T.W. Tough, L. Strockbine, W.C. Fanslow, M.K. Spriggs, CD40 expression by human monocytes: Regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 669–674. doi:10.1084/jem.178.2.669.
- [198] C. Contin, V. Pitard, T. Itai, S. Nagata, J.F. Moreau, J. Déchanet-Merville, Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor- α -converting enzyme: Implications for CD40 signaling, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 32801–32809. doi:10.1074/jbc.M209993200.
- [199] D. Wolf, F. Jehle, N.A. Michel, E.N. Bukosza, J. Rivera, Y.C. Chen, N. Hoppe, B. Dufner, A.O. Rodriguez, C. Colberg, L. Nieto, B. Rupprecht, A. Wiedemann, L. Schulte, A. Peikert, N. Bassler, A. Lozhkin, S.P. Hergeth, P. Stachon, I. Hilgendorf, F. Willecke, C. Von Zur Mühlen, D. Von Elverfeldt, C.J. Binder, P. Aichele, N. Varo, M.A. Febbraio, P. Libby, C. Bode, K. Peter, A. Zirlik, Coinhibitory suppression of t cell activation by CD40 protects against obesity and adipose tissue inflammation in mice, *Circulation.* 129 (2014) 2414–2425. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008055.
- [200] S. Danese, M. Sans, C. Fiocchi, The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease, *Gut.* 53 (2004) 1035–1043. doi:10.1136/gut.2003.026278.
- [201] V. Henn, S. Steinbach, K. Büchner, P. Presek, R.A. Kroczeck, The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40, *Blood.* 98 (2001) 1047–1054. doi:10.1182/blood.V98.4.1047.
- [202] J.E. Freedman, CD40-CD40L and Platelet Function Beyond Hemostasis, *Circ. Res.* 92 (2003) 944–946. doi:10.1161/01.RES.0000074030.98009.FF.
- [203] F. Langer, S.B. Ingersoll, A. Amirkhosravi, T. Meyer, F.A. Siddiqui, S. Ahmad, J.M. Walker, M. Amaya, H. Desai, J.L. Francis, The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation, *Thromb. Haemost.* 93 (2005) 1137–1146. doi:10.1160/TH04-12-0774.
- [204] S. Danese, C. de la Motte, B.M.R. Reyes, M. Sans, A.D. Levine, C. Fiocchi, Cutting Edge: T Cells Trigger CD40-Dependent Platelet Activation and Granular RANTES Release: A Novel Pathway for Immune Response Amplification, *J. Immunol.* 172 (2004) 2011–2015. doi:10.4049/jimmunol.172.4.2011.
- [205] D.P. Inwald, A. McDowall, M.J. Peters, R.E. Callard, N.J. Klein, CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation., *Circ. Res.* 92 (2003) 1041–8. doi:10.1161/01.RES.0000070111.98158.6C.
- [206] N. Gerdes, T. Seijkens, D. Lievens, M.J.E. Kuijpers, H. Winkels, D. Projahn, H. Hartwig, L. Beckers, R.T.A. Megens, L. Boon, R.J. Noelle, O. Soehnlein, J.W.M. Heemskerk, C. Weber, E. Lutgens, Platelet CD40 exacerbates atherosclerosis by transcellular activation of endothelial cells and leukocytes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36 (2016) 482–490. doi:10.1161/ATVBAHA.115.307074.
- [207] S.M. Prescott, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman, D.M. Stafforini, Inflammation as an

- Early Component of Atherosclerosis and Vascular Damage, *Jpn. Circ. J.* 60 (1996) 137–141. doi:10.1253/jcj.60.137.
- [208] P. Libby, Inflammation in atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 2045–2051. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179705.
- [209] M. Mussbacher, M. Salzmann, C. Brostjan, B. Hoesel, C. Schoergenhofer, H. Datler, P. Hohensinner, J. Basilio, P. Petzelbauer, A. Assinger, J.A. Schmid, Cell type specific roles of nf-kb linking inflammation and thrombosis, *Front. Immunol.* 10 (2019). doi:10.3389/fimmu.2019.00085.
- [210] F. Arenzana-Seisdedos, P. Turpin, M. Rodriguez, D. Thomas, R.T. Hay, J.L. Virelizier, C. Dargemont, Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm, *J. Cell Sci.* 110 (1997) 369–378.
- [211] T.D. Gilmore, Introduction to NF- κ B: Players, pathways, perspectives, *Oncogene.* 25 (2006) 6680–6684. doi:10.1038/sj.onc.1209954.
- [212] M. Tanaka, M.E. Fuentes, K. Yamaguchi, M.H. Durnin, S.A. Dalrymple, K.L. Hardy, D. V. Goeddel, Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- κ B activation in IKK- β -deficient mice, *Immunity.* 10 (1999) 421–429. doi:10.1016/S1074-7613(00)80042-4.
- [213] M.S. Hayden, S. Ghosh, Shared Principles in NF- κ B Signaling, *Cell.* 132 (2008) 344–362. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020.
- [214] M.J. Morgan, Z.G. Liu, Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling, *Cell Res.* 21 (2011) 103–115. doi:10.1038/cr.2010.178.
- [215] R. Sen, D. Baltimore, Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences, *Cell.* 46 (1986) 705–716. doi:10.1016/0092-8674(86)90346-6.
- [216] U. Senftleben, Y. Cao, G. Xiao, F.R. Greten, G. Krahn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S.C. Sun, M. Karin, Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway, *Science* (80-.). 293 (2001) 1495–1499. doi:10.1126/science.1062677\n293/5534/1495.
- [217] S. Vallabhapurapu, M. Karin, Regulation and Function of NF- κ B Transcription Factors in the Immune System, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 693–733. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132641.
- [218] S.L. Spinelli, A.E. Casey, S.J. Pollock, J.M. Gertz, D.H. McMillan, S.D. Narasipura, N.A. Mody, M.R. King, S.B. Maggirwar, C.W. Francis, M.B. Taubman, N. Blumberg, R.P. Phipps, Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor-kappaB, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 591–8. doi:10.1161/ATVBAHA.109.197343.
- [219] F. Liu, S.A. Morris, J.L. Epps, R.C. Carroll, Demonstration of an activation regulated NF- κ B/I- κ B α complex in human platelets, *Thromb. Res.* 106 (2002) 199–203. doi:10.1016/S0049-3848(02)00130-5.

- [220] S. Gambaryan, A. Kobsar, N. Rukoyatkina, S. Herterich, J. Geiger, A. Smolenski, S.M. Lohmann, U. Walter, Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NF κ B-I κ B complex, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 18352–18363. doi:10.1074/jbc.M109.077602.
- [221] H.S. Lee, S.D. Kim, W.M. Lee, M. Endale, S.M. Kamruzzaman, W.J. Oh, J.Y. Cho, S.K. Kim, H.J. Cho, H.J. Park, M.H. Rhee, A noble function of BAY 11-7082: Inhibition of platelet aggregation mediated by an elevated cAMP-induced VASP, and decreased ERK2/JNK1 phosphorylations, *Eur. J. Pharmacol.* 627 (2010) 85–91. doi:10.1016/j.ejphar.2009.11.005.
- [222] E. Malaver, M.A. Romaniuk, L.P. D’atri, R.G. Pozner, S. Negrotto, R. Benzadon, M. Schattner, NF- κ B inhibitors impair platelet activation responses, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 1333–1343. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03492.x.
- [223] F. Akbiyik, D.M. Ray, K.F. Gettings, N. Blumberg, C.W. Francis, R.P. Phipps, Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPAR γ , and PPAR γ agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes, *Blood.* (2004). doi:10.1182/blood-2004-03-0926.
- [224] F.Y. Ali, S.J. Davidson, L.A. Moraes, S.L. Traves, M. Paul-Clark, D. Bishop-Bailey, T.D. Warner, J.A. Mitchell, Role of nuclear receptor signaling in platelets: antithrombotic effects of PPAR β , *FASEB J.* 20 (2006) 326–328. doi:10.1096/fj.05-4395fje.
- [225] T.H. Chen, C.Y. Shih, W.L. Hsu, T.C. Chou, Mechanisms of nifedipine-downregulated CD40L/sCD40L signaling in collagen stimulated human platelets, *PLoS One.* 10 (2015) e0127054. doi:10.1371/journal.pone.0127054.
- [226] M.M. Denis, N.D. Tolley, M. Bunting, H. Schwertz, H. Jiang, S. Lindemann, C.C. Yost, F.J. Rubner, K.H. Albertine, K.J. Swoboda, C.M. Fratto, E. Tolley, L.W. Kraiss, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman, A.S. Weyrich, Escaping the nuclear confines: Signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets, *Cell.* 122 (2005) 379–391. doi:10.1016/j.cell.2005.06.015.
- [227] D. V. Gnatenko, J.J. Dunn, S.R. McCorkle, D. Weissmann, P.L. Perrotta, W.F. Bahou, Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression, *Blood.* 101 (2003) 2285–2293. doi:10.1182/blood-2002-09-2797.
- [228] L.A. Moraes, K.E. Swales, J.A. Wray, A. Damazo, J.M. Gibbins, T.D. Warner, D. Bishop-Bailey, Nongenomic signaling of the retinoid X receptor through binding and inhibiting Gq in human platelets, *Blood.* 109 (2007) 3741–3744. doi:10.1182/blood-2006-05-022566.
- [229] D.M. Ray, S.L. Spinelli, S.J. Pollock, T.I. Murant, J.J. O’Brien, N. Blumberg, C.W. Francis, M.B. Taubman, R.P. Phipps, Peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoid X receptor transcription factors are released from activated human platelets and shed in microparticles, *Thromb. Haemost.* 99 (2008) 86–95. doi:10.1160/TH07-05-0328.

- [230] J.W. Rowley, A.J. Oler, N.D. Tolley, B.N. Hunter, E.N. Low, D.A. Nix, C.C. Yost, G.A. Zimmerman, A.S. Weyrich, Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes, *Blood*. 118 (2011) e101-111. doi:10.1182/blood-2011-03-339705.
- [231] C.Y. Shih, T.C. Chou, The antiplatelet activity of magnolol is mediated by PPAR- β/γ , *Biochem. Pharmacol.* 84 (2012) 793–803. doi:10.1016/j.bcp.2012.06.022.
- [232] A.S. Weyrich, H. Schwertz, L.W. Kraiss, G.A. Zimmerman, Protein synthesis by platelets: Historical and new perspectives, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 241–246. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03211.x.
- [233] G.A. Zimmerman, A.S. Weyrich, Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: New pathways to altered phenotype and function, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) s17-24. doi:10.1161/ATVBAHA.107.160218.
- [234] L. Rivadeneyra, A. Carestia, J. Etulain, R.G. Pozner, C. Fondevila, S. Negrotto, M. Schattner, Regulation of platelet responses triggered by Toll-like receptor 2 and 4 ligands is another non-genomic role of nuclear factor-kappaB, *Thromb. Res.* 133 (2014) 235–243. doi:10.1016/j.thromres.2013.11.028.
- [235] W.J. Lu, K.H. Lin, M.J. Hsu, D.S. Chou, G. Hsiao, J.R. Sheu, Suppression of NF- κ B signaling by andrographolide with a novel mechanism in human platelets: Regulatory roles of the p38 MAPK-hydroxyl radical-ERK2 cascade, *Biochem. Pharmacol.* 84 (2012) 914–924. doi:10.1016/j.bcp.2012.06.030.
- [236] M. Lebois, E.C. Josefsson, Regulation of platelet lifespan by apoptosis, *Platelets*. 27 (2016) 497–504. doi:10.3109/09537104.2016.1161739.
- [237] M.R. Dowling, E.C. Josefsson, K.J. Henley, P.D. Hodgkin, B.T. Kile, Platelet senescence is regulated by an internal timer, not damage inflicted by hits, *Blood*. 116 (2010) 1776–1778. doi:10.1182/blood-2009-12-259663.
- [238] K.D. Mason, M.R. Carpinelli, J.I. Fletcher, J.E. Collinge, A.A. Hilton, S. Ellis, P.N. Kelly, P.G. Ekert, D. Metcalf, A.W. Roberts, D.C.S. Huang, B.T. Kile, Programmed Anuclear Cell Death Delimits Platelet Life Span, *Cell*. 128 (2007) 1173–1186. doi:10.1016/j.cell.2007.01.037.
- [239] M.K. Nayak, P.P. Kulkarni, D. Dash, Regulatory role of proteasome in determination of platelet life span, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 6826–6834. doi:10.1074/jbc.M112.403154.
- [240] M. Paul, K. Kemparaju, K.S. Girish, Inhibition of constitutive NF- κ B activity induces platelet apoptosis via ER stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 493 (2017) 1471–1477. doi:10.1016/j.bbrc.2017.10.011.
- [241] W. Bergmeier, C.L. Piffath, G. Cheng, V.S. Dole, Y. Zhang, U.H. Von Andrian, D.D. Wagner, Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates GPIb α shedding from platelets in vitro and in vivo, *Circ. Res.* 95 (2004) 677–683. doi:10.1161/01.RES.0000143899.73453.11.
- [242] W. Deng, Y. Xu, W. Chen, D.S. Paul, A.K. Syed, M.A. Dragovich, X. Liang, P. Zakas,

- M.C. Berndt, J. Di Paola, J. Ware, F. Lanza, C.B. Doering, W. Bergmeier, X.F. Zhang, R. Li, Platelet clearance via shear-induced unfolding of a membrane mechanoreceptor, *Nat. Commun.* 7 (2016) 12863. doi:10.1038/ncomms12863.
- [243] M.E. Quach, M.A. Dragovich, W. Chen, A.K. Syed, W. Cao, X. Liang, W. Deng, S.F. De Meyer, G. Zhu, J. Peng, H. Ni, C.M. Bennett, M. Hou, J. Ware, H. Deckmyn, X.F. Zhang, R. Li, Fc-independent immune thrombocytopenia via mechanomolecular signaling in platelets, *Blood*. 131 (2018) 787–796. doi:10.1182/blood-2017-05-784975.
- [244] S. Wei, H. Wang, G. Zhang, Y. Lu, X. An, S. Ren, Y. Wang, Y. Chen, J.G. White, C. Zhang, D.I. Simon, C. Wu, Z. Li, Y. Huo, Platelet I κ B kinase- β deficiency increases mouse arterial neointima formation via delayed glycoprotein Ib α shedding, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 (2013) 241–248. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300781.
- [245] Z.A. Karim, J. Zhang, M. Banerjee, M.C. Chicka, R. Al Hawas, T.R. Hamilton, P.A. Roche, S.W. Whiteheart, I κ B kinase phosphorylation of SNAP-23 controls platelet secretion, *Blood*. 121 (2013) 4567–4574. doi:10.1182/blood-2012-11-470468.
- [246] P. Flevaris, Z. Li, G. Zhang, Y. Zheng, J. Liu, X. Du, Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway, *Blood*. 113 (2009) 893–901. doi:10.1182/blood-2008-05-155978.
- [247] J.R. Burke, M.A. Pattoli, K.R. Gregor, P.J. Brassil, J.F. MacMaster, K.W. McIntyre, X. Yang, V.S. Iotzova, W. Clarke, J. Strnad, Y. Qiu, F.C. Zusi, BMS-345541 is a highly selective inhibitor of I κ B kinase that binds at an allosteric site of the enzyme and blocks NF- κ B-dependent transcription in mice, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 1450–1456. doi:10.1074/jbc.M209677200.
- [248] Z.A. Karim, H.P. Vemana, F.T. Khasawneh, MALT1-ubiquitination triggers non-genomic NF- κ B/IKK signaling upon platelet activation, *PLoS One*. 10 (2015) e0119363. doi:10.1371/journal.pone.0119363.
- [249] W.F. Chen, J.J. Lee, C.C. Chang, K.H. Lin, S.H. Wang, J.R. Sheu, Platelet protease-activated receptor (PAR)4, but not PAR1, associated with neutral sphingomyelinase responsible for thrombin-stimulated ceramide-NF- κ B signaling in human platelets, *Haematologica*. 98 (2013) 793–801. doi:10.3324/haematol.2012.072553.
- [250] W.J. Lu, J.J. Lee, D.S. Chou, T. Jayakumar, T.H. Fong, G. Hsiao, J.R. Sheu, A novel role of andrographolide, an NF-kappa B inhibitor, on inhibition of platelet activation: The pivotal mechanisms of endothelial nitric oxide synthase/cyclic GMP, *J. Mol. Med.* 89 (2011) 1261–1273. doi:10.1007/s00109-011-0800-0.
- [251] P. Bugert, A. Dugrillon, A. Günaydin, H. Eichler, H. Klüter, Messenger RNA profiling of human platelets by microarray hybridization, *Thromb. Haemost.* 90 (2003) 738–748. doi:10.1055/s-0037-1613622.
- [252] J.P. McRedmond, S.D. Park, D.F. Reilly, J.A. Coppinger, P.B. Maguire, D.C. Shields, D.J. Fitzgerald, Integration of proteomics and genomics in platelets. A profile of platelet

- proteins and platelet-specific genes, *Mol. Cell. Proteomics*. 3 (2004) 133–144. doi:10.1074/mcp.M300063-MCP200.
- [253] P. Landry, I. Plante, D.L. Ouellet, M.P. Perron, G. Rousseau, P. Provost, Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 961–966. doi:10.1038/nsmb.1651.
- [254] R.I. Gregory, K.P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, R. Shiekhattar, The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs, *Nature*. 432 (2004) 235–240. doi:10.1038/nature03120.
- [255] S. Nagalla, C. Shaw, X. Kong, A.A. Kondkar, L.C. Edelstein, L. Ma, J. Chen, G.S. McKnight, J.A. López, L. Yang, Y. Jin, M.S. Bray, S.M. Leal, J.F. Dong, P.F. Bray, Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity, *Blood*. 117 (2011) 5189–5197. doi:10.1182/blood-2010-09-299719.
- [256] H. Plé, P. Landry, A. Benham, C. Coarfa, P.H. Gunaratne, P. Provost, The Repertoire and Features of Human Platelet microRNAs, *PLoS One*. 7 (2012) e50746. doi:10.1371/journal.pone.0050746.
- [257] A. Osman, K. FÄlker, Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes, *Platelets*. 22 (2011) 433–441. doi:10.3109/09537104.2011.560305.
- [258] X. Ma, L.E. Becker Buscaglia, J.R. Barker, Y. Li, MicroRNAs in NF- κ B signaling, *J. Mol. Cell Biol.* 3 (2011) 159–166. doi:10.1093/jmcb/mjr007.
- [259] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J.J. Lee, J.O. Lötval, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 654–659. doi:10.1038/ncb1596.
- [260] A. Risitano, L.M. Beaulieu, O. Vitseva, J.E. Freedman, Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer, *Blood*. 119 (2012) 6288–6295. doi:10.1182/blood-2011-12-396440.
- [261] J. Li, M. Tan, Q. Xiang, Z. Zhou, H. Yan, Thrombin-activated platelet-derived exosomes regulate endothelial cell expression of ICAM-1 via microRNA-223 during the thrombosis-inflammation response, *Thromb. Res.* 154 (2017) 96–105. doi:10.1016/j.thromres.2017.04.016.
- [262] O.P. Barry, D. Praticò, R.C. Savani, G.A. FitzGerald, Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 136–144. doi:10.1172/JCI2592.
- [263] S. Chhabra, Novel Proteasome Inhibitors and Histone Deacetylase Inhibitors: Progress in Myeloma Therapeutics, *Pharmaceuticals*. 10 (2017) 40. doi:10.3390/ph10020040.
- [264] D. Komander, The emerging complexity of protein ubiquitination, *Biochem. Soc. Trans.* 37 (2009) 937–953. doi:10.1042/BST0370937.

- [265] W. Li, M.H. Bengtson, A. Ulbrich, A. Matsuda, V.A. Reddy, A. Orth, S.K. Chanda, S. Batalov, C.A.P. Joazeiro, Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling, *PLoS One*. 3 (2008) e1487. doi:10.1371/journal.pone.0001487.
- [266] S. Mori, K. Tanaka, S. Omura, Y. Saito, Degradation process of ligand-stimulated platelet-derived growth factor β -receptor involves ubiquitin-proteasome proteolytic pathway, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 29447–29452. doi:10.1074/jbc.270.49.29447.
- [267] J. Adams, The proteasome: Structure, function, and role in the cell, *Cancer Treat. Rev.* 29 (2003) 3–9. doi:10.1016/S0305-7372(03)00081-1.
- [268] A.F. Kisselev, A.L. Goldberg, Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates, *Chem. Biol.* 8 (2001) 739–758. doi:10.1016/S1074-5521(01)00056-4.
- [269] L. Bedford, D. Hay, A. Devoy, S. Paine, D.G. Powe, R. Seth, T. Gray, I. Topham, K. Fone, N. Rezvani, M. Mee, T. Soane, R. Layfield, P.W. Sheppard, T. Ebendal, D. Usoskin, J. Lowe, R.J. Mayer, Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and lewy-like inclusions resembling human pale bodies, *J. Neurosci.* 28 (2008) 8189–8198. doi:10.1523/JNEUROSCI.2218-08.2008.
- [270] A. Mofers, P. Pellegrini, S. Linder, P. D'Arcy, Proteasome-associated deubiquitinases and cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 36 (2017) 635–653. doi:10.1007/s10555-017-9697-6.
- [271] F.E. Reyes-Turcu, K.H. Ventii, K.D. Wilkinson, Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-Specific Deubiquitinating Enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 363–397. doi:10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526.
- [272] A.P. Chandrasekaran, B. Suresh, H.H. Kim, K.S. Kim, S. Ramakrishna, Concise Review: Fate Determination of Stem Cells by Deubiquitinating Enzymes, *Stem Cells*. 35 (2017) 9–16. doi:10.1002/stem.2446.
- [273] L. Kubiczikova, L. Pour, L. Sedlarikova, R. Hajek, S. Sevcikova, Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma, *J. Cell. Mol. Med.* 18 (2014) 947–961. doi:10.1111/jcmm.12279.
- [274] S. Ōmura, A. Crump, Lactacystin: first-in-class proteasome inhibitor still excelling and an exemplar for future antibiotic research, *J. Antibiot. (Tokyo)*. 72 (2019) 189–201. doi:10.1038/s41429-019-0141-8.
- [275] N. Guo, Z. Peng, MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells, *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* 9 (2013) 6–11. doi:10.1111/j.1743-7563.2012.01535.x.
- [276] L. Meng, R. Mohan, B.H.B. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C.M. Crews, Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 10403–10408. doi:10.1073/pnas.96.18.10403.
- [277] A. Craiu, M. Gaczynska, T. Akopian, C.F. Gramm, G. Fenteany, A.L. Goldberg, K.L. Rock, Lactacystin and clasto-lactacystin β -lactone modify multiple proteasome β -subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I

- antigen presentation, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 13437–13445.
doi:10.1074/jbc.272.20.13437.
- [278] R. Prasad, Atul, V.K. Kolla, J. Legac, N. Singhal, R. Navale, P.J. Rosenthal, P.S. Sijwali, Blocking *Plasmodium falciparum* development via dual inhibition of hemoglobin degradation and the ubiquitin proteasome system by MG132., *PLoS One.* 8 (2013) e73530. doi:10.1371/journal.pone.0073530.
- [279] Y.H. Han, H.J. Moon, B.R. You, W.H. Park, The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH, *Oncol. Rep.* 22 (2009) 215–221. doi:10.3892/or_00000427.
- [280] D.J. Dupré, Z. Chen, C. Le Gouill, C. Thériault, J.L. Parent, M. Rola-Pleszczynski, J. Stankova, Trafficking, Ubiquitination, and Down-regulation of the Human Platelet-activating Factor Receptor, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 48228–48235.
doi:10.1074/jbc.M304082200.
- [281] S.J. Saur, V. Sangkhae, A.E. Geddis, K. Kaushansky, I.S. Hitchcock, Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl, *Blood.* 115 (2010) 1254–1263.
doi:10.1182/blood-2009-06-227033.
- [282] H. Ostrowska, C. Wojcik, S. Omura, K. Worowski, Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1997) 729–732. doi:10.1006/bbrc.1997.6434.
- [283] A. Nencioni, F. Grünebach, F. Patrone, A. Ballestrero, P. Brossart, Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond, *Leukemia.* 21 (2007) 30–36. doi:10.1038/sj.leu.2404444.
- [284] M.K. Nayak, K. Kumar, D. Dash, Regulation of proteasome activity in activated human platelets, *Cell Calcium.* 49 (2011) 226–232. doi:10.1016/j.ceca.2011.02.005.
- [285] A. V. Gasparian, O.A. Guryanova, D. V. Chebotaev, A.A. Shishkin, A.Y. Yemelyanov, I. V. Budunova, Targeting transcription factor NF κ B: Comparative analysis of proteasome and IKK inhibitors, *Cell Cycle.* 8 (2009) 1559–1566. doi:10.4161/cc.8.10.8415.
- [286] Z.J. Chen, T. Maniatis, Role of the Ubiquitin—Proteasome Pathway in NF- κ B Activation, in: *Ubiquitin Biol. Cell*, Springer US, 1998: pp. 303–322. doi:10.1007/978-1-4899-1922-9_10.
- [287] S. Sacconi, I. Marazzi, A.A. Beg, G. Natoli, Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor κ B response, *J. Exp. Med.* 200 (2004) 107–113. doi:10.1084/jem.20040196.
- [288] P. Collins, I. Mitxitorena, R. Carmody, The Ubiquitination of NF- κ B Subunits in the Control of Transcription, *Cells.* 5 (2016) 23. doi:10.3390/cells5020023.
- [289] C.Y. Sasaki, T.J. Barberi, P. Ghosh, D.L. Longo, Phosphorylation of Re1A/p65 on serine 536 defines an I κ B α - independent NF- κ B pathway, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 34538–34547. doi:10.1074/jbc.M504943200.

- [290] B.F. Kraemer, A.S. Weyrich, S. Lindemann, Protein degradation systems in platelets, *Thromb. Haemost.* 110 (2013) 920–924. doi:10.1160/TH13-03-0183.
- [291] M. Yukawa, M. Sakon, J. Kambayashi, E. Shiba, T. Kawasaki, H. Ariyoshi, T. Mori, Proteasome and its novel endogeneous activator in human platelets., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178 (1991) 256–62. doi:10.1016/0006-291x(91)91807-o.
- [292] H. Ostrowska, J.K. Ostrowska, K. Worowski, P. Radziwon, Human platelet 20S proteasome: inhibition of its chymotrypsin-like activity and identification of the proteasome activator PA28. A preliminary report., *Platelets.* 14 (2003) 151–157. doi:10.1080/0953710031000092802.
- [293] C. Klockenbusch, G.M. Walsh, L.M. Brown, M.D. Hoffman, V. Ignatchenko, T. Kislinger, J. Kast, Global proteome analysis identifies active immunoproteasome subunits in human platelets, *Mol. Cell. Proteomics.* 13 (2014) 3308–3319. doi:10.1074/mcp.M113.031757.
- [294] N. Gupta, W. Li, B. Willard, R.L. Silverstein, T.M. McIntyre, Proteasome proteolysis supports stimulated platelet function and thrombosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34 (2014) 160–168. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302116.
- [295] A.J. Unsworth, I. Bombik, A. Pinto-Fernandez, J.F. McGouran, R. Konietzny, R.P. Zahedi, S.P. Watson, B.M. Kessler, C.J. Pears, Human Platelet Protein Ubiquitylation and Changes following GPVI Activation, *Thromb. Haemost.* 119 (2019) 104–116. doi:10.1055/s-0038-1676344.
- [296] N. Gupta, W. Li, T.M. McIntyre, Deubiquitinases Modulate Platelet Proteome Ubiquitination, Aggregation, and Thrombosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35 (2015) 2657–2666. doi:10.1161/ATVBAHA.115.306054.
- [297] J. Koessler, J. Etzel, K. Weber, M. Boeck, A. Kobsar, Evaluation of dose-dependent effects of the proteasome inhibitor bortezomib in human platelets, *Eur. J. Pharmacol.* 791 (2016) 99–104. doi:10.1016/j.ejphar.2016.08.031.
- [298] M.E. Pereira, S. Wilk, Phosphorylation of the multicatalytic proteinase complex from bovine pituitaries by a copurifying cAMP-dependent protein kinase, *Arch. Biochem. Biophys.* 283 (1990) 68–74. doi:10.1016/0003-9861(90)90613-4.
- [299] K. Tanaka, A. Ichihara, Proteasomes (Multicatalytic Proteinase Complexes) in Eukaryotic Cells, *Cell Struct. Funct.* 15 (1990) 127–132. doi:10.1247/csf.15.127.
- [300] M. Orłowski, The Multicatalytic Proteinase Complex, a Major Extralysosomal Proteolytic System, *Biochemistry.* 29 (1990) 10289–10297. doi:10.1021/bi00497a001.
- [301] J. Driscoll, A.L. Goldberg, Skeletal muscle proteasome can degrade proteins in an ATP-dependent process that does not require ubiquitin., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 787–91. doi:10.1073/pnas.86.3.787.
- [302] M. Yukawa, M. Sakon, J.I. Kambayashi, E.I. Shiba, T. Kawasaki, Y. Uemura, R. Murata, T. Tanaka, T. Nakayama, H. Shibata, T. Mori, Purification and characterization of

- endogenous protein activator of human platelet proteasome, *J. Biochem.* 114 (1993) 317–323. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124174.
- [303] O. Coux, K. Tanaka, A.L. Goldberg, Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes, *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 801–847. doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.004101.
- [304] T. Caravita, P. de Fabritiis, A. Palumbo, S. Amadori, M. Boccadoro, Bortezomib: Efficacy comparisons in solid tumors and hematologic malignancies, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 3 (2006) 374–387. doi:10.1038/ncponc0555.
- [305] S. Lonial, E.K. Waller, P.G. Richardson, S. Jagannath, R.Z. Orlowski, C.R. Giver, D.L. Jaye, D. Francis, S. Giusti, C. Torre, B. Barlogie, J.R. Berenson, S. Singhal, D.P. Schenkein, D.L.W. Esseltine, J. Anderson, H. Xiao, L.T. Heffner, K.C. Anderson, Risk factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed, refractory multiple myeloma, *Blood.* 106 (2005) 3777–3784. doi:10.1182/blood-2005-03-1173.
- [306] K. Murai, S. Kowata, T. Shimoyama, A. Yashima-Abo, Y. Fujishima, S. Ito, Y. Ishida, Bortezomib induces thrombocytopenia by the inhibition of proplatelet formation of megakaryocytes, *Eur. J. Haematol.* 93 (2014) 290–296. doi:10.1111/ejh.12342.
- [307] D.S. Shi, M.C.P. Smith, R.A. Campbell, P.W. Zimmerman, Z.B. Franks, B.F. Kraemer, K.R. Machlus, J. Ling, P. Kamba, H. Schwertz, J.W. Rowley, R.R. Miles, Z.J. Liu, M. Sola-Visner, J.E. Italiano, H. Christensen, W.H.A. Kahr, D.Y. Li, A.S. Weyrich, Proteasome function is required for platelet production, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 3757–3766. doi:10.1172/JCI75247.
- [308] J.C. Yui, J. Van Keer, B.M. Weiss, A.J. Waxman, M.B. Palmer, V.D. D’Agati, E. Kastiris, M.A. Dimopoulos, R. Vij, D. Bansal, D. Dingli, S.H. Nasr, N. Leung, Proteasome inhibitor associated thrombotic microangiopathy, *Am. J. Hematol.* 91 (2016) E348–E352. doi:10.1002/ajh.24447.
- [309] B.F. Kraemer, A.S. Weyrich, Insight Increased formation of PaCSs in megakaryocytes and platelets from patients with autosomal-dominant ANKRD26-related thrombocytopenia: Polyubiquitinated protein depots in platelets and megakaryocytes from patients with ANKRD26-RT, *Thromb. Haemost.* 109 (2012) 180. doi:10.1160/TH13-01-0025.
- [310] K. Grundler Groterhorst, H. Mannell, J. Pircher, B.F. Kraemer, Platelet Proteasome Activity and Metabolism Is Upregulated during Bacterial Sepsis, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 5961. doi:10.3390/ijms20235961.
- [311] S.K. NaveenKumar, M. Hemshekhar, K. Kemparaju, K.S. Girish, Hemin-induced platelet activation and ferroptosis is mediated through ROS-driven proteasomal activity and inflammasome activation: Protection by Melatonin, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1865 (2019) 2303–2316. doi:10.1016/j.bbadis.2019.05.009.
- [312] C. Banfi, M. Brioschi, G. Marenzi, M. De Metrio, M. Camera, L. Mussoni, E. Tremoli,

- Proteome of platelets in patients with coronary artery disease, *Exp. Hematol.* 38 (2010) 341–350. doi:10.1016/j.exphem.2010.03.001.
- [313] V. Necchi, A. Balduini, P. Noris, S. Barozzi, P. Sommi, C. di Buduo, C.L. Balduini, E. Solcia, A. Pecci, Ubiquitin/proteasome-rich particulate cytoplasmic structures (PaCSs) in the platelets and megakaryocytes of ANKRD26-related thrombocytopenia, *Thromb. Haemost.* 109 (2013) 263–271. doi:10.1160/TH12-07-0497.
- [314] S. Srikanthan, W. Li, R.L. Silverstein, T.M. McIntyre, Exosome poly-ubiquitin inhibits platelet activation, downregulates CD36 and inhibits pro-atherothrombotic cellular functions, *J. Thromb. Haemost.* 12 (2014) 1906–1917. doi:10.1111/jth.12712.
- [315] J. Koessler, A. Schuepferling, P. Klingler, A. Koessler, K. Weber, M. Boeck, A. Kobsar, The role of proteasome activity for activating and inhibitory signalling in human platelets, *Cell. Signal.* 62 (2019) 109351. doi:10.1016/j.cellsig.2019.109351.
- [316] W.B. Mitchell, J. Li, D.L. French, B.S. Coller, α Ib β 3 biogenesis is controlled by engagement of α Ib in the calnexin cycle via the N15-linked glycan, *Blood.* 107 (2006) 2713–2719. doi:10.1182/blood-2005-07-2990.
- [317] F. Avcu, A.U. Ural, T. Cetin, O. Nevruz, Effects of bortezomib on platelet aggregation and ATP release in human platelets, *in vitro*, *Thromb. Res.* 121 (2008) 567–571. doi:10.1016/j.thromres.2007.06.013.
- [318] L. Zhang, Z.G. Zhang, X. Liu, A. Hozeska, N. Stagliano, W. Riordan, M. Lu, M. Chopp, Treatment of embolic stroke in rats with bortezomib and recombinant human tissue plasminogen activator, *Thromb. Haemost.* 95 (2006) 166–173. doi:10.1160/TH05-07-0477.
- [319] K. Grundler, R. Rotter, S. Tilley, J. Pircher, T. Czermak, M. Yakac, E. Gaitzsch, S. Massberg, F. Krötz, H.-Y.Y. Sohn, U. Pohl, H. Mannell, B.F. Kraemer, The proteasome regulates collagen-induced platelet aggregation via nuclear-factor-kappa-B (NF κ B) activation, *Thromb. Res.* 148 (2016) 15–22. doi:10.1016/j.thromres.2016.10.009.
- [320] J.K. Ostrowska, M.Z. Wojtukiewicz, E. Chabielska, W. Buczko, H. Ostrowska, Proteasome inhibitor prevents experimental arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats, *Thromb. Haemost.* 92 (2004) 171–7. doi:10.1160/TH03-11-0707.
- [321] C.A. Dangelmaier, P.G. Quinter, J. Jin, A.Y. Tsygankov, S.P. Kunapuli, J.L. Daniel, Rapid ubiquitination of Syk following GPVI activation in platelets, *Blood.* 105 (2005) 3918–3924. doi:10.1182/blood-2004-09-3689.
- [322] J. Saad, L. Schoenberger, *Physiology, Platelet Activation*, StatPearls Publishing, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29494085> (accessed March 7, 2020).
- [323] J. Meyer, K. Arps, R.S. Blumenthal, S.S. Martin, New Data on Aspirin Use in the Era of More Widespread Statin Use, *Am. Coll. Cardiol.* (2018). <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/articles/2018/09/28/08/08/new-data-on-aspirin-use-in-the-era-of-more-widespread-statin-use> (accessed March 6, 2020).

- [324] M. Pareek, D.L. Bhatt, Aspirin Resistance in Patients With Type 2 DM, *Am. Coll. Cardiol.* (2017). <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/articles/2017/06/21/08/35/aspirin-resistance-in-patients-with-type-2-dm> (accessed March 7, 2020).
- [325] J.E. Dalen, Aspirin Resistance: Is it Real? Is it Clinically Significant?, *Am. J. Med.* 120 (2007) 1–4. doi:10.1016/j.amjmed.2006.08.023.
- [326] C.N. Floyd, A. Ferro, Mechanisms of aspirin resistance, *Pharmacol. Ther.* 141 (2014) 69–78. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.08.005.
- [327] N. Auphan, J.A. DiDonato, C. Rosette, A. Helmberg, M. Karin, Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis, *Science* (80-.). 270 (1995) 286–290. doi:10.1126/science.270.5234.286.
- [328] C.-W. Hsia, M.-P. Wu, M.-Y. Shen, C.-H. Hsia, C.-L. Chung, J.-R. Sheu, Regulation of Human Platelet Activation and Prevention of Arterial Thrombosis in Mice by Auraptene through Inhibition of NF- κ B Pathway, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 4810. doi:10.3390/ijms21134810.
- [329] C.C. Chang, W.J. Lu, E.T. Ong, C.W. Chiang, S.C. Lin, S.Y. Huang, J.R. Sheu, A novel role of sesamol in inhibiting NF- κ B-mediated signaling in platelet activation, *J. Biomed. Sci.* 18 (2011) 93. doi:10.1186/1423-0127-18-93.
- [330] Z. Chen, J. Hagler, V.J. Palombella, F. Melandri, D. Seherer, D. Ballard, T. Maniatis, Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway, *Genes Dev.* 9 (1995). doi:10.1101/gad.9.13.1586.
- [331] K. Suzuki, I.M. Verma, Phosphorylation of SNAP-23 by I κ B Kinase 2 Regulates Mast Cell Degranulation, *Cell.* 134 (2008) 485–495. doi:10.1016/j.cell.2008.05.050.
- [332] D. Varga-Szabo, A. Braun, B. Nieswandt, Calcium signaling in platelets, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 1057–1066. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x.
- [333] K. Gründler, Regulation and function of the proteasome in human platelets, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2015. https://edoc.ub.uni-muenchen.de/18280/1/Gruendler_Katharina.pdf (accessed December 10, 2018).
- [334] M. Canault, D. Duerschmied, A. Brill, L. Stefanini, D. Schatzberg, S.M. Cifuni, W. Bergmeier, D.D. Wagner, p38 mitogen-activated protein kinase activation during platelet storage: Consequences for platelet recovery and hemostatic function in vivo, *Blood.* 115 (2010) 1835–1842. doi:10.1182/blood-2009-03-211706.
- [335] P. Damien, F. Cognasse, B. Payrastre, S.L. Spinelli, N. Blumberg, C.A. Arthaud, M.A. Eyraud, R.P. Phipps, A. McNicol, B. Pozzetto, O. Garraud, H. Hamzeh-Cognasse, NF- κ B links TLR2 and PAR1 to soluble immunomodulator factor secretion in human platelets, *Front. Immunol.* 8 (2017) 85. doi:10.3389/fimmu.2017.00085.
- [336] M.E. Bertagnolli, S.J. Locke, M.E. Hensler, P.F. Bray, M.C. Beckerle, Talin distribution and phosphorylation in thrombin-activated platelets, *J. Cell Sci.* 106 (1993) 1189–1199.

- [337] B.L. Tang, A unique SNARE machinery for exocytosis of cytotoxic granules and platelets granules, *Mol. Membr. Biol.* 32 (2015) 120–126. doi:10.3109/09687688.2015.1079934.
- [338] S. Ye, Z.A. Karim, R. Al Hawas, J.E. Pessin, A.H. Filipovich, S.W. Whiteheart, Syntaxin-11, but not syntaxin-2 or syntaxin-4, is required for platelet secretion, *Blood*. 120 (2012) 2484–2492. doi:10.1182/blood-2012-05-430603.
- [339] J.L. Fitch-Tewfik, R. Flaumenhaft, Platelet granule exocytosis: A comparison with chromaffin cells, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4 (2013). doi:10.3389/fendo.2013.00077.
- [340] S. Chakrabarti, S. Varghese, O. Vitseva, K. Tanriverdi, J.E. Freedman, CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 2428–34. doi:10.1161/01.ATV.0000184765.59207.f3.

Annexe I



**INSTITUT DE
CARDIOLOGIE
DE MONTRÉAL**



APPROUVÉ / APPROVED
Comité d'éthique ICM
MHI – Research Ethics Board
Date : 23 février 2017

FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT

PROJET DE RECHERCHE : ICM # 01-406 (01-069)

Isolation et étude des cellules sanguines humaines provenant de sujets sains

Investigateurs

Yahye Merhi, Ph.D.

Martin G. Sirois, Ph.D. et Catherine Martel Ph.D.

Organismes subventionnaires

Les projets de recherche sont financés par des organismes subventionnaires et/ou le Fonds de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal octroyés aux investigateurs.

PRÉAMBULE¹

Nous vous invitons à participer à ce projet de recherche parce que vous êtes en bonne santé et que nous souhaitons mener des recherches sur le sang recueilli de personnes saines. Vous êtes entièrement libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche.

Avant d'accepter de participer à ce projet et de signer ce formulaire d'information et de consentement, veuillez prendre le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent.

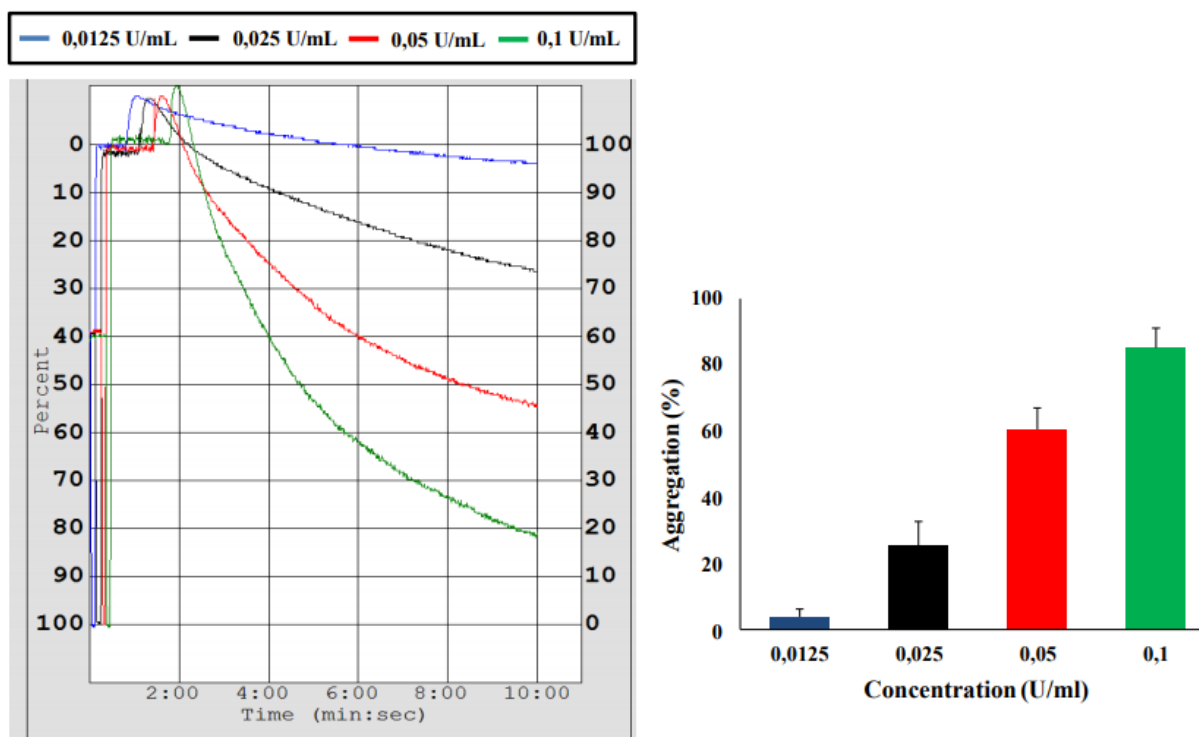
Ce formulaire peut contenir des mots que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions que vous jugerez utiles au chercheur responsable du projet ou aux autres membres du personnel affectés au projet de recherche et à leur demander de vous expliquer tout mot ou renseignement qui n'est pas clair.

NATURE ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'études fondamentales qui visent à déterminer l'implication des cellules sanguines dans les maladies cardiovasculaires et les autres pathologies associées aux maladies du cœur et des vaisseaux. Afin de faire avancer la recherche dans le domaine de la coagulation sanguine, de l'inflammation et de la biologie des vaisseaux sanguins, ces études novatrices réalisées *in vitro* dans nos

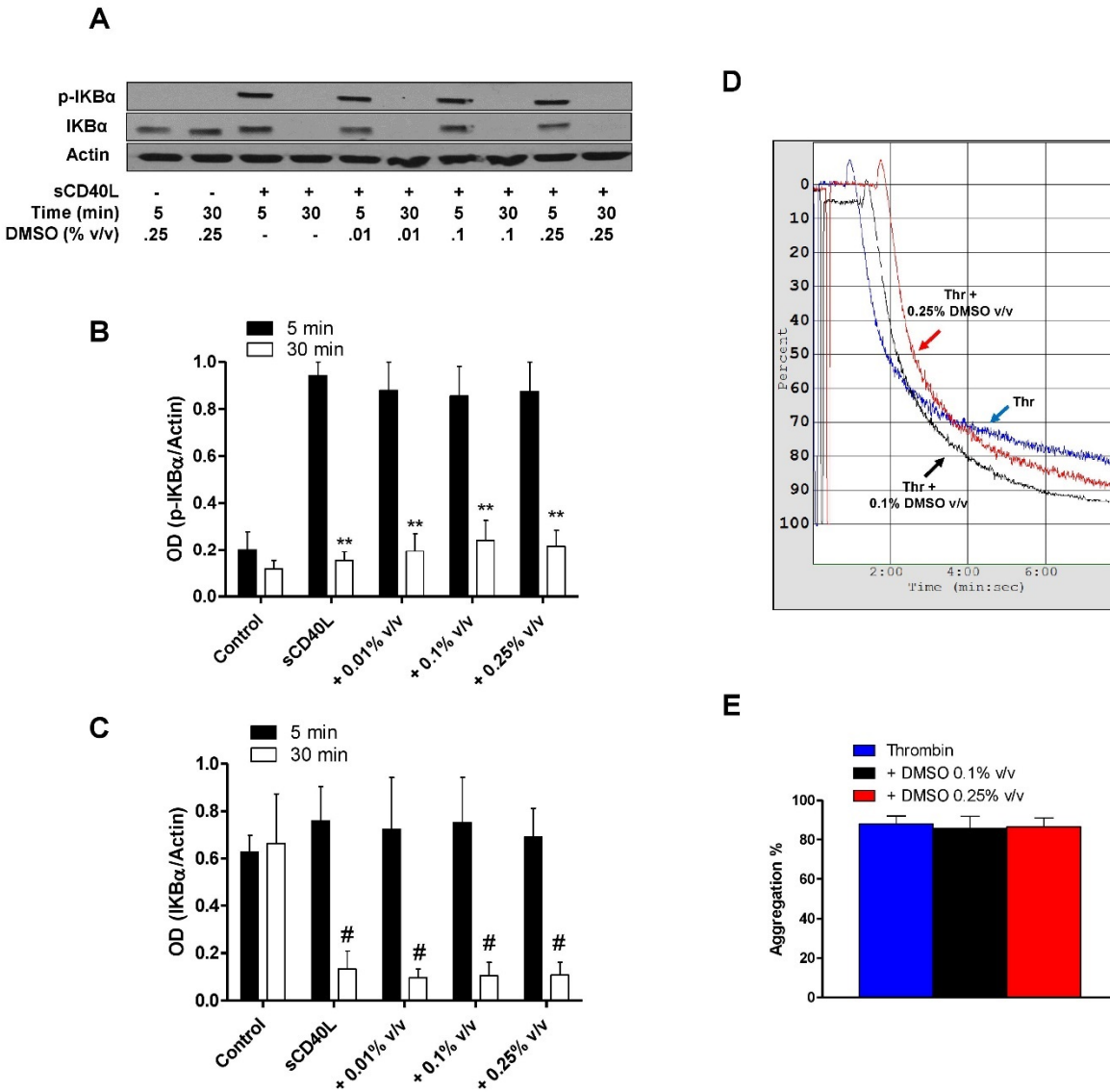
¹ Le genre masculin, employé pour alléger le texte, désigne autant les femmes que les hommes.

Annexe II



Courbe dose-réponse de l'agrégation plaquettaire en réponse à la thrombine. Les plaquettes humaines lavées ($250 \times 10^6/\text{ml}$) ont été stimulées avec quatre doses de thrombine : 0,0125 U/ml, 0,025 U/ml, 0,05 U/ml et 0,1 U/ml ($n = 25$, moyenne \pm SEM) [172].

Annexe III



Les effets du DMSO sur la dégradation d'IκBα et l'agrégation plaquettaire. (A) Les plaquettes humaines lavées ($10^9/\text{ml}$) ont été prétraitées avec DMSO (0.001%, 0.1%, ou 0.25% v/v) puis amorcées par le sCD40L (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pendant 5 ou 30 minutes ($n=3$). Les lysats plaquettaires ont été séparés par SDS-PAGE 10% pour étudier l'expression de p-IκBα et d'IκBα. Les transferts d'IκBα proviennent des membranes dénudées de p-IκBα. Les transferts d'actine, utilisés comme contrôle de charge, proviennent des membranes dénudées utilisées pour les empreintes de p-IκBα et d'IκBα. Les histogrammes représentent la moyenne des données de transfert de (B) p-IκBα et (C) d'IκBα normalisées à l'actine et exprimées en OD (moyenne \pm SEM). ** $P < 0,001$ # $P < 0,05$ (vs. 5 min) (ANOVA à deux voies). (D) Les plaquettes humaines lavées ($250 \times 10^6/\text{ml}$) ont été prétraitées avec du DMSO (0,1% ou 0.25% v/v) pendant 10 min puis contrôlées pour l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine (0,1 U/ml). (E) L'histogramme représente la moyenne du pourcentage d'agrégation ($n=3$, moyenne \pm SEM) obtenue à partir de la courbe d'agrégation présentée en D.