



# THESE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier  
Discipline ou spécialité : *Physiopathologie*

---

**Présentée et soutenue par** Thibault LHERMUSIER  
Le 5 janvier 2012

**Titre :**  
*Régulation plaquettaire : Ciblage de la protéine kinase Syk dans les HIT et rôle du transporteur lipidique ABCA1 dans les fonctions plaquettaires.*

---

### JURY

Pr. Bertrand Perret  
Pr. Françoise Dignat-George, Rapporteur  
Dr. Jean-Max Pasquet, Rapporteur  
Dr Christian Gachet, Examineur  
Pr Pierre Sié, Examineur  
Pr Bernard Payrastra, Directeur de thèse

---

**Ecole doctorale :** *Biologie, Santé, Biotechnologies de Toulouse*  
**Unité de recherche :** *INSERM U1048*  
**Directeur(s) de Thèse :** *Pr. Bernard Payrastra*  
**Rapporteurs :** *Pr. Françoise Dignat-George et Pr. Jean Max Pasquet*

# Remerciements

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail :

Merci au Professeur Bertrand Perret d'avoir accepté de présider ce jury. Mes premières années de Médecine ont été marquées par votre enseignement en Biochimie. Votre présence m'honore.

Merci au Professeur Françoise Dignat-George d'avoir pris le temps de lire et juger ce travail.

Merci au Docteur Jean Max Pasquet d'avoir accepté d'évaluer cette thèse en qualité de rapporteur.

Merci au Docteur Christian Gachet d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail de thèse.

Merci au Professeur Pierre Sié d'avoir accepté de juger ce travail dont il est en partie à l'origine. Je souhaite que notre collaboration étroite entre les services de cardiologie et d'hémostase se poursuive.

Merci au Professeur Bernard Payrastre pour son encadrement scientifique et ses conseils. Ton perfectionnisme et ton abnégation sont un modèle pour moi.

Ces années, enrichissantes et difficiles, sont à l'origine d'une expérience sans pareil. Difficiles parce qu'il est douloureux pour le clinicien que je suis de s'éloigner des patients et de se plonger dans le casse tête chinois de la science.

Enrichissantes car j'ai découvert la rigueur et l'exigence de la recherche au sein d'une équipe dynamique et chaleureuse. Vous m'avez aussi montré le plaisir d'avancer dans ce monde complexe mais passionnant qu'est la recherche.

Mes remerciements vont bien sûr à Bernard Payrastre pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe et dans son bureau.

Travailler à tes côtés m'a permis de répondre à des questions centrales qui animent l'équipe au cours de tes absences (rares) : Il n'est pas là Bernard ? A quelle heure revient-il ? Est-il là demain ? Ceci souligne à quel point ton avis et tes conseils sont recherchés au sein de cette équipe. Je reste impressionné par l'étendue de tes connaissances et ta capacité à les mobiliser. J'admire ton « bon sens paysan » dans la science, je pense que tu apprécieras le terme.

Je remercie tous les membres de l'équipe plaquette qui ont donné (beaucoup) de leur temps et parfois (un peu) de leur sang pour faire avancer ce projet.

Cédric, ton esprit aiguisé et ta gentillesse sans limite m'ont beaucoup aidé.

Gaëtan, j'ai pu apprécié ton ardeur et ta rigueur au travail. Il est agréable de travailler à tes côtés.

Ashraf, ton expérience m'a été d'une grande aide.

Bien évidemment, je remercie Marie Pierre Gratacap qui m'a initié à la préparation des plaquettes, petits êtres parfois bien capricieux, et dont les conseils ont été particulièrement utiles à mes travaux.

Merci à Sonia pour son dynamisme et sa générosité.

Merci à Valérie et Marie Cécile.

Mes remerciements vont également à Jérôme VR qui s'est largement investi dans ces travaux. Au delà de notre amitié, j'espère que nous aurons la possibilité de continuer à travailler ensemble.

Je remercie le service de Cardiologie de Rangueil. Bien que cet investissement ait perturbé mon activité hospitalière, vous avez su garder une attitude bienveillante et continué à m'encourager.

Léopold, Gaspard et Anselme, mes pierres précieuses.

Emilie, toujours à mes côtés au soleil et dans la tempête, à la ville et à la montagne. Le skipper de la famille.

A ma cabane au Canada, avec toi bien sûr.

Aux amis de toujours et pour toujours, Nicolas, Yann, Anaïs, Xavier et Caroline. Ma deuxième famille.

Mes remerciements vont aussi à mes parents pour leur amour et à ma belle famille pour son soutien et ses encouragements.

## RESUME

Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité vasculaire. Outre leur rôle physiologique conduisant à la formation du clou hémostatique en cas de brèche vasculaire, elles sont impliquées dans des pathologies thrombotiques comme l'athérombose ou les thrombopénies induites par l'héparine (TIH), ce qui en fait des cibles pharmacologiques de choix dans ces situations. Nous avons étudié les mécanismes mis en jeu par les plaquettes dans deux situations pathologiques ; les TIH avec la tyrosine kinase Syk comme acteur majeur et la maladie de Tangier résultant d'une mutation perte de fonction du transporteur de lipide ABCA1.

Les TIH sont des complications rares mais graves des traitements à l'héparine dues au développement d'anticorps dirigés contre le complexe héparine-facteur 4 plaquettaire (PF4). Ces anticorps induisent la clairance des plaquettes (thrombopénie) et activent les récepteurs Fc à la surface des plaquettes (FcγRIIA) et des monocytes (FcγRI et FcγRII) conduisant à l'agrégation plaquettaire et l'expression du facteur tissulaire par les monocytes responsable des complications thrombotiques. Nous montrons que Syk est une kinase essentielle à l'activation des plaquettes (signalisation, sécrétion, agrégation, microparticules) par les anticorps dirigés contre le complexe héparine-PF4 présents dans le sérum de patients atteints de TIH. Parallèlement, l'inhibition de Syk bloque fortement l'expression du facteur tissulaire et l'activité procoagulante des monocytes induites par les anticorps TIH. Les inhibiteurs de Syk, en développement clinique avancé en immunothérapie, apparaissent donc prometteurs dans le traitement des TIH.

ABCA1 est impliqué dans le transport réverse du cholestérol et de phospholipides vers les lipoprotéines de haute densité. Son déficit est associé à de profondes anomalies du bilan lipidique mais aussi à un phénotype hémorragique. Grâce à un modèle de souris déficientes en ABCA1, nous avons caractérisé son rôle dans l'activation plaquettaire. Contrairement à ce que l'on aurait pu penser, ABCA1 n'est pas impliqué dans l'exposition des phosphatidylsérines et l'activité procoagulante des plaquettes activées, et ne régule pas le contenu en cholestérol des membranes plaquettaires. Par contre, un défaut de taille des plaquettes et de leurs réponses fonctionnelles sont observés en son absence. ABCA1 apparaît comme un régulateur des mécanismes de signalisation pouvant expliquer le phénotype hémorragique rapporté dans la maladie de Tangier.

L'ensemble de ces travaux a permis de caractériser des acteurs moléculaires de l'activation plaquettaire dans des situations pathologiques et de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## ABSTRACT

Platelet activation at sites of vascular injury is essential for haemostasis. Next to this critical role in bleeding arrest, platelets are involved in thrombotic diseases such as atherothrombosis or heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Therefore, they are targets of antithrombotic therapies. We have studied the mechanisms of platelet activation in two pathological situations; HIT with the tyrosine kinase Syk as a key player and Tangier disease resulting of a loss of function of the ABCA1 lipid transporter. HIT is a prothrombotic and potentially devastating complication of heparin therapy due to formation of platelet-activating antibodies directed against complexes of platelet factor 4 (PF4) and heparin. These antibodies contribute to clear platelet from the circulation and activate, by their Fc fragment, Fc $\gamma$ RIIA receptors on platelet surface or Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RII receptors on monocyte, leading to platelet aggregation and tissue factor expression by monocytes. We have shown that Syk activation is crucial for platelet activation (signalization, secretion, aggregation, microparticle generation) initiated by anti-PF4/heparin antibodies from sera of patients suffering from HIT. Interestingly, Syk inhibition also prevented tissue factor expression and procoagulant activity of monocyte cells induced by these antibodies. We propose that Syk inhibitors, initially developed as a potential treatment of autoimmune disease, may be of therapeutic interest in the treatment of HIT.

ABCA1 has been demonstrated to be crucial in the reverse cholesterol transport pathway by loading cholesterol and phospholipids into ApoA-I to generate high density lipoproteins. Its defect is associated to circulating lipid disturbance but also to hemorrhagic diathesis. Surprisingly, using ABCA1 knock-out mice, we have demonstrated that this transporter is neither implicated in phosphatidylserine exposure, a mechanism leading to the procoagulant activity of activated platelets, nor in the control of platelet membranes cholesterol content. However, mouse platelets deficient for ABCA1 have an increased size and a defect in response to low doses of agonists such as thrombin and collagen. Our data indicate that ABCA1 is involved in the efficiency of platelet signal transduction, particularly in the activation of Akt.

These studies have characterized key players of platelet activation and suggest new strategies in the development of antithrombotic therapies.

# Sommaire

<b>Table des illustrations</b> .....	<b>4</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>5</b>
<b>Partie 1 : Revue bibliographique</b> .....	<b>7</b>
<b>Chapitre 1 Présentation générale des plaquettes sanguines.</b> .....	<b>8</b>
I. Morphologie et caractéristique des plaquettes sanguines.....	8
A. L'asymétrie de la membrane plasmique plaquettaire : régulation et rôle de l'exposition des PS dans la coagulation .....	9
1. Régulation de l'asymétrie de la membrane plasmique .....	9
2. Rôle de l'exposition des PS dans la coagulation .....	11
<b>Review Article : Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the             characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein             mutated in Scott syndrome.</b> .....	<b>13</b>
B. Les organelles plaquettaires.....	15
1. Les granules denses, $\alpha$ et les lysosomes .....	15
2. Les mitochondries.....	16
C. Impact des lipides circulants sur la réactivité plaquettaire .....	17
II. Les grandes étapes de l'activation plaquettaire lors d'une lésion vasculaire. ...	18
A. Les principales protéines adhésives et leurs récepteurs.....	20
1. Le vWF et son récepteur le complexe GPIb-IX-V .....	20
2. Le collagène et ses récepteurs, l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ et GPVI .....	23
3. La fibronectine .....	28
4. Le fibrinogène .....	28
B. Les agonistes solubles et leurs récepteurs .....	29
1. La thrombine et ses récepteurs.....	29
2. Le Thromboxane A2 et ses récepteurs .....	31
3. L'ADP et ses récepteurs .....	32
4. Le fragment Fc des Ig et le récepteur Fc $\gamma$ RIIa .....	33
C. Les voies de signalisation intraplaquettaires .....	34
1. Voies de signalisation dépendantes des protéines G hétérotrimériques.....	34
2. Voies de signalisation dépendantes des ITAM – l'exemple de Fc $\gamma$ RIIa.....	36
D. L'intégrine $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et la signalisation « inside-out » et « outside-in » .....	38
1. L'intégrine $\alpha$ IIb $\beta$ 3 .....	38
2. La signalisation « inside-out ».....	39
3. La signalisation « outside-in ».....	41

<b>Chapitre 2 : Le transporteur ABCA1 .....</b>	<b>42</b>
I. Présentation des transporteurs ABC .....	42
A. Appartenance à la superfamille des transporteurs ABC .....	43
1. La présence de motifs spécifiques de la famille des ABC .....	43
2. Une double activité moléculaire.....	43
3. Une organisation en domaines .....	43
II. Structure du transporteur ABCA1.....	43
III. Expression et distribution tissulaire de ABCA1.....	44
IV. Fonction.....	44
V. ABCA1 et maladie de Tangier .....	47
A. Phénotype de la maladie de Tangier .....	47
B. Génétique de la maladie de Tangier .....	47
VI. Rôle de ABCA1 dans l'exposition des PS ? .....	48
VII. ABCA1 et signalisation .....	48
<b>Chapitre 3 : La plaquette en pathologie humaine.....</b>	<b>50</b>
I. Plaquette et athéromatose.....	50
A. Rôle des plaquettes dans l'athérogénèse et dans l'inflammation.....	50
B. La plaquette comme cible antithrombotique .....	51
1. Médicaments antithrombotiques d'aujourd'hui .....	51
a. Aspirine.....	51
b. Inhibiteurs du récepteur P2Y <sub>12</sub> .....	52
<i>Clopidogrel</i> .....	52
<i>Prasugrel</i> .....	54
<i>Ticagrelor</i> .....	54
<i>Elinogrel</i> .....	54
c. Anti-GP IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ).....	54
2. Les nouvelles cibles antithrombotiques .....	55
a. La voie du TXA <sub>2</sub> .....	55
b. La voie de la thrombine .....	55
c. La voie du collagène.....	55
C. Plaquettes et développement de thérapies ciblant les acteurs de la signalisation.....	56
<b>Review Article : Targeted drug therapy: the platelet side.....</b>	<b>57</b>
<b>Review Article : Nouvelles molécules ciblées et modulation des fonctions plaquettaires : anticiper, démontrer, gérer, utiliser .....</b>	<b>58</b>

II. Plaquette et thrombopénie immunoallergique à l'héparine.....	59
A. Epidémiologie .....	59
B. Aspects cliniques .....	59
C. Physiopathologie.....	62
1. Le facteur 4 plaquettaire (PF4) .....	62
a. PF4 et thrombose.....	62
b. PF4 et chémotactisme .....	63
2. Interactions héparine – PF4 .....	63
3. Réponse immunitaire.....	64
4. Activation plaquettaire par les anticorps anti PF4 .....	64
<b>Partie 2 : Résultats.....</b>	<b>67</b>
<b>ARTICLE 1 : ABCA1 deficiency affects platelet activation and signaling but spares calcium-induced PS exposure and platelet lipid composition .....</b>	<b>68</b>
I. Introduction.....	69
II. Discussion et perspectives.....	71
<b>ARTICLE 2 : The Syk-kinase inhibitor R406 impairs platelet activation and monocyte tissue factor expression triggered by heparin-PF4 complex directed antibodies .....</b>	<b>77</b>
I. Introduction.....	78
II. Discussion et perspectives.....	80
<b>Partie 3 : Conclusion générale .....</b>	<b>83</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>86</b>



## Table des illustrations

Figure 1 : forme typique « discoïde » des plaquettes de souris au repos (A) et modifications de forme induites par la stimulation (B).....	8
Figure 2 : Organisation générale des membranes plaquettaires et représentation schématique des différentes protéines membranaires impliquées dans l'asymétrie membranaire. ....	10
Figure 3 : Représentation schématique de la structure de la plaquette et des principaux récepteurs membranaires. ....	16
Figure 4 : Résumé des grandes étapes de l'activation plaquettaire lors d'une brèche de la paroi vasculaire dans des conditions de flux artériel .....	19
Figure 5 : Structure du complexe GPIb-IX-V.....	21
Figure 6 : Voies de signalisation organisées autour du complexe GPIb-V-IX engagé. ....	23
Figure 7 : Représentation schématique de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ .....	24
Figure 8 : Voies de signalisation dépendante de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ .....	25
Figure 9 : représentation schématique du récepteur GPVI .....	26
Figure 10 : Représentation schématique de la voie de signalisation dépendante de la glycoprotéine GPVI. ....	27
Figure 11 : Mécanisme d'activation de PAR1.....	30
Figure 12 : Représentation schématique de l'activation des récepteurs PARs dans les plaquettes humaines et murines. ....	31
Figure 13 : Représentation schématique du récepteur Fc $\gamma$ RIIa . ....	33
Figure 14 : Exemple de quelques voies de signalisation en aval des RCPG .....	35
Figure 15 : Voies de signalisation dépendante de la glycoprotéine GPVI .....	37
Figure 16 : Représentation schématique de la tyrosine kinase Syk.....	39
Figure 18 : Modèle schématique de stimulation plaquettaire soutenue et d'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ par la thrombine (figure du haut) et le collagène (figure du bas). ....	41
Figure 19 : Organisation en domaine du transporteur ABCA1 .....	44
Figure 20 : Mécanisme en 3 étapes de l'interaction ABCA1 – APOA-I.....	46
Figure 21 : Reconnaissance et modification du PF4 par les anticorps au sein de complexes macromoléculaires en fonction des concentrations définies de PF4 et d'héparine. ....	63

## Abréviations

<b>ADP</b>	Adénosine 5'-diphosphate
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AMPc</b>	adénosine 5'-monophosphate cyclique
<b>ATP</b>	Adénosine 5'-triphosphate
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>ECGF</b>	Endothelial Cell Growth Factor
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase
<b>Fc<math>\gamma</math>R</b>	Chaînes $\gamma$ des récepteurs aux fragments constants des
immunoglobulines	
<b>GEF</b>	Guanosine Nucleotide Exchange Factor
<b>GMPc</b>	Guanosine 5'-monophosphate cyclique
<b>GP</b>	Glycoprotéine
<b>GDP</b>	Guanosine Diphosphate
<b>GTP</b>	Guanosine Triphosphate
<b>HDL</b>	High Density Lipoprotein
<b>IGF1</b>	Insulin Growth Factor 1
<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5- <i>tris</i> phosphate
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
<b>IL1-<math>\beta</math></b>	Interleukine 1 $\beta$
<b>JAK2</b>	Janus Kinase 2
<b>KO</b>	Knock-Out
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>MLC</b>	Myosin Light Chain
<b>PA</b>	Phosphatidic Acid
<b>PAI-1</b>	Plasminogen Activator Inhibitor
<b>PAR</b>	Protease-activated receptors
<b>PC</b>	Phosphatidylcholine
<b>PDGF</b>	Platelet Derived Growth Factor
<b>PDK1</b>	Phosphoinositide-dependent kinase 1
<b>PDK2</b>	Phosphoinositide-dependent kinase 2
<b>PE</b>	Phosphatidyléthanolamine
<b>PF4</b>	Platelet Factor 4
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PKA</b>	Protein Kinase cAMP-dependent
<b>PKB</b>	Protein Kinase B
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Phospholipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PLC<math>\gamma</math><sub>2</sub></b>	Phospholipase C $\gamma$ <sub>2</sub>
<b>PON1</b>	Paraoxonase 1
<b>PS</b>	Phosphatidylsérine

<b>PSGL-1</b>	P-Selectine glycoprotein ligand-1
<b>PtdIns</b>	Phosphatidylinositol
<b>PtdIns3P</b>	Phosphatidylinositol 3- <i>monophosphate</i>
<b>PtdIns4P</b>	Phosphatidylinositol 4- <i>monophosphate</i>
<b>PtdIns5P</b>	Phosphatidylinositol 5- <i>monophosphate</i>
<b>PtdIns(3,4)P<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol 3,4- <i>bisphosphate</i>
<b>PtdIns(4,5)P<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol 4,5- <i>bisphosphate</i>
<b>PtdIns(3,5)P<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol 3,5- <i>bisphosphate</i>
<b>PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub></b>	Phosphatidylinositol 3,4,5- <i>trisphosphate</i>
<b>RCPG</b>	Récepteur Couplé aux Protéines G hétérotrimériques
<b>SCO</b>	Système Canaliculaire Ouvert
<b>SH2</b>	Src Homology 2
<b>SH3</b>	Src Homology 3
<b>SM</b>	Sphingomyéline
<b>STD</b>	Système Tubulaire Dense
<b>TGFβ</b>	Transforming Growth Factor β
<b>TNFα</b>	Tumor Necrosis Factor α
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Thromboxane A <sub>2</sub>
<b>VASP</b>	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein
<b>VCAM</b>	
<b>VEGF</b>	Vascular Epidermal Growth Factor
<b>vWF</b>	von Willebrand Factor

# **Revue bibliographique**

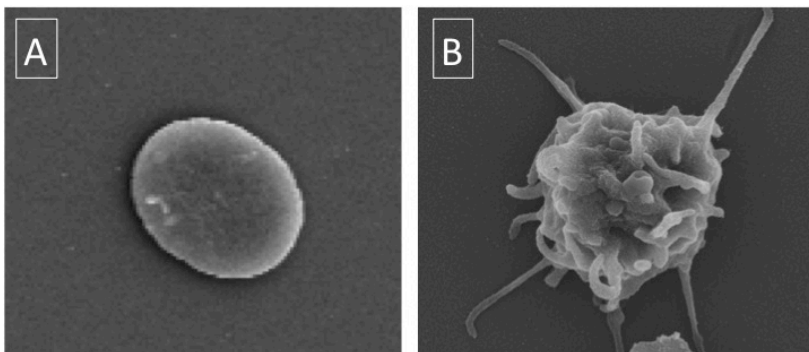
## Chapitre 1 Présentation générale des plaquettes sanguines.

Les plaquettes sanguines sont de petites cellules anucléées provenant de la fragmentation du cytoplasme de grandes cellules de la moelle osseuse hématopoïétique, les mégacaryocytes (Hartwig and Italiano, 2003). Elles sont relarguées dans le sang où leur nombre varie dans des conditions physiologiques de 150 000 à 400 000/ $\mu\text{l}$ . Leur durée de vie est 7 à 12 jours avant leur élimination par phagocytose des macrophages du système réticulo-histiocytaire au sein du foie, de la rate et la moelle osseuse.

Les plaquettes sont les acteurs essentiels du maintien de l'intégrité vasculaire. Leur fonction majeure est d'assurer l'hémostase dite « primaire » conduisant à la formation d'un thrombus riche en plaquettes ou « thrombus blanc » (Furie and Furie, 2008). Cependant, on s'aperçoit aujourd'hui qu'elles ont également un rôle important dans les processus de cicatrisation, de régulation de l'inflammation, d'angiogénèse et de séparation des vaisseaux lymphatiques et sanguins (Leslie, 2010).

### I. Morphologie et caractéristique des plaquettes sanguines

Les plaquettes circulantes au repos se présentent sous la forme d'éléments discoïdes de 1,5 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre et 0,5 à 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Lors de leur activation, elles passent d'une forme discoïde à une forme sphérique et émettent des prolongements membranaires de type filopodes et lamellipodes (Figure 1).



**Figure 1 : forme typique « discoïde » des plaquettes de souris au repos (A) et modifications de forme induites par la stimulation (B) (Lhermusier et al, 2010)**

Elles sont schématiquement constituées de 3 compartiments cellulaires : le système membranaire, les organelles et le cytosquelette.

## ***A. L'asymétrie de la membrane plasmique plaquettaire : régulation et rôle de l'exposition des PS dans la coagulation***

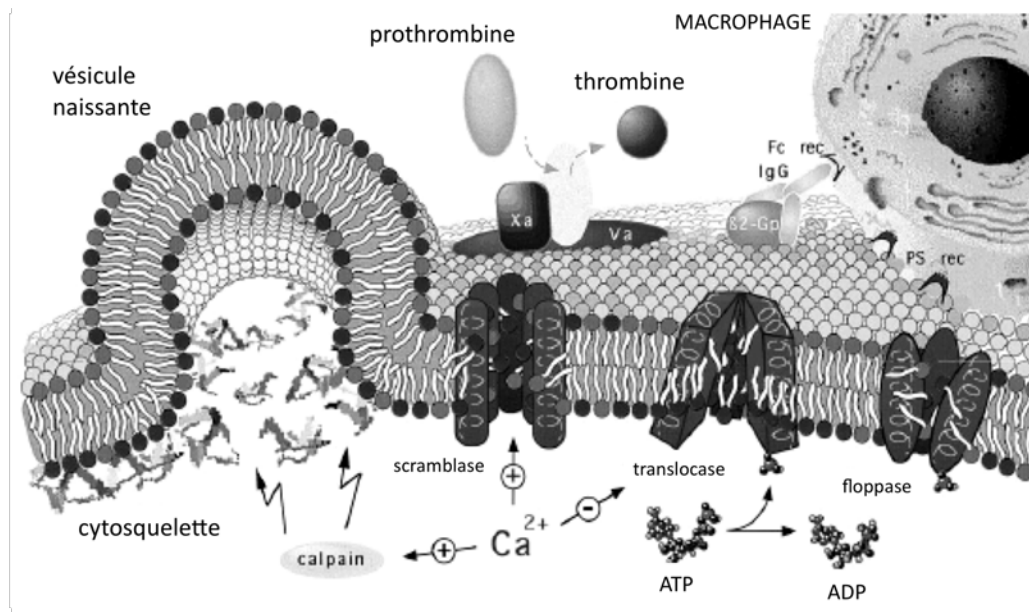
La membrane plaquettaire présente une structure classique, avec 2 feuillets lipidiques, externe et interne, de composition différente.

D'un point de vue lipidique, la membrane plasmique est composée de glycérophospholipides (phosphatidylsérine PS, phosphatidyléthanolamine PE, phosphatidylcholine PC) et de sphyngolipides (sphynngomyélines SM) ; chaque classe présentant de nombreuses espèces moléculaires variant par la nature des chaînes de carbones (longueur, branchement et degré d'insaturation). Un autre constituant lipidique essentiel est le cholestérol, molécule rigide et compacte assurant l'homéostasie de la fluidité membranaire et la formation de microdomaines appelés radeaux lipidiques (rafts) ayant un rôle important dans la signalisation plaquettaire (Bodin et al., 2003). Les membranes plaquettaires sont relativement riches en cholestérol et en SM, éléments favorables à la formation des microdomaines membranaires (Bodin et al., 2003, Bodin et al., 2005, Bodin et al., 2001).

La membrane plasmique contient une grande quantité de glycoprotéines qui sont ancrées dans la bicouche phospholipidique ou traversent cette dernière grâce à des domaines hydrophobes.

### **1. Régulation de l'asymétrie de la membrane plasmique**

Comme la plupart des membranes plasmiques des cellules de mammifères, la membrane plaquettaire présente une distribution asymétrique des phospholipides entre les deux feuillets. Les PC et les SM prédominent sur le feuillet externe alors que les PE et les PS prédominent dans le feuillet interne.



**Figure 2 : Organisation générale des membranes plaquettaires et représentation schématique des différentes protéines membranaires impliquées dans l'asymétrie membranaire (d'après Heemskerk et al., 2002).**

Il a été démontré que la cellule dépensait de l'énergie à la fois pour créer cette asymétrie membranaire et pour la maintenir, suggérant l'existence de protéines spécifiques dont la fonction serait d'assurer un transfert de lipides d'un feuillet à l'autre (mouvements de flip-flop) (Seigneuret and Devaux, 1984). En effet, des protéines assurent le passage de certains lipides du feuillet externe au feuillet interne (flippases) alors que d'autres prennent en charge des mouvements inverses (floppases) (Figure 2). Si la fonction biologique de ces transporteurs est connue de longue date, leur identification biochimique est plus récente. La P4 ATPase est une flippase qui assure le transfert des PS vers le feuillet interne des membranes plasmiques, rôle indispensable au maintien de l'asymétrie membranaire (Tang et al., 1996). De la même façon, la floppase ABCC1, initialement connue sous le nom de multidrug résistance protein (MRP1) assure le transfert des phospholipides sur le feuillet externe des membranes plasmiques (Kamp and Haest, 1998, Dekkers et al., 1998). Des transporteurs de la superfamille ABC sont donc impliqués dans le transport de phospholipides entre les deux feuillets de la membrane plasmique.

Cette asymétrie peut cependant être perdue lors de certains événements comme l'apoptose ou l'activation plaquettaire. En effet, au cours d'une forte activation plaquettaire, il existe une perte de l'asymétrie membranaire de manière dépendante du  $Ca^{2+}$ , avec pour effet principal l'exposition des PS sur le feuillet externe (Bever et al., 1983).

Il existe une ou des protéines dont la fonction est d'éliminer, de façon plus ou moins réversible, l'asymétrie membranaire en assurant des mouvements aléatoires entre les deux feuillet. Cette ou ces protéines, dénommées scramblases, ont été caractérisées dans les années 70 mais sont restées non identifiées pendant près de 30 ans. Récemment, la protéine TMEM 16F a été identifiée comme jouant un rôle majeur dans l'exposition  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante des PS sur le feuillet externe lors de l'activation plaquettaire (Suzuki et al., 2010).

## **2. Rôle de l'exposition des PS dans la coagulation**

La transformation du fibrinogène soluble en un réseau fibreux insoluble de fibrine constitue l'étape clef de la coagulation. Cette transformation nécessite l'action enzymatique de la thrombine. La thrombine dérive du clivage de la prothrombine inactive par le complexe prothrombinase composé de la protéase Xa, du cofacteur Va, d'ion  $\text{Ca}^{2+}$  et de phospholipides anioniques (figure 2). Après stimulation de la plaquette par certains agents, induisant notamment une forte augmentation de la concentration cytosolique de  $\text{Ca}^{2+}$  (thrombine plus collagène essentiellement), un remodelage membranaire rapide se produit, avec translocation des amino-phospholipides sur le feuillet exoplasmique, bourgeonnement de la membrane et émission de microparticules. L'exposition des PS à la surface des plaquettes activées et des microparticules leur confère un potentiel procoagulant qui repose sur la formation du complexe enzymatiques prothrombinase à la surface membranaire. L'exposition des PS sur le feuillet externe des plaquettes est donc une étape importante pour la coagulation, permettant par ailleurs de focaliser la formation de thrombine au niveau de la brèche vasculaire.

L'importance de ce mécanisme est illustrée par l'existence du syndrome de Scott, caractérisé par des hémorragies dues à un défaut d'exposition plaquettaire des PS. Le fait que le défaut d'exposition rapide des PS se manifeste également dans les érythrocytes et lymphocytes B des patients atteints du syndrome de Scott stimulés par le ionophore calcique démontre que le mécanisme de translocation de PS à la surface cellulaire n'est pas spécifiquement plaquettaire. Des signaux comportant une étape commune, déficiente dans les cellules « Scott », seraient donc induits par les agonistes forts des plaquettes et par les ionophores calciques dans toutes les cellules hématopoïétiques. La redistribution des PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique et la production de microparticules surviennent aussi lors de l'apoptose, et jouent dans ce cas un rôle dans la reconnaissance et l'élimination des cellules mortes par le système réticulo-endothélial. Les voies de signalisation déclenchées au cours de l'apoptose impliquent des processus en cascade qui conduisent, à court ou moyen



terme, à l'activation de caspases, à des réactions mitochondriales spécifiques, à l'exposition des PS puis à la dégradation de l'ADN. La translocation membranaire des PS lors de l'apoptose pourrait résulter de signalisations différentes de celles mises en jeu lors de l'externalisation de PS procoagulante, car les lignées de lymphocytes B Scott en culture exposent largement les PS sous l'effet d'inductions proapoptotiques (Kozian et al., 2005).

L'asymétrie membranaire et sa régulation, notamment par l'activité scramblase (encore un peu mystérieuse) et sa répercussion sur l'hémostase sont repris plus en détail dans la revue générale ci dessous.

**Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the  
characterization of a scramblase activity to the identification of an essential  
protein mutated in Scott syndrome.**

Thibault Lhermusier, Hugues Chap, Bernard Payrastre

J Thromb Haemost. 2011 Oct;9(10):1883-91.

## REVIEW ARTICLE

# Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome

T. LHERMUSIER,\* H. CHAP† and B. PAYRASTRE\*‡

\*Inserm, U1048 and Université Toulouse 3, I2MC, 31432 Toulouse Cedex 04; †Inserm, U1043 and Université Toulouse 3, CPTP2, CHU-Purpan 31024 Toulouse Cedex 03; and ‡Hôpital de Toulouse, Laboratoire d'Hématologie, 31059 Toulouse Cedex 04, France

**To cite this article:** Lhermusier T, Chap H, Payrastre B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost* 2011; **9**: 1883–91.

**Summary.** Like all eukaryotic cells, platelets maintain plasma membrane phospholipid asymmetry in normal blood circulation via lipid transporters, which control transbilayer movement. Upon platelet activation, the asymmetric orientation of membrane phospholipids is rapidly disrupted, resulting in a calcium-dependent exposure of the anionic phospholipid, phosphatidylserine (PS), at the outer platelet surface. This newly-exposed PS surface is a major component of normal hemostasis because it supports platelet procoagulant function. Binding of blood clotting enzyme complexes to this negatively-charged membrane surface allows a dramatic increase in the rate of conversion of zymogens to active serine proteases, which in turn produce a burst of thrombin leading to the formation of a fibrin clot and further platelet activation. Cells have the capacity to catalyze transbilayer phospholipid exchange via ATP-requiring translocase enzymes (flippases and floppases), which control unidirectional phospholipid transport against a concentration gradient. They also use an energy-independent, calcium-dependent scramblase activity to govern the bidirectional exchange of phospholipids between the two leaflets of the bilayer; this activity is essential for PS exposure during platelet activation. Scramblase activity, biochemically characterized in the 1980s, is deficient in patients with Scott syndrome, a rare inherited bleeding disorder with defective platelet procoagulant activity. Despite considerable efforts, the platelet scramblase protein remained elusive for years but a significant advance has recently been made with the identification of TMEM16F, a membrane protein essential for calcium-dependent PS exposure whose loss of function mutations are found in Scott syndrome. This review recalls historical aspects of platelet membrane asymmetry characterization, summarizes the mechanisms and

roles of PS exposure following platelet activation and discusses the recent identification of TMEM16F and its significance in the scrambling process.

**Keywords:** phosphatidylserine, phospholipid asymmetry, platelet procoagulant activity, Scott syndrome, scramblase.

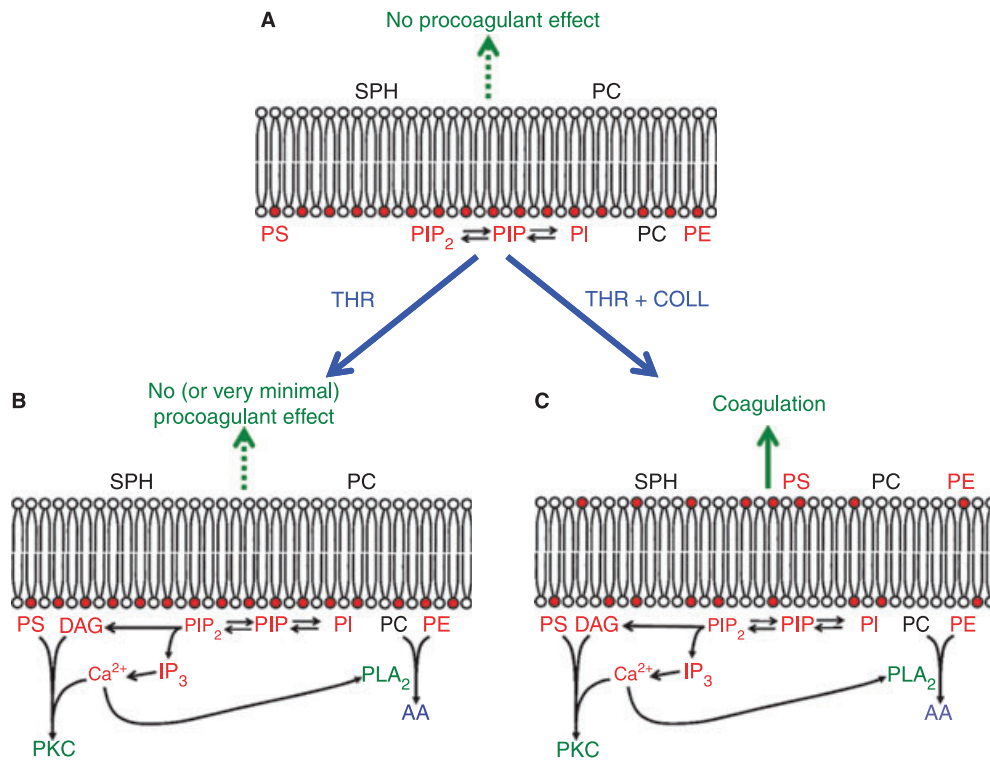
## Historical background: from phospholipid transverse distribution to molecular recognition of scramblase

The concept of membrane phospholipid asymmetry in mammalian cells was first established in erythrocytes and then extended to platelets, using either chemical labeling of aminophospholipids (i.e. phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) [1,2]) or addition of exogenous phospholipases to act selectively on the external layer of the membrane under non-lytic conditions [3–5]. As a general rule, the exterior surface of plasma membranes is almost exclusively made up of choline phospholipids (i.e. sphingomyelin [SPH] and phosphatidylcholine [PC]), whereas the majority of PE and all of the PS, together with phosphoinositides, are localized in the inner leaflet (Fig. 1A).

As illustrated in Fig. 1(B), the asymmetric distribution of phospholipids established at the end of the 1970s brought a strong argument to the view that most of the reactions involving phospholipids in activatable cells such as platelets take place in the inner leaflet of the plasma membrane. These have since been shown to include phospholipase C (PLC)-mediated generation of the second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol (DAG) from phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) [6], activation of protein kinase C by PS, DAG and calcium [7], liberation of arachidonic acid from glycerophospholipids confined to the platelet interior [5,8], and activation of proteins that interact with the phosphoinositide 3-kinase product phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>), such as protein kinase B (PKB/Akt) [9].

Another function of blood platelets that received attention with regard to membrane phospholipid asymmetry was their

Correspondence: Bernard Payrastre, Inserm U1048, I2MC, 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 04, France.  
Tel.: +33 5 62 74 45 25; fax: +33 5 62 74 45 58.  
E-mail: bernard.payrastre@inserm.fr



**Fig. 1.** Schematic view of phospholipid transverse distribution in the plasma membrane of resting and stimulated platelets. (A) In resting platelets, the external membrane surface consists almost exclusively of SPH and PC and exerts no procoagulant activity. In contrast, PS, PE and phosphoinositides are confined to the inner leaflet of the membrane (shown in red). (B) Upon relatively weak platelet stimulation with thrombin alone at low concentrations, a number of metabolic modifications involve phospholipids of the inner leaflet, including PIP<sub>2</sub> hydrolysis by PLC and subsequent activation of PKC by PS, DAG and Ca<sup>2+</sup>, arachidonic acid (AA) liberation by PLA<sub>2</sub>, as well as PIP<sub>3</sub> production by phosphoinositide 3-kinases (not shown). However, this calcium mobilization is not sufficient to promote phospholipid scrambling. (C) When platelets are strongly activated by a combination of thrombin and collagen, a large calcium influx occurs through specific channels (not shown) and promotes phospholipid scrambling, with the subsequent appearance of procoagulant phospholipids (mainly PS), on the external surface. PS, phosphatidylserine; SPH, sphingomyelin; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PIP, phosphatidylinositol monophosphate; PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol bisphosphate; IP<sub>3</sub>, inositol trisphosphate; THR, thrombin; COLL, collagen; PLC, phospholipase C; DAG, 1,2 diacyl *sn* glycerol; PKC, protein kinase C; PLA<sub>2</sub>, phospholipase A<sub>2</sub>.

ability to activate coagulation via the so-called platelet factor-3. As a first attempt to understand platelet behavior in this context, Zwaal *et al.* [10] noticed that resting intact platelets cleverly offered an inert surface to the plasma coagulation system, owing to the virtual absence on the cell exterior of the most procoagulant lipid, PS. In their conclusion, the authors wrote: 'This raises the question whether during or after formation of the primary hemostatic plug, either (partial) lysis of platelets or an as yet unknown mechanism which translocates PS through the plasma membrane is necessary to provide a catalytic lipid surface for interacting coagulation factors'.

This was the starting point of a quest lasting more than 30 years, which began with the concept of membrane phospholipid asymmetry and recently led to the molecular identification of TMEM16F as an essential component of platelet scramblase activity [11]. Throughout this quest, four main steps can be identified, which are detailed below, each of which not only corresponded to a fundamental conceptual advance, but also provided new experimental clues to facilitate further progress.

#### *Activated platelets disrupt membrane phospholipid asymmetry following appropriate stimulation*

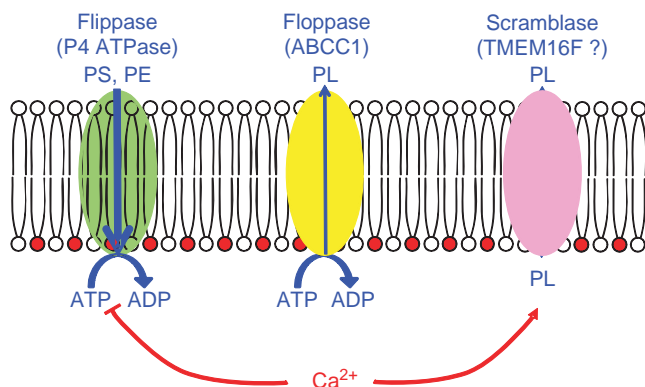
Using both purified coagulation factors and external phospholipases, Bevers *et al.* [12,13] observed that platelets activated with thrombin plus collagen were able to expose the procoagulant phospholipid PS on their surface (Fig. 1C). This active process occurred in the absence of cell lysis and corresponded with a transfer of PS (and PE) from the inner to the outer leaflet of the membrane, corroborating the aforementioned prediction by Zwaal *et al.* [10].

These studies introduced two novelties into the field: (i) the use of coagulation factors to detect surface exposure of procoagulant phospholipids, thus offering a convenient and sensitive tool to investigate this type of membrane modification; and (ii) the notion that PS exposure requires a large increase in the concentration of free cytoplasmic calcium. This can be achieved *in vitro* by calcium ionophores or, more physiologically, by the combination of thrombin plus collagen. Significant calcium influx can also be produced by membrane pore-forming agents such as the complement proteins C5b-9

[14]. These different methods to increase calcium were subsequently applied to a number of studies from this group and others. Simultaneous activation of platelets with thrombin and collagen has led to the characterization of so-called 'coated-platelets', which correspond to a small fraction of total blood platelets (mainly the youngest ones), exposing on their surface not only PS but also various modified proteins secreted from  $\alpha$ -granules [15]. It has also been proposed that these coated platelets have an elevated ability to promote thrombin generation and possibly thrombosis.

#### The discovery of aminophospholipid translocase

Another major development in the understanding of membrane phospholipid asymmetry was the identification of an ATP-dependent activity able to transfer aminophospholipids, mainly PS, from the outer to the inner leaflet of the red blood cell membrane [16]. This led to the view that some specialized proteins are able to transport phospholipids between the two halves of the membrane. As discussed in various reviews [17,18] and as a summary of an impressive number of studies, Fig. 2 illustrates our current knowledge of translocases responsible for the establishment and maintenance of phospholipid asymmetry in membranes. These include a flippase, the former aminophospholipid translocase now identified as a P4 ATPase [19,20], and a floppase, whose activity on phospholipids is supported by the product of the gene *ABCC1*, initially known as multidrug resistance protein MRP1 [21,22]. The molecular mechanism of action of these ATP-dependent translocases is still unclear, because structural data are not yet available [23–25]. However, phospholipid movements catalyzed by these proteins have been followed using phospholipid analogues bearing a short chain fatty acid linked to either a spin label or a fluorescent probe (NBD-phospholipids). This allows sponta-



**Fig. 2.** Phospholipid transport proteins of the platelet membrane. Under resting conditions, phospholipid transverse asymmetry is maintained through the action of two ATP-dependent translocases (flippase and floppase). In the presence of  $\mu\text{M}$  calcium concentrations (for instance upon stimulation with thrombin plus collagen), the scramblase catalyzes the bidirectional transfer of phospholipids (PL), whereas inhibition of flippase contributes to PS exposure on the external surface. PS, phosphatidylserine; PE, phosphatidylethanolamine.

neous intercalation of the phospholipids in the external leaflet of the membrane and their internalization can be assessed by either the decrease in extraction of these NBD-phospholipids by bovine serum albumin or through monitoring the reduction of fluorescent signal quenching initiated by external non-permeable agents. This experimental strategy has been applied to stimulated cells and has led to the concept that a scramblase stimulated by  $\mu\text{M}$  concentrations of cytoplasmic free calcium allows the reciprocal migration of phospholipids between the two halves of the membrane [26], as illustrated in Fig. 2.

#### Scott syndrome

This disorder was first described in 1979 by Weiss *et al.* [27] in a patient with a history of bleeding episodes and impaired platelet procoagulant activity (Mrs M.A. Scott, 1939-1996). In the mid 1980s, Scott syndrome was recognized as a very rare, moderately severe bleeding disorder characterized by a defect in membrane lipid scrambling in both activated platelets [28] and other hematologic lineages such as red cells and lymphocytes [29,30]. However, it is noteworthy that most patients do not present with any clinical symptoms other than bleeding episodes. Platelet count and structure are normal in Scott syndrome and no obvious alterations in platelet secretion, aggregation, metabolism, granule content, adhesion to sub-endothelium or coagulation factor levels are observed [31,32]. Scott platelets do, however, fail to promote fibrin formation in the presence of coagulation factors. When investigating this further, it was noted that prothrombin was not efficiently cleaved during the clotting of whole blood; however, in contrast to deficiencies in coagulation factors this reduced prothrombin cleavage was not restored by the addition of normal plasma. Phospholipases were also used to analyze the phospholipid composition of the outer membrane leaflet and led to the suggestion that, unlike normal platelets, Scott platelets do not have altered phospholipid composition in their outer membrane surface upon activation by a mixture of thrombin plus collagen [28]. These results were confirmed using annexin V binding experiments, which show a lack of PS exposure upon Scott platelet activation [33]. A similar defect was also observed in a canine model presenting a deficiency in platelet procoagulant activity [34].

The recognition of Scott syndrome as an inherited disorder [33,35] initiated an avid search for the gene encoding the hypothetical scramblase.

#### PS exposure in apoptosis and microvesicle formation

In parallel with studies on platelets and erythrocytes, a major advance in the field of cell biology was the discovery that external PS exposure is a characteristic of apoptotic cells. This event involves a scramblase activity [36] and allows the removal of dying cells by macrophages [36,37]. The discovery also gave rise to the widely-used method for detecting apoptotic cells through the use of the fluorescent calcium- and phospholipid-binding protein annexin V [38]. In both activated platelets and

apoptotic cells, external PS exposure leads to the release of microvesicles (also called membrane microparticles), formed by evagination of the plasma membrane. This occurs concurrently with, and possibly as a consequence of, membrane phospholipid scrambling [18,39], although the two events might also be unrelated [40]. In addition to promoting the procoagulant activity, loss of phospholipid asymmetry renders the membranes of both microvesicles and remnant cells susceptible to the action of secretory type II phospholipase A<sub>2</sub>, resulting in a number of potential consequences such as transcellular signaling via lysophosphatidic acid or arachidonic acid metabolites [41–44]. This latter point warrants further investigation in the future.

### PS exposure: linking platelet activation to thrombin generation and coagulation

While the central role of platelet activation in hemostasis has long been recognized, its implication in the control of coagulation was only characterized more recently [45,46]. The fact that the plasma membrane surface of activated platelets provides a critical platform for the activation of blood clotting enzyme complexes to generate thrombin was proposed in the 1980s [47]. When potently activated by soluble agonists, molecules of the subendothelial matrix or a combination of the two, particularly collagen plus thrombin, platelets lose their plasma membrane phospholipid asymmetry and PS is exposed at the surface of both platelets and platelet-derived microparticles [13]. At physiological pH, surface exposure of PS provides a negatively-charged membrane platform necessary for the interaction of the non-enzymatic protein factor (F) V<sub>a</sub>. Factor V<sub>a</sub> then binds FXa with high affinity to form the prothrombinase complex that efficiently activates thrombin by cleavage of two peptide bonds in prothrombin [48–50]. Through this process, activated platelets express specific and saturable binding sites for FV<sub>a</sub> and FXa [51,52]. The most widely-accepted view is that the negatively-charged membrane binds FV<sub>a</sub> and, in the presence of calcium ions, this factor undergoes a conformational change to create a high-affinity binding site for FXa, thereby forming the prothrombinase complex [53,54]. When compared with the activity of FXa alone, incorporation of FXa into the prothrombinase complex increases the rate of prothrombin cleavage by five to 10 orders of magnitude [51,55]. Assembly of the prothrombinase complex results in local propagation of blood coagulation because prothrombin is rapidly converted to thrombin [56]. Thrombin then cleaves fibrinogen to produce an insoluble fibrin clot and further activates platelets to amplify the reaction.

Thus, the anionic platelet membrane surface plays a critical role in the amplification of prothrombin cleavage and focuses thrombin production to the site of platelet activation, making platelet PS exposure a key regulator of hemostasis.

*In vivo*, in addition to providing a membrane surface needed for assembly of the prothrombinase complex, activated platelets secrete FV<sub>a</sub>, a key component of that complex, from their  $\alpha$ -granules. Furthermore, activated platelets shed microparti-

cles that also support prothrombinase complex formation by increasing the procoagulant surface area [57].

Overall these data indicate that a deficiency in PS exposure disrupts the pathway from platelet activation to prothrombin activation, with bleeding consequences, as seen in Scott syndrome.

### Regulation of PS exposure in platelets

#### *The role of calcium, calpain, the cytoskeleton and lipid rafts*

In agonist-activated platelets, surface exposure of PS is a process controlled by calcium and may also involve calpain activity and cytoskeletal organization. Following an increase in cytosolic calcium, flippase is inhibited but this in itself is not sufficient to provide a rapid PS exposure because activation of phospholipid scrambling is also required. Whilst scrambling activity is not ATP-dependent, it requires a sustained increase in cytosolic calcium [26]. Cytosolic calcium acts as a switch for the scrambling machinery so lowering the calcium levels stops the scrambling process [58]. Most platelet agonists induce PLC activation and IP<sub>3</sub> production, leading to calcium mobilization, but this is not sufficient to switch on the scrambling process. It appears that an influx of calcium via store-operated calcium entry (SOCE) is mandatory [59]. There is evidence that the transient receptor potential channel TRPC1 is involved in the control of PS exposure in HEL cells, a lineage with megakaryoblastic properties [60,61]; however, TRPC1-deficient mouse platelets have a normal calcium response, indicating that in fact this channel is not a major regulator of calcium influx upon platelet stimulation. More recent reports strongly implicate the SOCE machinery, including the Orai 1 channel and the STIM1 calcium sensors, in PS exposure following collagen activation of mouse platelets [62,63]. However, using STIM1- and Orai 1-deficient platelets, Gilio *et al.* [63] observed that an as-yet-uncharacterized (non-SOCE) mechanism of calcium entry initiated by thrombin receptors also contributes to PS exposure.

Cytosolic calcium modulates many cell functions, including actin cytoskeleton dynamics, by impacting on actin-severing proteins, actin-crosslinking proteins, calmodulin-regulated enzymes and proteases such as calpain. In 1985, Comfurius and colleagues had already correlated PS exposure with the cleavage of cytoskeletal proteins such as Actin-Binding Protein (ABP) [64]. Consistent with this observation, the calcium-dependent protease calpain, known to hydrolyze ABP and spectrin, was then proposed to participate in platelet PS exposure [65]. However, more recent data indicate that, at least upon stimulation of the collagen receptor GPVI under platelet adhesion conditions, calpain-mediated protein cleavage is involved in membrane blebbing and vesiculation rather than in PS exposure *per se* [66]. The interactions between the cytoskeleton and membrane glycoproteins may have a general structural role impacting on PS exposure, as recently shown for the platelet receptor for von Willebrand factor, the GPIIb-V-IX complex, which seems to modulate platelet procoagulant

activity through the intracellular cytoskeleton-anchoring portions of GpIb [67].

The lateral organization of the plasma membrane, particularly cholesterol and sphingolipid-rich microdomains, also appears important for phospholipid scrambling. This is based upon the observation that cholesterol extraction and disruption of lipid rafts by methyl- $\beta$ -cyclodextrin impairs phospholipid scrambling in HEL cells [61]. These membrane microdomains appear to be important for calcium signaling in general and particularly the SOCE machinery but it is not clear whether membrane fluidity and lateral organization directly impact on the scramblase activity, on regulatory elements, or both.

Although the scrambling activity does not require ATP hydrolysis, there is evidence that prolonged ATP depletion results in the loss of scrambling activity, suggesting that the scramblase machinery may require phosphorylation to be active [68].

#### *Apoptotic vs. agonist-induced platelet PS exposure*

As previously mentioned, PS exposure is a hallmark of apoptotic cells. Like in activated platelets, PS exposure in apoptotic cells results from inhibition of phospholipid translocase activity and activation of scramblase activity. Interestingly, besides PS exposure some features of a strong platelet activation that is required for procoagulant activity resemble those occurring in apoptotic cells, including membrane blebbing and microparticle production. Moreover, platelets express many apoptotic regulators such as members of the Bcl-2 protein family and caspases. These observations raise several questions. (i) Is the apoptotic machinery involved in the regulation of the procoagulant function of platelets? (ii) Is PS exposure regulated differently during procoagulant activation of platelets than during platelet apoptosis? (iii) Do apoptotic platelets have procoagulant activity? In a recent report, Schoenwaelder and colleagues [69] provided a significant piece of information to start answering these questions. They observed that two distinct pathways regulate platelet PS exposure depending on whether it is induced by either the apoptotic BH3 mimetic compound ABT-737 (a selective inhibitor of anti-apoptotic proteins) or as part of the agonist (convulxin plus thrombin)-mediated platelet procoagulant function. Indeed, in mouse platelets, agonist-induced PS exposure appears unchanged in the absence of the apoptotic proteins Bak (Bcl-2-associated protein K) and Bax (Bcl-2-associated protein X) or following caspase inhibition but is abolished by extracellular calcium chelators or by prostaglandin E1 (PGE1) and theophyllin treatment (which inhibits platelet activation by raising cAMP levels). Conversely, ABT-737-induced PS exposure and procoagulant activity is dependent upon caspase activity, is reduced in the absence of Bak and Bax, and is unaffected by PGE1 and theophyllin treatment. Importantly, while, as expected, the agonist-mediated PS exposure is abolished by extracellular calcium chelators, ABT-737-induced PS exposure is unaffected by chelating extracellular calcium. These data strongly suggest

that two distinct molecular mechanisms regulating PS exposure in platelets exist. This is consistent with a previous study demonstrating that, in Scott syndrome, PS exposure in apoptotic lymphocytes is normal whereas calcium-induced PS exposure is absent [30]. This observation also suggests that TMEM16F is not involved in PS exposure during apoptosis in these cells. Whether the role of PS exposure at the surface of apoptotic platelets can have an impact on thrombin generation *in vivo* or is exclusively a signal for elimination of these platelets remains to be established. In this context, it is noteworthy that the clearance of PS-rich platelet microparticles from the circulation involves the PS binding protein lactadherin, deficiency of which causes a hypercoagulable state in mice [70].

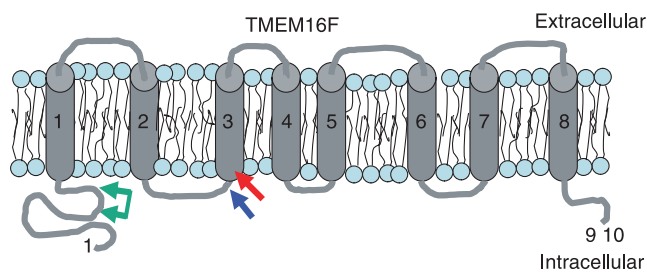
#### **Identification of TMEM16F as an essential component of the calcium-dependent scramblase activity deficient in Scott syndrome**

Throughout the quest to identify the platelet scramblase, few candidates have been proposed. A strong candidate was ABCA1, a member of the ATP-binding cassette (ABC) lipid transporters, which is required to load cholesterol and phospholipids onto apoA1 and is mutated in Tangier disease (a rare inherited disorder characterized by a severe reduction in the amount of HDL). Indeed, a missense mutation in the ABCA1 gene was reported in a Scott syndrome patient [71], suggesting that this transporter could be part of the machinery involved in PS exposure. However, although ABCA1 may play a role in platelet activation, several reports argue against its direct implication in lipid scrambling [26,72]. Another candidate, a plasma membrane protein called scramblase 1 or PLSCR1, can be eliminated because it has been observed to be present at normal levels in lymphocytes from a patient with Scott syndrome [73]. This was confirmed by the lack of hemostatic defect in mice bearing a knock-out of the scramblase 1 gene [74].

Thus, the identity of the scramblase remained elusive until recently, when Suzuki *et al.* [11] identified the protein TMEM16F (also called anoctamin 6) as an essential component for calcium-dependent PS exposure on the plasma membrane. Interestingly, using Ba/F3 murine B-cells and an annexin V-based fluorescence-activated cell-sorting strategy, this group isolated a subline exhibiting strong PS exposure in response to calcium ionophore treatment under low calcium conditions. A complementary DNA library was constructed from this subline and introduced into the parental Ba/F3 cell line. After repetitive sorting/expansion cycles a cell subline exhibiting strong PS exposure in the absence of calcium ionophore was isolated. Using expression cloning, the authors then identified a cDNA causing Ba/F3 to expose PS spontaneously. This cDNA encoded a constitutively active mutant of TMEM16F. Knock-down of TMEM16F in the parental Ba/F3 cells by shRNA resulted in a strong decrease in the rate of calcium ionophore-induced PS and PE exposure, demonstrating that this protein is essential for calcium-dependent scrambling of phospholipids. TMEM16F, whose gene is located on chromosome 12, is a protein with a predicted molecular mass

of 106 kDa and is located on the plasma membrane with eight transmembrane domains (Fig. 3). Compared with wild-type TMEM16F, the TMEM16F expressed in the cell subline constitutively expressing PS exhibited a point mutation replacing aspartate 409 with a glycine (D409G). Consistent with a constitutively active scramblase function of this mutated TMEM16F (possibly through increased sensitivity to calcium), these cells also constitutively exposed PE on their surface.

To further characterize this protein the authors used RT-PCR to analyze the TMEM16F mRNA of a B-cell line from a patient with Scott syndrome and found that the 3' half, corresponding to exons 11–20, was smaller. Sequence analysis indicated that the cDNA of the patient lacked the 226 bp sequence corresponding to exon 13. Direct sequencing of the chromosomal DNA showed that the TMEM16F gene of the patient carried a G-to-T homozygous mutation in the splice acceptor site in intron 12, causing exon 13 to be skipped. The resulting frame shift led to a premature termination of the protein at the third transmembrane domain of TMEM16F (Fig. 3). Overall, these results demonstrate that TMEM16F is a critical component of the calcium-dependent phospholipid scrambling activity. Interestingly, another recent report describes two novel mutations in the TMEM16F gene in another patient with Scott syndrome [75]. The scramblase defect in the platelets, erythrocytes and B lymphocytes of this patient had been previously characterized [76]. The mutations were identified in intron 6 (G-to-A), disrupting the donor splice site consensus sequence, and in exon 11 as a single-nucleotide insertion predicting a frame shift and premature termination of translation at codon 411. It is predicted that the first mutation causes an in-frame deletion of 38 amino acids in the N-terminal cytoplasmic tail of TMEM16F and the second mutation causes the truncation of the protein between the second and third transmembrane domains (Fig. 3). It is noteworthy that a genome-wide linkage scan had previously localized the canine Scott deficiency to chromosome 27, a region syntenic with the centromeric region of human chromosome 12 where the TMEM16F gene is localized [77], suggesting, as in human Scott



**Fig. 3.** Schematic representation of TMEM16F and its mutations in Scott syndrome patients. The mutations of TMEM16F identified in Scott syndrome patients are indicated as follows: the G-to-T mutation predicting a termination of the protein in the third transmembrane domain is shown by a red arrow; the G-to-A mutation predicting the in-frame deletion of 38 amino acids in the N-terminal part is shown by the two green arrows; and the single-nucleotide insertion in exon 11 predicting the truncation of the protein between the second and third transmembrane domain is shown by the blue arrow.

syndrome, a potential contribution of the TMEM16F protein to this canine disease.

### TMEM16F: a calcium-dependent scramblase or a key regulator of scrambling activity?

TMEM16F belongs to a family of proteins consisting of 10 members in humans. The founding member, TMEM16A, is a calcium-activated  $\text{Cl}^-$  channel [78]. The transmembrane segments of TMEM16 proteins are the regions showing maximal conservation and there is evidence that different members of the family have distinct functions [79]. TMEM16 proteins are abundantly expressed and many reports have demonstrated their physiological importance in various cell types, where they can control cell volume, proliferation and apoptosis. There is evidence that some members of the family such as TMEM16A are embedded in a protein network and that they probably operate in functional microdomains. The sequence of TMEM16A proteins shows no clear similarity to known domains involved in direct calcium binding such as EF-hand or motifs potentially involved in calmodulin binding. However, the N-terminal part of TMEM16A seems to have an important regulatory function. Interestingly, the increased calcium sensitivity of the D409G mutant of TMEM16F may suggest a role for this region in supporting calcium-mediated scramblase activation. Whether these regions of TMEM16F interact with a calcium sensor or directly bind calcium remains to be established.

Based on structural data it is difficult to conclude that TMEM16F is indeed the long-sought scramblase protein. The results of Suzuki *et al.* [11] do not exclude the possibility that TMEM16F is a critical regulator of the calcium-induced lipid scrambling processes rather than being the scramblase itself. It is particularly interesting to consider these data alongside very recent and unexpected results showing that opsin can rapidly transport lipids across the membrane with properties similar to the plasma membrane scramblase [80,81]. Opsin may catalyze lipids' movements by correctly positioning water molecules to allow lipid head groups to translocate through the core of the protein while the fatty acid chains remain outside the protein surface. This mechanism would explain the lack of head group specificity of the scrambling process. Interestingly, the  $\beta_1$ -adrenergic receptor has the same property, suggesting that several serpentine receptors could have the ability to play the role of a scramblase. If this is the case one can imagine that potent negative regulators of the process can suppress lipid scrambling under normal conditions and that TMEM16F could be one of these regulators.

### Concluding remarks

The exciting discovery of TMEM16F as a critical component of the calcium-dependent phospholipid scrambling activity and the identification of loss-of-function mutations in Scott syndrome will have important implications for future research in this field. Indeed, analysis of the structure/function



relationship as well as studies of the interactome of TMEM16F and of the post-translational modifications of the protein should provide important information concerning the molecular mechanism of calcium-dependent phospholipid scrambling and may reveal novel concepts in the biomembrane field. Moreover, defining the role of TMEM16F in other processes related to PS exposure and phospholipid scrambling, such as apoptosis or membrane blebbing and microparticle formation, will be of great interest. The fact that Scott syndrome is an extremely rare disease affecting mainly specific platelet functions raises fundamental questions such as whether there exists any compensatory mechanisms, whether there is a role for TMEM16F in PS exposure in response to acute and strong stimulation such as that found during hemostasis, and whether there is a potential role of TMEM16F in development. Investigating the possibility that some serpentine receptors could function as scramblases and identifying their regulators and links with TMEM16F may contribute to answering these questions. The creation of conditional TMEM16F knock-out/in mouse lines should provide powerful models to investigate the exact role of platelet PS exposure and phospholipid scrambling in hemostasis and thrombosis *in vivo*. Thus, the fascinating story of the scramblase identification is not over; new avenues have now been opened with the investigation of the molecular aspects of its regulation and function.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from Inserm, ITMO Cancer and Région Midi-Pyrénées. T. Lhermusier was supported by a grant from CHU-Toulouse. Thanks are due to P. Sié for critical reading of the review.

### Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

### References

- Bretscher MS. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature (New Biol)* 1972; **236**: 11–2.
- Schick PK, Kurica KB, Chacko GK. Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *J Clin Invest* 1976; **57**: 1221–6.
- Verkleij AJ, Zwaal RFA, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen LLM. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1973; **323**: 178–93.
- Chap HJ, Zwaal RFA, van Deenen LL. Action of highly purified phospholipases on blood platelets. Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the surface membrane. *Biochim Biophys Acta* 1977; **467**: 146–64.
- Perret B, Chap HJ, Douste-Blazy L. Asymmetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane of human platelets. A determination using purified phospholipases and a rapid method for membrane isolation. *Biochim Biophys Acta* 1979; **556**: 434–46.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2009; **793**: 933–40.
- Nakamura S, Yamamura H, Yasutomi Nishizuka: father of protein kinase C. *J Biochem* 2010; **148**: 125–30.
- Plantavid M, Perret BP, Chap H, Simon MF, Douste-Blazy L. Asymmetry of arachidonic acid metabolism in the phospholipids of the human platelet membrane as studied with purified phospholipases. *Biochim Biophys Acta* 1982; **693**: 451–60.
- Gratacap M-P, Martin V, Guillermet-Guibert J, Chicanne G, Payrastré B. PI 3-kinase  $\beta$  in the regulation of platelet signalling and functions. *Adv Enz Reg* 2011; **51**: 106–16.
- Zwaal RFA, Comfurius P, van Deenen LLM. Membrane asymmetry and blood coagulation. *Nature* 1977; **268**: 358–60.
- Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 2010; **468**: 834–8.
- Bevers EM, Comfurius P, van Rijn JL, Hemker HC, Zwaal RFA. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur J Biochem* 1982; **122**: 429–36.
- Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta* 1983; **736**: 57–66.
- Sims PJ, Wiedmer T, Esmo CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem* 1989; **264**: 17049–57.
- Dale GL. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 2185–92.
- Seigneuret M, Devaux PF. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 3751–5.
- Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipids asymmetry. *J Lipid Res* 2003; **44**: 233–42.
- Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**: 971–88.
- Tang X, Halleck MS, Schlegel RA, Williamson P. A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* 1996; **272**: 1495–7.
- Paulusma CC, Elferink RP. P4 ATPases – The physiological relevance of lipid flipping transporters. *FEBS Lett* 2010; **584**: 2708–16.
- Kamp D, Haest CWM. Evidence for a role of multidrug resistance protein (MRP) in outward translocation of NBD-phospholipids in the erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1372**: 91–101.
- Dekkers DWC, Comfurius P, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RFA. Transbilayer movement of NBD-labeled phospholipids in red blood cell membranes; outward-directed transport by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Biochemistry* 1998; **37**: 14833–7.
- Lieke M, van der Velden L, van de Graaf SFJ, Klomp LWJ. Biochemical and cellular functions of P4 ATPases. *Biochem J* 2010; **431**: 1–11.
- DeGorter MK, Conseil GI, Deeley RG, Campbell RL, Cole SPC. Molecular modeling of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Biochim Biophys Res Commun* 2008; **365**: 29–34.
- He SM, Li R, Kanwar JR, Zhou SF. Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr Med Chem* 2011; **18**: 439–81.
- Bevers EM, Williamson PL. Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett* 2010; **584**: 2724–30.
- Weiss HJ, Vivic WJ, Lages BA, Rogers J. Isolated deficiency of platelet procoagulant activity. *Am J Med* 1979; **67**: 206–13.
- Rosing J, Bevers EM, Comfurius P, Hemker HC, van Dieijen G, Weiss HJ, Zwaal RFA. Impaired factor X and prothrombin activation associated with decreased phospholipid exposure in platelets from a patient with a bleeding disorder. *Blood* 1985; **65**: 1557–61.
- Bevers EM, Wiedmer T, Comfurius P, Shattil SJ, Weiss HJ, Zwaal RFA, Sims PJ. Defective  $\text{Ca}^{2+}$ -induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient

- with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of Scott syndrome. *Blood* 1992; **79**: 380–8.
- 30 Williamson P, Christie A, Kohlin T, Schlegel RA, Comfurius P, Harmmsa M, Zwaal RFA, Bevers EM. Phospholipid scramblase activation pathways in lymphocytes. *Biochemistry* 2001; **40**: 8065–72.
- 31 Satta N, Toti F, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome: an inherited defect of the procoagulant activity of platelets. *Platelets* 1997; **8**: 117–24.
- 32 Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1636**: 119–28.
- 33 Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic disorder. *Blood* 1996; **87**: 1409–15.
- 34 Brooks MB, Catalfamo JL, Brown HA, Ivanova P, Lovaglio J. A hereditary bleeding disorder of dogs caused by a lack of platelet procoagulant activity. *Blood* 2002; **99**: 2434–41.
- 35 Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic implication of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; **89**: 1121–32.
- 36 Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995; **182**: 1597–601.
- 37 Fadok VA, Voelker D, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; **148**: 2207–16.
- 38 Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; **84**: 1415–20.
- 39 Freyssinet JM, Torti F. Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb Res* 2010; **125**: S46–8.
- 40 Dachary-Prigent J, Pasquet JM, Freyssinet JM, Nurden AT. Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: a study using  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitors. *Biochemistry* 1995; **34**: 11625–34.
- 41 Fourcade O, Simon MF, Vioché C, Rugani FL, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 1995; **80**: 919–27.
- 42 Barry OP, Praticò D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997; **99**: 2118–27.
- 43 Atsumi G, Murakami M, Tajima M, Shimbara S, Hara N, Kudo I. The perturbed membrane of cells undergoing apoptosis is susceptible to type II secretory phospholipase A<sub>2</sub> to liberate arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1349**: 43–54.
- 44 Neidlinger NA, Larkin SK, Bhagat A, Victorino GP, Kuypers FA. Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A<sub>2</sub> generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction. *J Biol Chem* 2006; **281**: 775–81.
- 45 Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**: 1381–9.
- 46 Weiss HJ. Impaired platelet procoagulant mechanisms in patients with bleeding disorders. *Semin Thromb Hemost* 2009; **35**: 233–41.
- 47 Tracy PB, Eide LL, Mann KG. Human prothrombinase complex assembly and function on isolated peripheral blood cell populations. *J Biol Chem* 1985; **260**: 2119–24.
- 48 Krishnaswamy S, Church WR, Nesheim ME, Mann KG. Activation of human prothrombin by human prothrombinase. Influence of factor Va on the reaction mechanism. *J Biol Chem* 1987; **262**: 3291–9.
- 49 Nesheim ME, Mann KG. The kinetics and cofactor dependence of the two cleavages involved in prothrombin activation. *J Biol Chem* 1983; **258**: 5386–91.
- 50 Boskovic DS, Bajzar LS, Nesheim ME. Channeling during prothrombin activation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 28686–93.
- 51 Rosing J, van Rijn JL, Bevers EM, van Dieijen G, Comfurius P, Zwaal RF. The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation. *Blood* 1985; **65**: 319–32.
- 52 Bouchard BA, Catcher CS, Thrash BR, Adida C, Tracy PB. Effector cell protease receptor-1, a platelet activation-dependent membrane protein, regulates prothrombinase-catalyzed thrombin generation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 9244–51.
- 53 Rosing J, Tans G, Govers-Riemsag JW, Zwaal RF, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1980; **255**: 274–83.
- 54 Bevers EM, Rosing J, Zwaal RF. Development of procoagulant binding sites on the platelet surface. *Adv Exp Med Biol* 1985; **192**: 359–71.
- 55 Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem* 1979; **254**: 10952–62.
- 56 Husten EJ, Esmon CT, Johnson AE. The active site of blood coagulation factor Xa. Its distance from the phospholipid surface and its conformational sensitivity to components of the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1987; **262**: 12953–61.
- 57 Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 1988; **263**: 18205–12.
- 58 Williamson P, Bevers EM, Smeets EF, Comfurius P, Schlegel RA, Zwaal RF. Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets. *Biochemistry* 1995; **34**: 10448–55.
- 59 Kunzelmann-Marche C, Freyssinet JM, Martinez MC. Regulation of phosphatidylserine transbilayer redistribution by store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry: role of actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2001; **276**: 5134–9.
- 60 Martinez MC, Martin S, Toti F, Fressinaud E, Dachary-Prigent J, Meyer D, Freyssinet JM. Significance of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in the regulation of phosphatidylserine expression at the surface of stimulated cells. *Biochemistry* 1999; **38**: 10092–8.
- 61 Kunzelmann-Marche C, Freyssinet JM, Martinez MC. Loss of plasma membrane phospholipids asymmetry requires raft integrity. Role of transient receptor potential channels and ERK pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**: 19876–81.
- 62 Bergmeier W, Oh-hora M, McCarl C-A, Roden RC, Bray PF, Feske S. R93W mutation in Orai1 causes impaired calcium influx in platelets. *Blood* 2009; **113**: 675–8.
- 63 Gilio K, van Kruchten R, Braun A, Berna-Erro A, Feijge MAH, Stegner D, van der Meijden PEJ, Kuijpers MJE, Varga-Szabo D, Heemskerk JWM, Nieswandt B. Role of platelet STIM1 and Orai 1 in glycoprotein VI- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation. *J Biol Chem* 2010; **285**: 23629–38.
- 64 Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RFA. The involvement of cytoskeleton in the regulation of transbilayer movement of phospholipids in human blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 1985; **815**: 143–8.
- 65 Fox JEB, Reynolds CC, Austin CD. The role of calpain in stimulus-response coupling: evidence that calpain mediates agonist-induced expression of procoagulant activity in platelets. *Blood* 1990; **12**: 2510–9.
- 66 Siljander P, Farndale RW, Feijge MAH, Comfurius P, Kos S, Bevers EM, Heemskerk JWM. Platelet adhesion enhances the glycoprotein VI-dependent procoagulant response, involvement of p38MAP Kinase and calpain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 618–27.
- 67 Ravanat C, Strassel C, Hechler B, Schuhler S, Chicanne G, Payrastre B, Gachet C, Lanza F. A central role of GPIIb-IX in the procoagulant function of platelets that is independent of the 45-kDa GPIIbalpha N-terminal extracellular domain. *Blood* 2010; **116**: 1157–64.
- 68 Martin DW, Jesty J. Calcium stimulation of procoagulant activity in human erythrocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 10468–74.
- 69 Schoenwaelder SM, Yuan Y, Josefsson EC, White MJ, Yao Y, Mason KD, O'Reilly LA, Henley KJ, Ono A, Hsiao S, Willcox A, Roberts AW, Huang DC, Salem HH, Kile BT, Jackson SP. Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood* 2009; **114**: 663–6.

- 70 Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, Nagata S, Rumbaut RE, Thiagarajan P. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 2009; **113**: 1332–9.
- 71 Albrecht C, McVey JH, Elliott JI, Sardini A, Kasza I, Mumford AD, Naoumova RP, Tuddenham EG, Szabo K, Higgins CF. A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood* 2005; **106**: 542–9.
- 72 Williamson P, Halleck MS, Malowitz J, Ng S, Fan X, Krahling S, Remaley AT, Schlegel RA. Transbilayer phospholipid movements in ABCA1-deficient cells. *PLoS ONE* 2007; **2**: e729.
- 73 Zhou Q, Sims PJ, Wiedmer T. Expression of proteins controlling transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the B lymphocytes from a patient with Scott syndrome. *Blood* 1998; **92**: 1707–12.
- 74 Zhou Q, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ. Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipids scramblase 1. *Blood* 2002; **99**: 4030–8.
- 75 Castoldi E, Collins PW, Williamson PL, Bevers EM. Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome. *Blood* 2011; **117**: 4399–400.
- 76 Munnix IC, Harmsma M, Gidding JC, Collins PW, Feijge MA, Comfurius P, Heemskerk JW, Bevers EM. Store-mediated calcium entry in the regulation of phosphatidylserine exposure in blood cells from Scott patients. *Thromb Haemost* 2003; **89**: 687–95.
- 77 Brooks M, Etter K, Catalfamo J, Brisbin A, Bustamante C, Mezey J. A genome-wide linkage scan in German shepherd dogs localizes canine platelet procoagulant deficiency (Scott syndrome) to canine chromosome 27. *Gene* 2010; **450**: 70–5.
- 78 Galletta LJV. The TMEM16 protein family : a new class of chloride channels? *Biophys J* 2009; **97**: 3047–53.
- 79 Duran Cn Hartzell HC. Physiological roles and diseases of tmem16/anoctamin proteins: are they all chloride channels? *Acta Pharmacol Sin* 2011; **32**: 685–92.
- 80 Menon I, Huber T, Sanyal S, Banerjee S, Barré P, Canis S, Warren JD, Hwa J, Sakmar TP, Menon AK. Opsin is a phospholipid flippase. *Curr Biol* 2011; **21**: 149–53.
- 81 Williamson P. Phospholipid transport: sighting a new face of an old friend. *Curr Biol* 2011; **21**: R168–9.

A côté de la membrane plasmique, les plaquettes présentent d'autres systèmes membranaires constitués par le système canaliculaire ouvert (SCO) et le système tubulaire dense (STD) :

- le SCO, connecté à la surface, correspond à des invaginations profondes de la membrane plasmique au travers du cytoplasme. Il permet à la plaquette de disposer d'une surface membranaire importante en contact avec le milieu extracellulaire. Ainsi, le SCO joue un rôle dans l'endocytose de molécules d'origine plasmatique et dans l'exocytose lorsque le contenu des granules plaquettaires est sécrété.

Ce réservoir de membranes facilite l'étalement des plaquettes et la formation de filopodes et fournit un plus grand nombre de glycoprotéines de membrane accessibles lors de l'activation des plaquettes.

- le STD, non connecté à la surface, correspond à du réticulum endoplasmique lisse résiduel du mégacaryocyte. Il contient les enzymes du métabolisme lipidique comme la peroxydase plaquettaire, mais aussi les ATPases calcium et magnésium dépendantes pour la régulation du calcium intracellulaire.

## ***B. Les organelles plaquettaires***

Dans le cytoplasme, on retrouve des mitochondries, des grains de glycogène, des lysosomes contenant des enzymes (arylsulfatase, phosphatase acide, cathepsine G) ainsi que plusieurs types de granules qui constituent le principal réservoir intracellulaire de protéines et dont le contenu est libéré au cours de l'activation plaquettaire (granules denses et granules  $\alpha$  spécifiques des plaquettes). Les différents organelles de la plaquette sont représentés au niveau de la figure 3. La sécrétion plaquettaire est un mécanisme qui amplifie l'activation des plaquettes et aboutit à la libération de médiateurs qui interagissent avec l'endothélium et les cellules sanguines.

### **1. Les granules denses, $\alpha$ et les lysosomes**

Les granules denses (granules  $\delta$ ) sont de petits granules (150 nm de diamètre) contenant de fortes concentrations d'ADP, d'ATP, de pyrophosphate, de sérotonine et de calcium. Ils sont peu nombreux au sein du cytoplasme (2 à 10 par cellule).

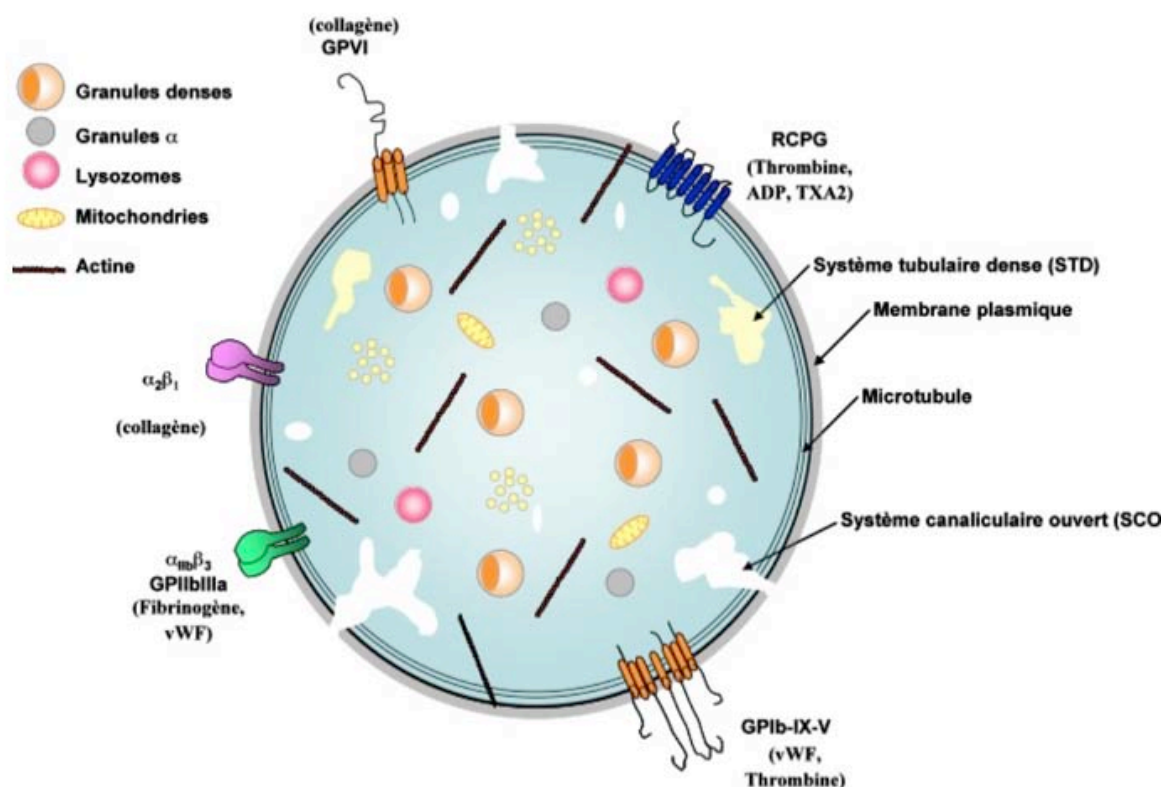
Les granules  $\alpha$  forment une population plus hétérogène que celle des granules denses. Ils sont abondants en nombre (20 à 200 par cellule) et de grande taille (300 à 500 nm de diamètre). Ils contiennent des protéines adhésives telles que le fibrinogène, le vWF, la fibronectine, la vitronectine et la thrombospondine. Des facteurs de croissance  $\gamma$  sont également stockés comme le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), l'ECGF (*Endothelial Cell Growth Factor*), le VEGF (*Vascular Epidermal Growth Factor*), l'IGF1 (*Insulin Growth Factor 1*) et le TGF $\beta$  (*Tissue Growth Factor  $\beta$* ). Ils contiennent également des protéines de la coagulation telles que les facteurs V, XI, XIII et VIII, le kinogène de haut poids moléculaire, le plasminogène, la protéine S et le facteur 4 plaquettaire (PF4) dont la structure et le rôle seront détaillés dans le chapitre 3.II.C

Les lysosomes (ou granules  $\lambda$ ), connus pour leur fonction de dégradation intracellulaire, sont également des organelles sécrétables dans la lignée hématopoïétique (Stinchcombe and Griffiths, 2001). Ces granules contiennent des hydrolases acides, les cathepsines D et E, des proélastases et des collagénases. La sécrétion des lysosomes ne

survient qu'en cas de stimulation maximale de la plaquette. Les hydrolases peuvent contribuer à la destruction des agrégats plaquettaire et ainsi à l'élimination des thrombi.

## 2. Les mitochondries

Elles sont au nombre d'une dizaine par plaquette. Les mitochondries fournissent l'énergie indispensable aux fonctions de sécrétion et d'agrégation (Rendu and Brohard-Bohn, 2001).



**Figure 3 : Représentation schématique de la structure de la plaquette et des principaux récepteurs membranaires.** GP : glycoprotéine ; RCPGs : Récepteurs Couplés aux Protéines G hétérotrimériques ; vWF : Facteur de von Willebrand, ADP : adénosine 5'-diphosphate ; TXA2 : Thromboxane A2, STD : Système Tubulaire Dense ; SCO : Système Canaliculaire Ouvert.

### ***C. Impact des lipides circulants sur la réactivité plaquettaire***

De nombreuses dyslipidémies dont l'hypercholestérolémie sont associées à un risque accru de complications athérothrombotiques (Davi and Patrono, 2007). Plusieurs travaux ont rapporté une hyperréactivité plaquettaire chez ces sujets hypercholestérolémiques (Carvalho et al., 1974, Stuart et al., 1980, Cadroy et al., 1993). Cette hyperréactivité pourrait expliquer le risque accru d'événements thrombotiques (Angiolillo et al., 2007).

Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation impliquées dans la modulation de la réactivité plaquettaire au cours des perturbations du bilan lipidique restent mal élucidés.

Les dyslipidémies peuvent entraîner des modifications de la composition lipidique des membranes cellulaires, consistant en une augmentation du contenu membranaire en cholestérol et en une augmentation du rapport cholestérol/phospholipides. Le rôle direct de cet excès de cholestérol membranaire dans la genèse de l'hyperréactivité plaquettaire est connu de longue date sans que le mécanisme moléculaire ne soit clairement identifié même si la formation de microdomaines de type « rafts » pourrait expliquer une plus grande efficacité de transduction du signal (Shattil et al., 1975, Heemskerk et al., 1995).

Parmi les acteurs potentiels de la modulation de la réactivité plaquettaire par les perturbations du bilan lipidique, deux récepteurs du groupe des « scavenger receptors » (SR) ont été identifiés : CD36 et SR-BI. Il s'agit de récepteurs multiligands présents à la surface des plaquettes, capables de reconnaître la forme oxydée des LDL. Ces récepteurs ont un rôle bien identifié dans le métabolisme lipidique (Valiyaveetil and Podrez, 2009). Au niveau hépatique, SR-BI contrôle les taux plasmatiques de HDL cholestérol.

Des travaux récents ont démontré l'implication du récepteur CD36 dans l'induction d'un signal plaquettaire prothrombotique dans un contexte de dyslipidémie et de stress oxydatif (Podrez et al., 2007). Le rôle de SR-BI semble plus complexe. L'absence d'un récepteur SR-BI fonctionnel au niveau hépatique se traduit par une hyperréactivité plaquettaire en lien avec une augmentation du cholestérol membranaire (Ma et al., 2010). Le récepteur SR-BI plaquettaire pourrait jouer un rôle dans l'induction de signaux d'activation.

## II. Les grandes étapes de l'activation plaquettaire lors d'une lésion vasculaire.

Les plaquettes sanguines circulent librement dans le sang et doivent être activées de façon rapide, séquentielle et coordonnée pour remplir complètement leur rôle au décours d'une lésion vasculaire.

Les cellules endothéliales qui tapissent la paroi vasculaire constituent une surface non thrombogène qui maintient les plaquettes dans un état de repos en synthétisant des molécules telles que la prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) et le monoxyde d'azote, inhibiteurs puissants de l'activation plaquettaire via la production d'adénosine 5'-monophosphate cyclique (AMPc) et de guanosine 5'-monophosphate cyclique (GMPc), respectivement. Cependant, cette homéostasie peut être perturbée soit par une lésion dévoilant le sous-endothélium, soit par un dysfonctionnement de cellules endothéliales suite à une modification de débit sanguin ou à l'apparition dans la circulation de molécules bioactives.

En réponse à une lésion vasculaire, les cellules endothéliales lésées sécrètent différents agents agrégants (TXA<sub>2</sub> et PAF (Platelet Activating Factor)), des vasoconstricteurs (Angiotensine II) et des inhibiteurs de la fibrinolyse (PAI-1), et vont exprimer des molécules d'adhésion permettant d'interagir avec les différentes cellules circulantes. De plus, des composants de la matrice sous-endothéliale peuvent être exposés. Les principaux constituants sont le collagène sur lequel se fixe le vWF et la fibronectine. Dans les conditions classiques de flux sanguin artériel, les plaquettes vont interagir avec le vWF lié aux fibres de collagène, grâce à un récepteur spécifique, le complexe GPIb-IX-V. Cette interaction permet l'adhésion transitoire des plaquettes à la surface de l'endothélium mis à nu. Les plaquettes peuvent alors se détacher et retourner dans la circulation sanguine ou subir un mouvement de translocation tant que la forme discoïdale de la plaquette est conservée ou de rotation (« rolling ») lorsque les plaquettes ont changé de forme et sont devenues sphériques (Wu et al., 1997, Andre et al., 2000, Jackson et al., 2000). Cette adhésion transitoire des plaquettes au sous-endothélium entraîne leur activation accompagnée de la sécrétion du contenu des granules denses et  $\alpha$ , ainsi que du changement conformationnel des intégrines  $\alpha_{IIb}\beta_3$  et  $\alpha_2\beta_1$  qui acquièrent alors une affinité plus importante pour leurs ligands respectifs.

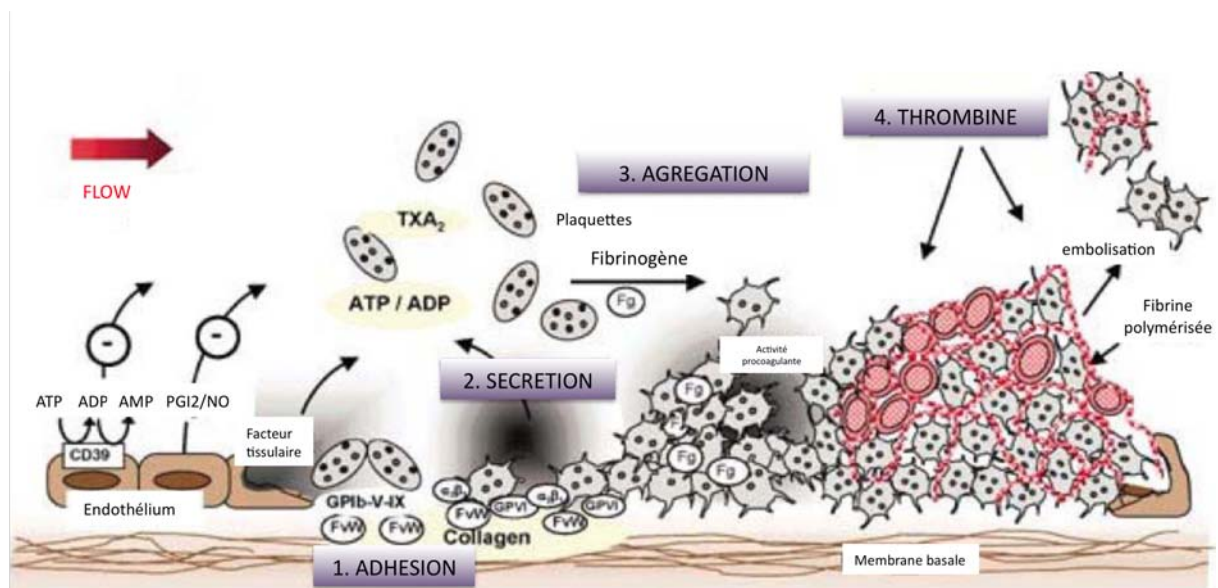
L'adhésion irréversible des plaquettes, ainsi que leur étalement, dépendent de l'engagement de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  qui lie différentes protéines adhésives comme le vWF, la



fibronectine ou le fibrinogène, ainsi que des récepteurs au collagène,  $\alpha_2\beta_1$  et GPVI. GPVI induit une forte signalisation intracellulaire importante pour la pleine activation plaquettaire (Siljander et al., 2004).

Les médiateurs solubles sécrétés comme l'ADP ou le  $\text{TXA}_2$  stimulent des récepteurs à sept segments transmembranaires couplés à des protéines G hétérotrimériques. Les agonistes solubles potentialisent l'activation plaquettaire et permettent de recruter des plaquettes circulantes au site de la lésion vasculaire. Ces processus favorisent les interactions plaquettes-plaquettes et conduisent à l'agrégation grâce à la forte activation des intégrines  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  qui stabilisent les interactions entre les plaquettes par l'intermédiaire de la fixation du fibrinogène circulant et/ou libéré des granules  $\alpha$  et l'interaction d'autres molécules adhésives notamment la thrombospondine sécrétée par les plaquettes. L'ensemble de ces événements aboutit à la formation d'un « thrombus blanc » qui va obturer la brèche vasculaire (Figure 4).

Lors d'une forte activation plaquettaire, l'exposition des phospholipides anioniques (PS) sur le feuillet externe de la membrane plasmique rend le thrombus procoagulant, ce qui accélère l'activation des facteurs de la coagulation et la formation de thrombine. La thrombine ainsi formée va d'une part favoriser la polymérisation de la fibrine qui stabilise le thrombus et d'autre part amplifier l'activation des plaquettes (Jackson et al., 2003, Gibbins, 2004, Abrams, 2005, Jackson, 2007).



**Figure 4 : Résumé des grandes étapes de l'activation plaquettaire lors d'une brèche de la paroi vasculaire dans des conditions de flux artériel (d'après Clemetson, 1995).**

## ***A. Les principales protéines adhésives et leurs récepteurs***

Suite à une lésion vasculaire, différentes protéines adhésives vont jouer un rôle majeur dans l'interaction des plaquettes avec le sous-endothélium et dans l'agrégation : le vWF, le collagène, la fibronectine et le fibrinogène.

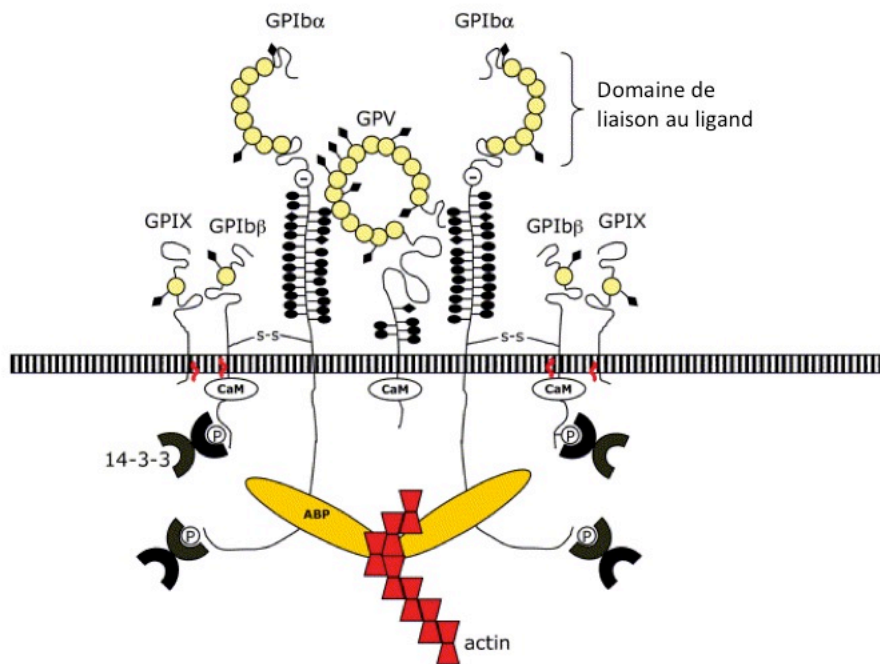
### **1. Le vWF et son récepteur le complexe GPIb-IX-V**

Le facteur von Willebrand est une glycoprotéine circulant dans le plasma sous forme de multimère dont la taille varie de 500 à 200 000 kDa. Les formes multimériques du vWF sont composées de sous-unités polypeptidiques de 250 kDa liées par des ponts disulfures. La variabilité du poids moléculaire reflète le nombre de sous-unités constituant la protéine et l'activité de la protéase ADAMTS13 qui clive les formes multimériques de haut poids moléculaire de vWF. Le vWF est synthétisé par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes (Jaffe et al., 1974, Kupinski and Miller, 1985). Il est stocké dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales (Reinders et al., 1988) et dans les granules  $\alpha$  des plaquettes (Schmugge et al., 2003). Dans les plaquettes, le vWF est relargué après stimulation par les agonistes physiologiques tels que la thrombine et le collagène.

Il se lie rapidement au sous-endothélium et joue un rôle important dans l'initiation et la progression du thrombus au niveau de la lésion vasculaire. Dans des conditions de force de cisaillement élevées, le vWF est impliqué non seulement dans l'adhésion primaire transitoire des plaquettes mais aussi dans l'agrégation plaquettaire (Ruggeri et al., 1999, Mendolicchio and Ruggeri, 2005, Jackson, 2007, Franchini, 2006). La liaison du vWF aux plaquettes nécessite en effet un changement conformationnel de ce dernier qui a lieu lorsqu'il interagit avec le sous endothélium en présence de forces de cisaillement élevées. Lorsque le site de liaison est exposé, les plaquettes interagissent avec le vWF via le complexe GPIb-IX-V.

La maladie de Willebrand est la plus fréquente des pathologies hémorragiques, causée par des défauts de concentration, de structure ou de fonction du vWF. Trois types de maladie de Willebrand sont décrits. Le type 1, forme la plus courante, et le type 3, forme la plus rare, sont dus à un déficit quantitatif du vWF, partiel pour le type 1 et sévère pour le type 3. Le type 2 est dû à un défaut qualitatif du vWF, du fait d'altérations de sa structure (Fressinaud and Meyer, 2005, Nurden, 2007).

Le complexe GPIb-IX-V est composé de quatre sous-unités transmembranaires dont chacune est un membre de la superfamille des protéines riches en leucine : GPIb $\alpha$  (CD42b), GPIb $\beta$  (CD42c), GPIX (CD42a) et GPV (CD42d). Ces sous-unités sont assemblées selon la stœchiométrie 2:2:2:1 (Figure 5) (Andrews et al., 2003). Le complexe GPIb-IX-V est un récepteur d'adhésion exclusivement exprimé à la surface des mégacaryocytes et des plaquettes. Il est présent de façon constitutive à la surface des plaquettes à hauteur de 25 000 copies/plaquette.



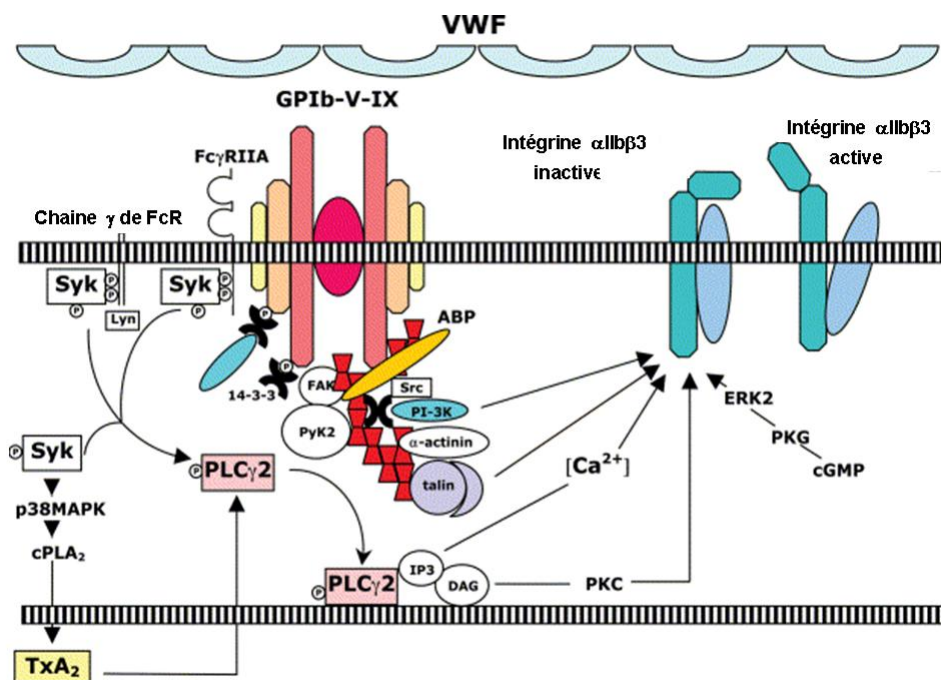
**Figure 5 : Structure du complexe GPIb-IX-V (d'après Canobbio et al., 2004).**

Dans des conditions de force de cisaillement élevées (artérioles, microcirculation, sténoses athéromateuses), les plaquettes entrent en contact avec le sous-endothélium grâce à l'interaction du complexe protéique GPIb-IX-V avec le vWF lié aux fibres de collagène. Cette interaction est responsable des premiers contacts plaquette-paroi vasculaire et conduit au ralentissement des plaquettes au niveau de la lésion vasculaire (Savage et al., 1996, Andrews et al., 1999).

Le rôle essentiel du complexe GPIb-IX-V dans l'hémostase a été mis en évidence chez des patients présentant un trouble hémorragique héréditaire dénommé syndrome de Bernard-Soulier (Kunishima et al., 2002b). Chez ces patients, le récepteur GPIb-IX-V est absent ou faiblement exprimé du fait de mutations pouvant porter sur différentes sous-unités. Plus de trente mutations portant sur GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  ou GPIX ont été décrites à ce jour (Kunishima et al., 1999, Kunishima et al., 2000, Kunishima et al., 2002a).

Les partenaires intracellulaires du complexe GPIb-IX-V sont notamment la filamine (qui permet le pontage entre GPIb $\alpha$  et l'actine sous-membranaire (Cranmer et al., 2005), la protéine 14-3-3 $\zeta$  (protéine de signalisation plaquettaire) et la calmoduline qui intervient dans le changement de forme des plaquettes en réponse aux agonistes, en participant à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Andrews et al., 2001).

La signalisation engagée par le complexe GPIb-IX-V dépend du recrutement autour des queues cytoplasmiques de la sous-unité GPIb $\beta$  avec des protéines de signalisation (Figure 6). Il a été proposé que l'activation de GPIb-IX-V conduit à la phosphorylation sur résidus tyrosine des motifs ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) présents sur les récepteurs Fc $\gamma$ RIIA et sur la chaîne  $\gamma$  associée à GPVI. Les chaînes  $\gamma$  forment un complexe avec GPIb-IX-V et la protéine Syk. Il en résulte une activation de la phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) qui conduit à la production des seconds messagers inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG) activant respectivement la mobilisation du calcium et la protéine kinase C (PKC) nécessaires à l'activation de l'intégrine  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  (Canobbio et al., 2004, Du, 2007, Ozaki et al., 2005).



**Figure 6 : Voies de signalisation organisées autour du complexe GPIIb-V-IX engagé.**  
vWF : Facteur de von Willebrand ; GP : glycoprotéine ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ;  
cPLA2 : phospholipase A2, PLC $\gamma$ 2 : phospholipase C $\gamma$ 2, TxA2 : thromboxane A2 ; IP3 : inositol 1,4,5-  
trisphosphate ; DAG : diacylglycérol ; PKC : protéine kinase C ; FAK : Focal Adhesion Kinase ; PI-3K :  
phosphoinositide 3-kinase ; PKG : protéine kinase G ; cGMP : guanosine 5'-monophosphate cyclique ;  
ABP : Actin binding Protein (d'après Canobbio et al., 2004).

## 2. Le collagène et ses récepteurs, l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ et GPVI

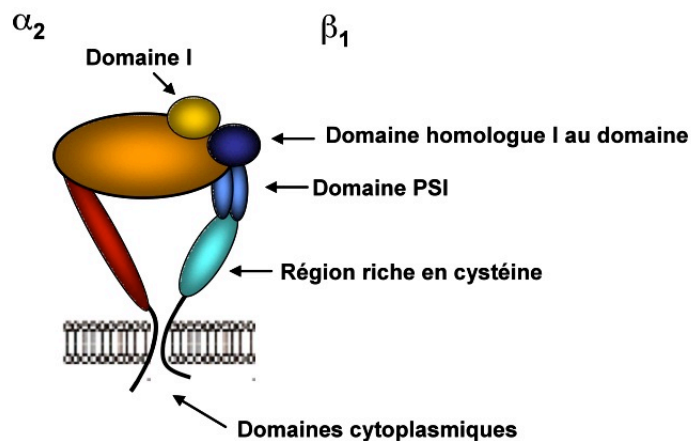
Le collagène, composant majeur de la paroi artérielle, est une protéine fibreuse insoluble de la matrice extracellulaire. Sa famille compte 23 types de collagènes dont 9 sont présents dans la paroi vasculaire (I, III, IV, V, VI, VIII, XII, XIII et XI). Les types I et III sont les constituants majeurs de la matrice extracellulaire (Nieswandt and Watson, 2003). Outre la liaison au vWF circulant, le collagène peut interagir avec deux récepteurs plaquettaire spécifiques :  $\alpha_2\beta_1$  et GPVI (Watson, 1999, Clemetson and Clemetson, 2001).

L'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  est le premier récepteur identifié comme responsable de l'adhésion des plaquettes au collagène (Saelman et al., 1994). Cette intégrine, présente à la surface des plaquettes à une densité d'environ 900 à 3500 copies/plaquette, possède une affinité différente selon le type de collagène avec une plus grande affinité pour le collagène sous une forme monomérique.

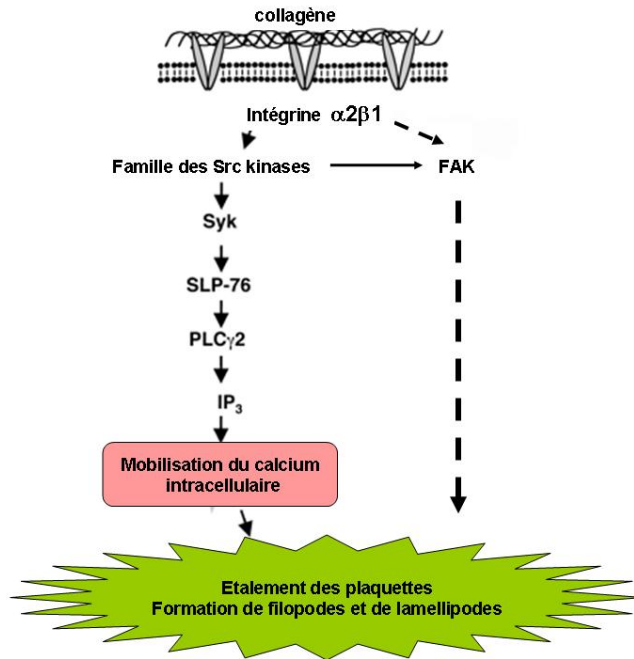
L'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  est un hétérodimère formé d'une sous-unité  $\alpha_2$  (150 kDa) et d'une sous-unité  $\beta_1$  (130 kDa), toutes deux étant composées d'une région extracellulaire, d'un

domaine transmembranaire et d'une région cytoplasmique (Figure 7). La sous-unité  $\alpha_2$  contient dans sa partie extracellulaire le domaine I pour « insert » qui joue un rôle crucial pour la liaison de l'intégrine au collagène (Tuckwell et al., 1995). La partie cytoplasmique des chaînes  $\beta$  des intégrines est assez courte et contient des séquences relativement bien conservées qui interagissent avec les composants du cytosquelette (Calderwood et al., 2000).

L'engagement de l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  induit l'activation des kinases de la famille Src puis l'activation de Syk (qui conduit à l'activation de la PLC $\gamma$ 2 et à la mobilisation calcique) ainsi que l'activation de FAK (qui contribue à l'étalement des plaquettes et à la formation de filopodes et de lamellipodes) (Inoue et al., 2003) (Figure 8). Toutefois, la signalisation induite par  $\alpha_2\beta_1$  dans les plaquettes est relativement modeste.



**Figure 7 : Représentation schématique de l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  (d'après Humphries, 2000).**

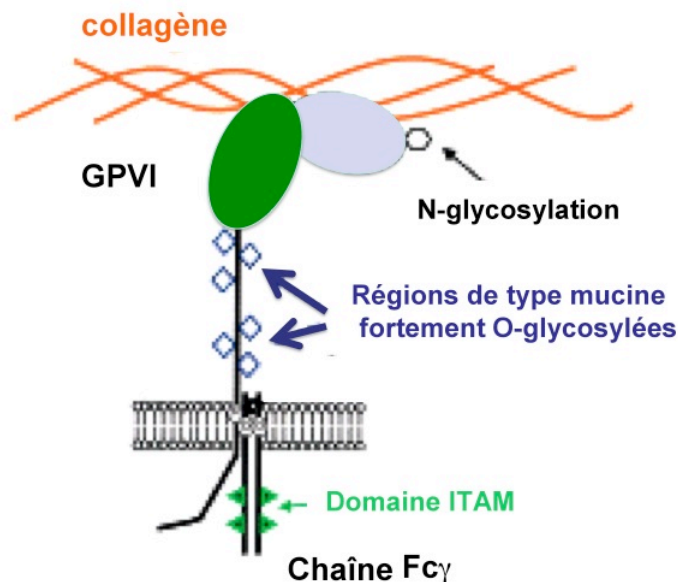


**Figure 8 : Voies de signalisation dépendante de l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$ . PLC $\gamma_2$  : phospholipase C $\gamma_2$  ; IP $_3$  : inositol 1,4,5-*tris*phosphate ; FAK : Focal Adhésion Kinase (d'après Inoue et al., 2003).**

Le second récepteur plaquettaire du collagène, la glycoprotéine GPVI est une protéine transmembranaire, constituée de 339 acides aminés, présente à la surface des plaquettes à une densité d'environ 1200 à 3700 copies/plaquette (Best et al., 2003). GPVI appartient à la superfamille des immunoglobulines, il est exclusivement retrouvé dans les plaquettes et les mégacaryocytes (Jandrot-Perrus et al., 2000, Berlanga et al., 2000) sous forme d'un complexe constitutif et non covalent avec la chaîne  $\gamma$  commune aux récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines (FcR) (Tsuji et al., 1997).

GPVI est composé d'une région extracellulaire constituée de deux domaines homologues aux immunoglobulines de type C2 permettant l'interaction avec le collagène et d'une région de type mucine riche en résidus sérine et thréonine et fortement O-glycosylée (Moroi and Jung, 2004) (Figure 9). La région cytoplasmique présente deux séquences uniques : un motif riche en proline, qui peut lier des protéines contenant des domaines SH3 (Src Homology 3) telles que les tyrosine kinases Fyn et Lyn, et une région basique, identifiée comme le domaine de liaison à la calmoduline qui s'associe de façon constitutive à GPVI dans les plaquettes au repos et qui se dissocie lors de l'activation plaquettaire (Andrews et al., 2002). La chaîne  $\gamma$  des FcR est un homodimère de deux chaînes, chacune contenant deux résidus tyrosine présents dans une séquence ITAM. GPVI joue un rôle déterminant dans

l'adhésion au collagène fibrillaire (Miura et al., 2002) et est considéré comme le récepteur du collagène activant de façon très efficace la signalisation intracellulaire (Nieswandt and Watson, 2003).



**Figure 9 : représentation schématique du récepteur GPVI (d'après Clemetson and Clemetson, 2001).**

La liaison du collagène au récepteur GPVI va déclencher une cascade de signalisation induisant l'activation de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Figure 10). Lors de l'interaction collagène-GPVI, Fyn et Lyn vont entrer en contact avec la chaîne  $\gamma$  du FcR et phosphoryler les résidus tyrosine des motifs ITAM des chaînes  $\gamma$ . Ces derniers vont alors recruter la tyrosine kinase Syk via l'interaction de ses domaines SH2 (Src Homology 2 domains) aux domaines ITAM phosphorylés. L'activation de Syk entraîne alors une cascade de signalisation faisant intervenir la formation d'un jeu de protéines adaptatrices et effectrices (complexe de signalisation) dont les principaux composants sont LAT (*Linker for Activation of T-cells*), SLP-76 (*SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa*), Gads, le facteur d'échange Vav, des tyrosines kinases de la famille Btk (Bruton's tyrosine kinase) et des enzymes du métabolisme des phosphoinositides (PI) : la PI 3-kinase (PI3K) et la PLC $\gamma$ 2. La PLC $\gamma$ 2 hydrolyse le PI(4,5)P2 entraînant la mobilisation du  $Ca^{2+}$  et l'activation de la PKC, deux événements essentiels au remaniement du cytosquelette plaquettaire (changement de forme des plaquettes, formation de lamellipodes et de filopodes), à la libération du contenu des





- Le modèle « multisites – multiétapes » : des études ont montré que l'affinité de l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  pour le collagène dépend des voies de signalisation induites par des agonistes plaquettaire. Ainsi, lors d'une stimulation par l'ADP ou par le TXA2, ou lors d'une stimulation spécifique de GPVI, l'affinité d' $\alpha_2\beta_1$  pour le collagène augmente.  $\alpha_2\beta_1$  change alors de conformation en passant d'un état de faible affinité à un état intermédiaire ou de forte affinité. La concentration en agonistes ainsi que les voies de signalisation activées conditionnent le changement de conformation d' $\alpha_2\beta_1$  (Jung and Moroi, 2000, Moroi et al., 2000). GPVI jouerait par conséquent un rôle central dans l'adhésion ferme des plaquettes au sous-endothélium en générant des signaux intracellulaires responsables de l'activation d' $\alpha_2\beta_1$ .

### **3. La fibronectine**

La fibronectine est une protéine ubiquitaire qui existe sous une forme plasmatique soluble, produite par les hépatocytes, et sous une forme tissulaire insoluble. Elle est formée de deux sous-unités de structure identique. Chacune est composée de trois types de répétition homologue (I, II et III). La répétition III contient la séquence RGD qui peut interagir avec les intégrines  $\alpha_{IIb}\beta_3$  et  $\alpha_5\beta_1$  notamment (Beumer et al., 2000, Beumer et al., 1994). C'est un constituant important du sous-endothélium des vaisseaux sanguins. La fibronectine participe à l'adhésion et à l'étalement des plaquettes dans des conditions statiques et de faible flux (Beumer et al., 2000).

### **4. Le fibrinogène**

Le fibrinogène est une glycoprotéine de 340 kDa synthétisée par les hépatocytes et présent en grande quantité dans le plasma (7 à 10  $\mu\text{M}$ ) et dans les granules  $\alpha$  des plaquettes (140  $\mu\text{g}/10^9$  plaquettes).

Le fibrinogène, sécrété du contenu des granules  $\alpha$  des plaquettes, intervient dans l'agrégation des plaquettes et la stabilisation du thrombus, par l'intermédiaire de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  pour laquelle il possède 3 sites d'interaction. Il n'est pas un constituant physiologique de la paroi vasculaire, toutefois il peut se lier très rapidement au sous-endothélium dénudé. Le fibrinogène est part ailleurs le substrat final de la coagulation au cours de laquelle il est hydrolysé par la thrombine et se polymérise pour former la fibrine, consolidant ainsi le thrombus.

Son récepteur est l'intégrine  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  qui est détaillée dans le chapitre 1 D.

Des pathologies héréditaires rares peuvent affecter la quantité (afibrinogénémie et hypofibrinogénémie) ou la qualité (dysfibrinogénémies) du fibrinogène circulant. Les patients atteints d'un déficit quantitatif ont un phénotype hémorragique plus sévère dans les cas d'afibrinogénémie que dans les cas d'hypofibrinogénémie. Les patients présentant un déficit qualitatif ont un phénotype variable : une grande partie demeure asymptomatique, certains présentant des complications hémorragiques et d'autres des complications thrombotiques (Acharya and Dimichele, 2008). Les mutations à l'origine des afibrinogénémies ont été détectées dans les trois gènes codant pour cette glycoprotéine (FGA, FGB et FGG). Les mécanismes conduisant à un déficit quantitatif sont variables en fonction de la mutation, agissant sur le taux ou la stabilité de l'ARNm ou affectant la stabilité, l'assemblage ou la sécrétion de la protéine (Neerman-Arbez, 2006).

## ***B. Les agonistes solubles et leurs récepteurs***

### **1. La thrombine et ses récepteurs**

La thrombine joue un rôle majeur dans l'hémostase. Elle est un puissant activateur des plaquettes et elle est l'élément clef de la voie finale de la cascade de la coagulation en convertissant le fibrinogène en fibrine pour la consolidation du thrombus (Fenton, 1995).

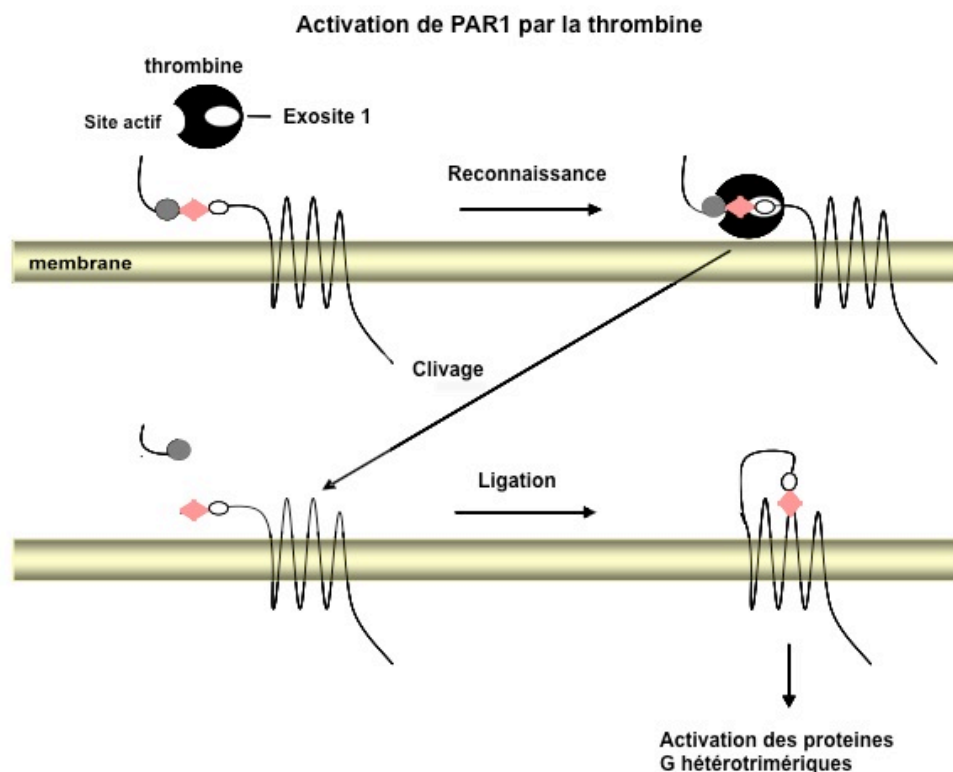
Au niveau plaquettaire, elle agit par l'intermédiaire de récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG), les récepteurs PARs (Protease-Activated Receptors) (Coughlin, 2000, Coughlin, 2005). Trois membres de la famille des PARs ont été identifiés dans les plaquettes humaines. Les isoformes PAR1, PAR3 et PAR4 sont des récepteurs de la thrombine. PAR2, un autre membre de la famille des PARs, est activé par une autre sérine protéase, la trypsine, et il n'est pas présent dans les plaquettes (Bohm et al., 1996).

Des différences d'expression existent entre les espèces. En effet, les deux isoformes PAR1 et PAR4 sont présents à la surface des plaquettes humaines alors que les isoformes PAR3 et PAR4 sont présents dans les plaquettes murines (Ofosu, 2003, Kahn et al., 1999). Les récepteurs PAR1 et PAR4 sont couplés aux protéines G hétérotrimériques  $G_{\alpha_q}$  et  $G_{\alpha_{12/13}}$ . Seul le récepteur PAR1 est aussi couplé à  $G_{\alpha_i}$  (Voss et al., 2007). Leur mode d'action est particulier puisqu'ils sont activés par protéolyse.

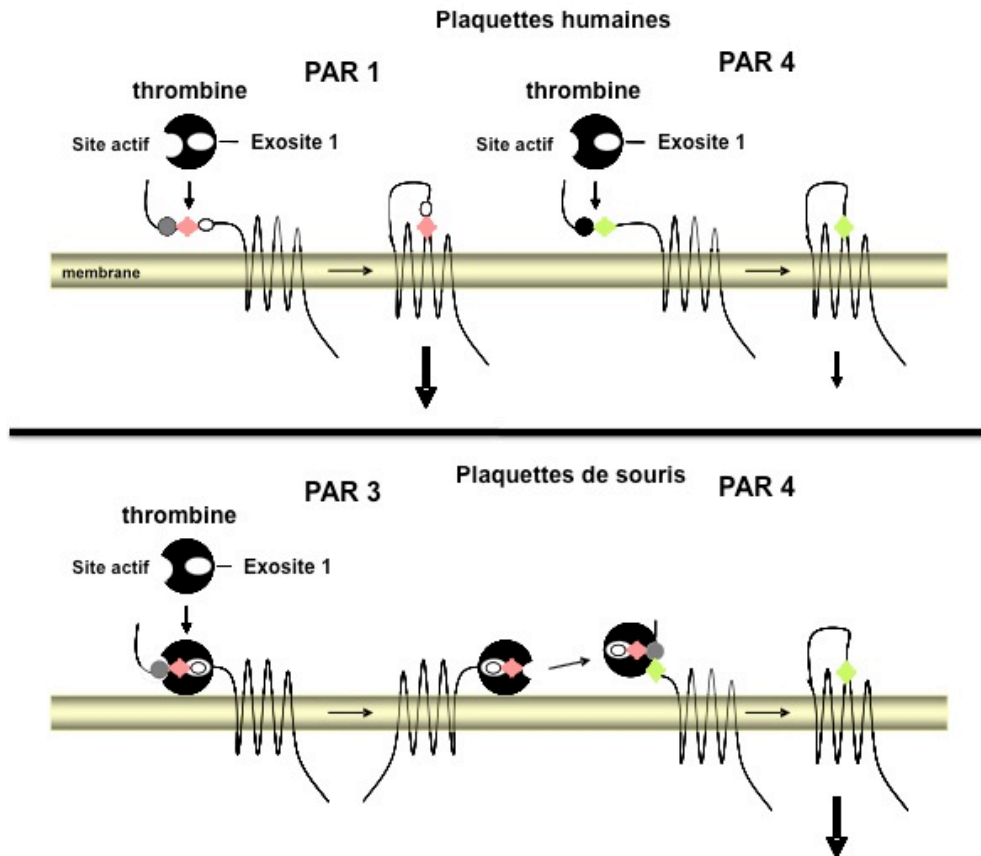
PAR1 possède un site de reconnaissance pour la thrombine, le domaine hirudine-like riche en résidus acides. Cette interaction entraîne un clivage d'un peptide au niveau des acides

aminés Arg41 et Ser42 qui aboutit à la génération d'une nouvelle extrémité N-terminale du récepteur (SFFLRN) devenant alors le ligand se liant au récepteur PAR1 (Figure 11) (Coughlin, 2005). Un peptide synthétique de la séquence SFFLRN, le TRAP (*Thrombin Receptor Activating Peptide*), est spécifique du récepteur PAR1 et peut activer celui-ci en absence d'activité protéasique et de clivage du récepteur (Vu et al., 1991).

Le récepteur PAR4 s'active de la même façon que le PAR1 avec un clivage par la thrombine et la génération d'une séquence peptidique (GYPGKV) se liant et activant le récepteur PAR4 (Faruqi et al., 2000). L'absence d'un site de reconnaissance hirudine-like dans le PAR4 explique sa plus faible affinité pour la thrombine (Kahn et al., 1999). Le récepteur murin PAR3 possède un mode d'activation différent des deux précédents puisque son activation est liée à celle du récepteur PAR4. La signalisation n'est pas induite par PAR3 seul, mais dépend de la signalisation de PAR4. PAR3 agit en effet comme cofacteur pour le clivage et l'activation de PAR4 à de faibles concentrations de thrombine (figure 12) (Nakanishi-Matsui et al., 2000).



**Figure 11 : Mécanisme d'activation de PAR1.** PAR : *Protease-Activated Receptor* (d'après Coughlin, 2005).



**Figure 12 : Représentation schématique de l'activation des récepteurs PARs dans les plaquettes humaines et murines. PAR : *Protease-Activated Receptor* (d'après Coughlin, 2005).**

## 2. Le Thromboxane A2 et ses récepteurs

Le TXA2 fait partie de la famille des prostanoides dérivés de l'acide arachidonique. Le TXA2 est synthétisé lors de l'activation plaquettaire après activation de la phospholipase A2, puis libéré probablement par diffusion à travers la membrane plasmique.

Le TXA2 possède chez l'homme deux récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques : TP $\alpha$  et TP $\beta$  qui diffèrent par leur extrémité C terminale (Hirata et al., 1991). Les récepteurs TP sont couplés aux protéines G hétérotrimériques G $\alpha$ q et G $\alpha$ 12/13 (Knezevic et al., 1993, Djellas et al., 1999, Offermanns et al., 1994).

### 3. L'ADP et ses récepteurs

L'ADP est stocké à de fortes concentrations dans les granules denses des plaquettes au repos. Suite à l'activation des plaquettes par différents agonistes, l'ADP est sécrété dans le milieu extracellulaire et permet la potentialisation de l'activation plaquettaire.

A la surface des plaquettes, il existe deux récepteurs purinergiques de l'ADP : les récepteurs à sept segments transmembranaires, P2Y1 et P2Y12 (Gachet et al., 2006, Murugappa and Kunapuli, 2006, Cattaneo, 2007).

Par lui-même, l'ADP est un agoniste relativement faible des plaquettes et nécessite alors l'activation conjointe des deux récepteurs, P2Y1 couplé à  $G\alpha_q$  et P2Y12 couplé à  $G\alpha_i$ . Cependant, on constate que l'activation plaquettaire induite par d'autres agonistes est dans la plupart des cas fortement affectée par le blocage des récepteurs P2Y12, soulignant le rôle clef de l'ADP et de son récepteur P2Y12 dans la potentialisation et l'amplification de la réponse plaquettaire *in vitro* induite par divers agonistes. Le blocage pharmacologique du récepteur P2Y12 dans des conditions physiologiques de flux artériolaires confirme bien que ce dernier est essentiel pour la formation d'agrégats (Goto et al., 2001, Remijn et al., 2002). De rares cas de mutations du récepteur P2Y12 aboutissant à une perte de fonction du récepteur ont été décrites chez l'homme (Cattaneo, 2005).

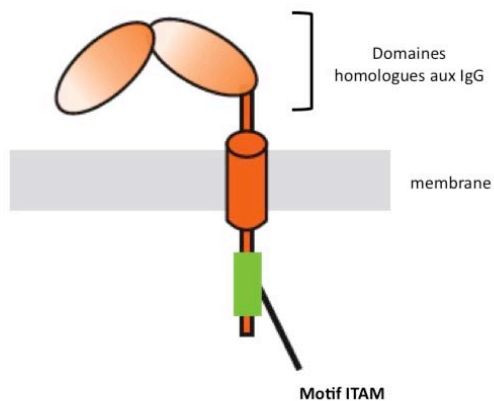
Contrairement au récepteur P2Y12 retrouvé sur les plaquettes principalement, le récepteur P2Y1 est présent dans de nombreux types cellulaires dont les plaquettes à hauteur de 150 copies par plaquette (Burnstock, 2007). Son inhibition pharmacologique ou son inactivation génétique entraîne une absence d'agrégation plaquettaire et de changement de forme en réponse à l'ADP.

Le récepteur P2Y1 est par lui-même à l'origine d'une faible réponse à l'ADP (changement de forme et agrégation plaquettaire transitoire) (Savi et al., 1998). Néanmoins, son activation est critique dans l'initiation de l'agrégation induite par l'ADP et le collagène (Hechler et al., 1998). Les souris dépourvues d'un récepteur P2Y1 fonctionnel n'ont pas de phénotype hémorragique apparent mais ont une résistance au thromboembolisme induit par l'injection d'ADP, de collagène ou d'adrénaline (Leon et al., 1999).

#### 4. Le fragment Fc des Ig et le récepteur FcγRIIa

Le récepteur FcγRIIa est un membre de la famille des récepteurs Fcγ, composée de glycoprotéines majoritairement exprimées dans les cellules hématopoïétiques. Douze différents transcrits ont été décrits, issus de huit gènes distincts et regroupés en 3 classes : I, II et III (FcγRI, FcγRII et FcγRIII) (van de Winkel and Capel, 1993). Un polymorphisme allélique induit un niveau de diversité supplémentaire au sein de ces récepteurs. Leur affinité pour les IgG varie en fonction des isoformes et du polymorphisme allélique. Les récepteurs FcγRII sont des récepteurs de faible affinité reconnaissant les IgG sous formes de complexe. Comme tous les récepteurs FcγRII, la partie extracellulaire de FcγRIIa comprend deux domaines homologues aux IgG. Sa région intracytoplasmique contient un motif ITAM et aucune activité enzymatique intrinsèque (Figure 13).

Seul FcγRIIa est exprimé dans les plaquettes ou son rôle physiologique est mal connu (Rosenfeld et al., 1985, Kelton et al., 1987). Par contre, comme nous le verrons au chapitre 3 II., il est impliqué dans la thrombopénie induite à l'héparine.



**Figure 13 : Représentation schématique du récepteur FcγRIIa (d'après Lejeune et al., 2010).**

## **C. Les voies de signalisation intraplaquettaires**

### **1. Voies de signalisation dépendantes des protéines G hétérotrimériques**

Au cours de la formation du clou plaquettaire, de nombreux agonistes solubles sont synthétisés ou relargués (ADP, TXA<sub>2</sub>, thrombine) et jouent un rôle clef dans l'amplification de l'activation plaquettaire et le recrutement des plaquettes circulantes environnantes. L'interaction de ces agonistes solubles avec leurs récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques, génère une signalisation dite « inside-out » menant à l'activation de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Offermanns, 2006).

De façon schématique, l'activation plaquettaire via les RCPG comprend 3 grandes voies de signalisation, respectivement initiées par l'activation des sous-unités  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{12/13}$  et  $G\alpha_i$  (Figure 14 et Tableau 1). PAR1, PAR4, TP et P2Y1 sont couplés à  $G\alpha_q$ , P2Y12 et PAR1 sont couplés à  $G\alpha_i$ . TP et PAR1 sont couplés  $G\alpha_{12/13}$ . Les protéines G hétérotrimériques sont constituées d'une sous-unité  $\alpha$  possédant l'activité GTPasique et des sous-unités  $\beta\gamma$ . Les sous-unités  $\alpha$  sont classées en fonction de leurs similarités structurales et fonctionnelles.

Par exemple, la protéine  $G\alpha_q$  induit l'activation de la PLC $\beta$  responsable de la formation d'IP<sub>3</sub> et de DAG conduisant respectivement à la mobilisation calcique induisant notamment l'activation de la MLCK et à l'activation des PKCs. La MLCK phosphoryle la chaîne légère de la myosine impliquée dans la formation de complexes d'acto-myosine responsables de la génération de forces de tension nécessaires à une agrégation forte. Plusieurs isoformes de PKC conventionnelles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), nouvelles ( $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ) et atypiques ( $\zeta$ ) sont retrouvées dans les plaquettes : PKC $\beta$ , PKC $\delta$  et PKC $\theta$ . Les PKC $\beta$  et PKC $\alpha$  sont impliquées dans la régulation de la signalisation dite « outside-in » tandis que la PKC $\delta$  régule la formation des filopodes (Harper and Poole, 2007).

La protéine  $G\alpha_{12/13}$  induit l'activation de la GTPase RhoA qui stimule la Rho-kinase qui contribue au maintien de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Gratacap et al., 2001, Klages et al., 1999).

La protéine  $G\alpha_i$  inhibe l'adénylate cyclase responsable de la production d'AMPc, induisant donc une diminution des taux d'AMPc intracellulaire. Cela conduit donc à une diminution de l'activité sérine/thréonine kinase de la PKA qui joue un rôle inhibiteur dans l'activation plaquettaire. Une des cibles de cette dernière est la protéine VASP (Vasodilatator



Stimulated Phosphoprotein) dont la phosphorylation contribue à réguler négativement l'agrégation plaquettaire via l'inhibition de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Par ailleurs, le complexe  $\beta/\gamma$  de la protéine  $G_i$  participe à l'activation de PI3Ks responsables de la production de  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ , conduisant à la phosphorylation de la sérine/thréonine kinase Akt via les phosphoinositide-dependent kinase 1 et 2 (PDK1 et PDK2). Les sous-unités  $\beta/\gamma$  de  $G_i$  participent également à l'activation de la GTPase Rap1b impliquée dans l'activation de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Lova et al., 2003, Lova et al., 2002, Woulfe et al., 2002).

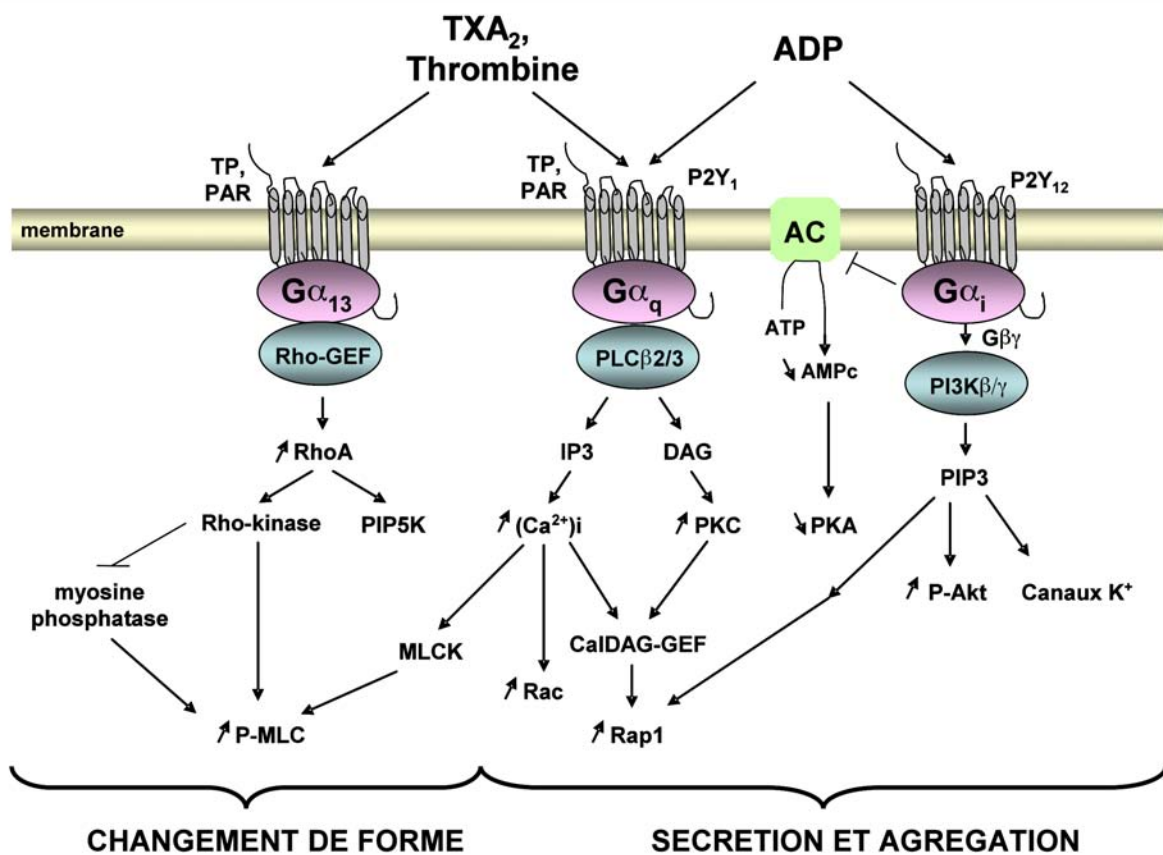


Figure 14 : Exemple de quelques voies de signalisation en aval des RCPG (d'après Offermanns, 2006).

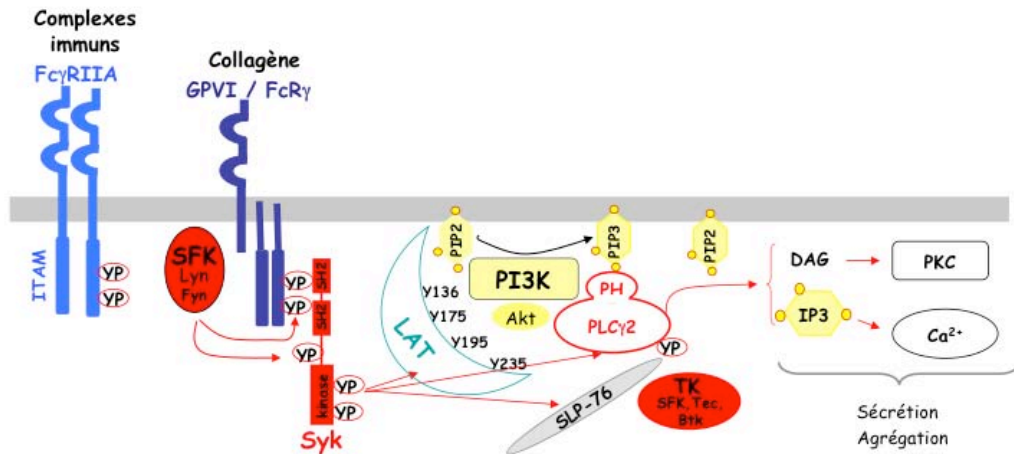
Agonistes	Récepteurs	Quelques effecteurs majeurs
Thrombine	PAR1	G <sub>q</sub> /G <sub>12-13</sub> → PLCβ / PI3K / RhoA G <sub>i</sub> —  Adénylate cyclase
	PAR4	G <sub>q</sub> /G <sub>12-13</sub> → PLCβ / PI3K / RhoA
Thromboxane A <sub>2</sub>	TPα	G <sub>q</sub> /G <sub>12-13</sub> → PLCβ / PI3K / RhoA
ADP	P2Y12	G <sub>i</sub> → PI3Kγ —  Adénylate cyclase
	P2Y1	G <sub>q</sub> → PLCβ
Collagène	GPVI	SFK / Syk / PI3K / PLCγ <sub>2</sub> / Rho GTPases
	α <sub>2</sub> β <sub>1</sub>	SFK / Syk / PI3K / PLCγ <sub>2</sub>
Facteur de Van Willebrand	GpIb-IX-V	SFK
Complexes Immuns	FcγRIIa	SFK / Syk / PI3K / PLCγ <sub>2</sub>
Fibrinogène	α <sub>IIb</sub> β <sub>3</sub>	SFK / FAK / Syk / PI3K / PLCγ <sub>2</sub>

**Tableau 1 : Récepteurs plaquettaires majeurs et voies de signalisation mises en jeu (d'après M. Jandrot Perrus Hématologie 2010).**

## 2. Voies de signalisation dépendantes des ITAM – l'exemple de FcγRIIa

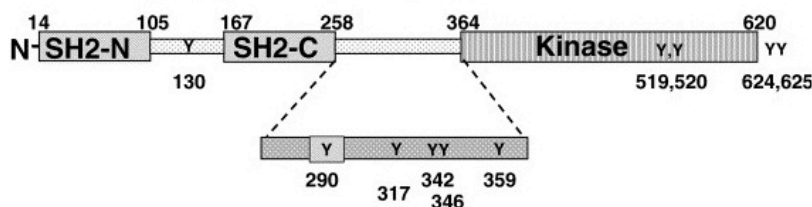
Les voies des tyrosines kinases non récepteur sont particulièrement sollicitées en aval de GPVI, de FcγRIIa et de l'intégrine α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>. Dans les deux premiers cas, le regroupement des récepteurs au niveau de la membrane plasmique provoque la phosphorylation de multiples protéines sur résidus de tyrosine, notamment des motifs ITAM par des kinases de la famille des Src, Fyn et Lyn (Ezumi et al., 1998).

La phosphorylation du motif ITAM de FcγRIIa a lieu très précocement après induction de leur regroupement (dès 15 secondes). La Spleen tyrosine kinase Syk est alors recruté via ses deux domaines SH2 (Src Homology 2 domains) et activée (Chacko et al., 1996). L'activation de Syk entraîne alors une cascade de signalisation faisant intervenir la formation d'un jeu de protéines adaptatrices et effectrices comme LAT, SLP-76, Gads, le facteur d'échange Vav, la PI3Kβ ainsi que la kinase Btk (Bruton's tyrosine kinase) qui vont s'associer sous la forme d'un complexe de signalisation conduisant à l'activation de la PLCγ<sub>2</sub> et à la génération du DAG et de l'IP<sub>3</sub> (Robinson et al., 1996, Gratacap et al., 1998) (Figure 15).



**Figure 15 : Voies de signalisation dépendante de la glycoprotéine GPVI.** SFK : Src family kinases ; LAT : linker of adaptation of T cell ; SLP76 : Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa ; TK : tyrosines kinases ; Y : tyrosine ; PY : phospho-tyrosine ; PH : pleckstrin homology domain ; SH : Src homology domain (d'après Watson et al., 2005).

Syk est une tyrosine kinase clef dans la signalisation via les motifs ITAM. Cette kinase cytosolique, découverte en 1991, est principalement mais pas exclusivement exprimée dans les cellules hématopoïétiques. Elle contribue à la signalisation des lymphocytes, mastocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles et plaquettes mais elle est également retrouvée dans les fibroblastes, les cellules endothéliales, les ostéoclastes et les hépatocytes (Yanagi et al., 2001). Syk et Zap 70 sont les deux membres de la famille Syk et partagent une très grande homologie structurale. Elles sont composées de deux domaines SH2 à l'extrémité N-terminale, d'un domaine siège de l'activité kinase à l'extrémité C-terminale (figure 16) et de dix résidus tyrosine phosphorylables dont certains sont cibles d'une autophosphorylation (Furlong et al., 1997). Dans les plaquettes, Syk est impliquée dans la signalisation en aval des récepteurs membranaires GPVI,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , CLEC-2 et Fc $\gamma$ RIIa (Watson et al., 2010, Spalton et al., 2009). Syk fait l'objet d'une étude spécifique dans la partie résultats.



**Figure 16 : Représentation schématique de la tyrosine kinase Syk.** Les principaux résidus tyrosine pouvant être phosphorylés sont indiqués (Y) (D'après Siraganian et al., 2002).

#### **D. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et la signalisation « inside-out » et « outside-in »**

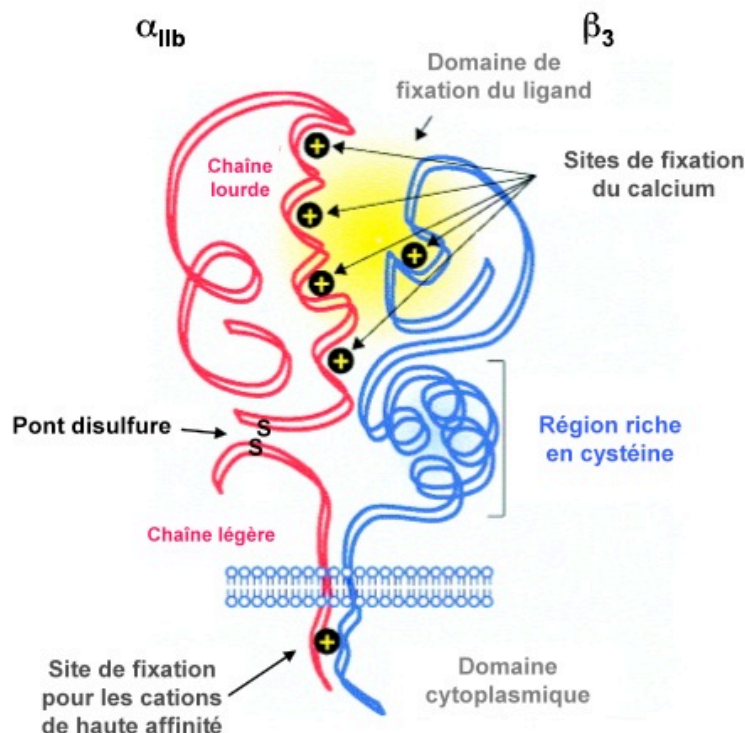
L'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  est au centre de la fonction plaquettaire comme illustré par la pathologie liée à un déficit en cette intégrine, la thrombasthénie de Glanzmann. L'événement essentiel et strictement contrôlé de l'agrégation plaquettaire est la conséquence de la transition d'un état de faible affinité de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  vers un état de forte affinité lui permettant de lier le fibrinogène soluble. La liaison du fibrinogène permettra alors la formation de ponts entre les plaquettes et, à terme, le phénomène d'agrégation. L'activation de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  est induite par de nombreux agonistes plaquettaires. Le mécanisme, lié à un changement conformationnel de l'intégrine, est communément appelé « signalisation inside-out ».

Le terme « signalisation outside-in » désigne les événements de signalisation qui émanent de l'intégrine dès la fixation d'une molécule de fibrinogène sur  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .

##### **1. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$**

L'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  est strictement exprimée dans les mégacaryocytes et les plaquettes. Elle est présente à la surface des plaquettes au repos (80 000 copies environ), et son expression augmente sous activation à partir des membranes du système canaliculaire ouvert et des granules de sécrétion (Wagner et al., 1996, Nurden et al., 1996).

Les sous-unité  $\alpha_{IIb}$  et  $\beta_3$  sont composées d'une extrémité extracellulaire globulaire de grande taille, d'un court domaine transmembranaire unique et d'une relativement courte extrémité cytoplasmique. Les extrémités extracellulaires des deux sous-unités interagissent pour former le domaine de liaison des ligands. Les queues cytoplasmiques interagissent également et régulent l'activation de l'intégrine, sa signalisation et son interaction avec différents partenaires (Shattil and Newman, 2004). La sous-unité  $\alpha_{IIb}$  est composée d'une chaîne lourde (117 kDa) et d'une chaîne légère (23 kDa) liées par un pont disulfure. Seule la chaîne légère traverse la membrane. Quatre sites potentiels de liaison du calcium sont localisés sur la sous-unité  $\alpha_{IIb}$ . En effet, le calcium est un cofacteur essentiel pour la formation de l'hétérodimère, la fixation des protéines adhésives et le maintien de l'association non covalente des deux sous-unités. La sous-unité  $\beta_3$  est une chaîne polypeptidique unique caractérisée par la présence de nombreux ponts disulfures intramoléculaires (Figure 17).



**Figure 17 : Représentation de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (d'après Topol et al., 1999).**

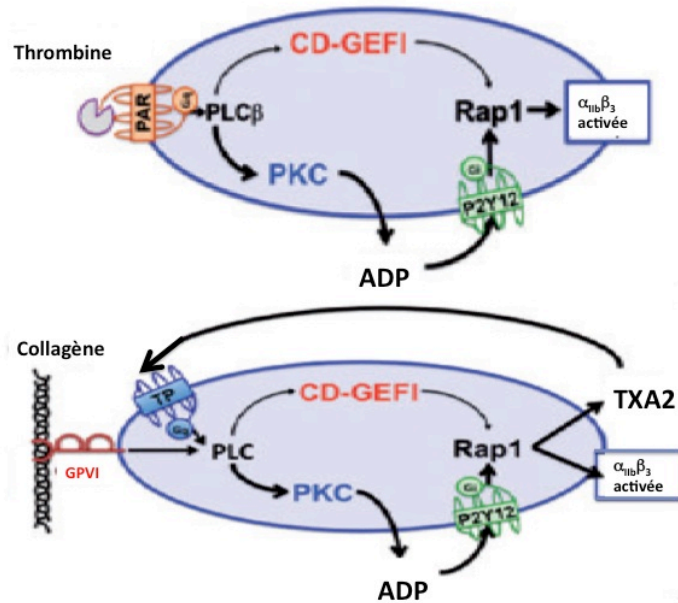
## 2. La signalisation « inside-out »

Dans les plaquettes au repos l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  est dans un état de faible affinité incapable de lier le fibrinogène soluble. La modification de son affinité est liée à un changement conformationnel de la molécule (Shattil et al., 1998). De nombreux agonistes plaquettaires tels que la thrombine, l'ADP, les complexes immuns, le collagène ou le TXA2 sont capables d'induire une augmentation de l'affinité de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  grâce à une signalisation inside-out. Les cascades d'événements de signalisation qui découlent de l'interaction ligand-récepteurs et conduisent au changement conformationnel de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  sont encore mal caractérisées bien que des progrès importants aient été réalisés ces dernières années. L'une des voies communes à tous les agonistes plaquettaires est l'activation rapide du métabolisme des PI avec stimulation des PLCs et production de deux seconds messagers : l'IP3 et le DAG. L'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  cytosolique est un élément important pour l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Les domaines cytoplasmiques de l'intégrine

$\alpha_{IIb}\beta_3$  jouent évidemment un rôle essentiel aussi bien pour son activation que pour sa fonction. De nombreuses protéines interagissent directement avec les parties cytoplasmiques de l'intégrine en particulier la  $\beta_3$ -endotoxine, la taline et la kindline qui, en se liant à la sous-unité  $\beta_3$ , sont impliquées dans le processus d'activation de l'intégrine en régulant son affinité mais également sa fonction (Kashiwagi et al., 1997). Le cytosquelette sous-membranaire pourrait jouer un rôle important pour le maintien de l'intégrine dans un état de faible affinité car une population d' $\alpha_{IIb}\beta_3$  interagit directement avec ce cytosquelette dans les plaquettes au repos (Bennett et al., 1999).

Par ailleurs, l'activation de l'intégrine est un mécanisme réversible pour lequel il existe des régulateurs négatifs. Ainsi, l'élévation de la concentration intracellulaire d'AMPc et l'activation de la PKA qui en découle, ou l'activation de la protéine kinase G (PKG) en réponse à une élévation des taux de GMPc sont des événements capables de bloquer rapidement l'activation et l'agrégation des plaquettes en modulant notamment la signalisation inside-out d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ .

Des travaux ont identifié une protéine clef de la signalisation intraplaquettaire conduisant à l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$  : le guanine nucleotide exchange factor CalDAG-GEFI (Crittenden et al., 2004, Cifuni et al., 2008, Stefanini et al., 2009) (Figure 18). CalDAG-GEFI est un facteur d'échange du GDP pour le GTP lié à la GTPase Rap1 qui est importante pour l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Il est régulé par le  $Ca^{2+}$  et le DAG. Les plaquettes issues de souris déficientes en une protéine CalDAG-GEFI fonctionnelle ont une agrégation en réponse à tous les agonistes physiologiques fortement affectée.



**Figure 18 : Modèle schématique de stimulation plaquettaire soutenue et d'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$  par la thrombine (figure du haut) et le collagène (figure du bas). D'après Stefanini and Bergmeier, 2010).**

### 3. La signalisation « outside-in »

Il est clairement établi que les intégrines ne se limitent pas à un rôle mécanique de liaison à des protéines d'adhésion extracellulaires mais agissent également en tant que récepteurs qui transmettent une information de signalisation intracellulaire. La signalisation « outside-in » débute dès la fixation du fibrinogène à l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  qui est suivie par un regroupement des intégrines, ce qui augmente l'avidité pour le fibrinogène. La signalisation émanant de l'engagement d' $\alpha_{IIb}\beta_3$  conduit à la tyrosine phosphorylation de nombreuses protéines, l'activation du métabolisme des PIs et une mobilisation calcique ainsi qu'à la réorganisation du cytosquelette. Des tyrosines kinases de la famille Src (Miranti et al., 1998, Guinebault et al., 1995) et de la famille Tec (Laffargue et al., 1997), la kinase d'adhésion focale (focal adhesion kinase, FAK) (Guinebault et al., 1995), des kinases de lipides telles que les PI3Ks et des phosphatases de protéines ou de lipides (Giuriato et al., 2000) sont relocalisées au niveau des zones d'adhérence focale en réponse à l'engagement de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . L'ensemble de ces processus, liés à une réorganisation particulière du cytosquelette d'acto-myosine, permet la stabilisation des agrégats, la contraction du clou plaquettaire et la rétraction du caillot de fibrine.

## Chapitre 2 : Le transporteur ABCA1

Parmi les régulateurs encore peu connus des plaquettes pouvant impacter sur l'exposition des PS, la production de microparticules et le taux de cholestérol membranaire (donc indirectement sur les mécanismes de signalisation), on compte le transporteur ABCA1.

### I. Présentation des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC (Adénosine Triphosphate Binding Cassette) constituent l'une des classes de protéines membranaires la plus étendue (Higgins, 1992) et sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques. L'importance des transporteurs ABC chez les mammifères est mise en exergue par l'implication de leur dysfonctionnement dans une grande variété de maladies génétiques. Actuellement, environ 15 pathologies sont dénombrées comme étant directement liées à des mutations de transporteurs de la superfamille ABC (Tableau 2). La superfamille des transporteurs ABC regroupe 7 sous-classes depuis ABCA jusqu'à ABCG et comprend 49 membres

Gène	HUGO	Pathologie	Fonction
ABC1	ABCA1	Maladie de Tangier, hypoHDLémie familiale	Efflux de cholestérol
ABCR	ABCA4	Maladie de Stargardt, dégénérescence de la rétine liée à l'âge	Transport de la vitamine A
TAP2	ABCB3	Infection HSV	Présentation antigénique
MDR3	ABCB4	Cholestase intra-hépatique familiale progressive 3	Transport de phospholipides
ABC7	ABCB7	Anémie sidérolastique liée à l'X/ Ataxie	Transport du fer
BSEP	ABCB11	Cholestase intra-hépatique familiale progressive 2	Transport des sels biliaires
MRP2	ABCC2	Syndrome de Dubin-Johnson	Sécrétion des hépatocytes
CFTR	ABCC7	Mucoviscidose	Transport d'électrolytes (Cl <sup>-</sup> )
SUR1	ABCC8	Hypoglycémie hyperinsulinémique de l'enfance	Sécrétion d'insuline
ALD	ABCD1	Adrénoleucodystrophie	Oxydation des acides gras
PMP70	ABCD3	Syndrome de Zellweger	Formation des peroxisomes

**Tableau 2 : Transporteurs ABC humains et maladies génétiques associées (d'après Oram, 2000).**



### **A. Appartenance à la superfamille des transporteurs ABC**

Les transporteurs ABC sont définis selon plusieurs critères :

#### **1. La présence de motifs spécifiques de la famille des ABC**

Les transporteurs ABC sont caractérisés par la présence des motifs Walker A et Walker B (Walker et al., 1982) communs à toutes les ATPases et un motif spécifique de la famille des transporteurs ABC : l'ATS (Active Transport Signature) (Hyde et al., 1990, Broccardo et al., 1999).

#### **2. Une double activité moléculaire**

Ces transporteurs présentent une dualité fonctionnelle : ils possèdent à la fois une activité ATPasique et une activité de transport, le moteur de la translocation de substrat étant alimenté par l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP. Les transporteurs ABC peuvent transporter de multiples molécules (des ions, des protéines, des sucres et des lipides).

#### **3. Une organisation en domaines**

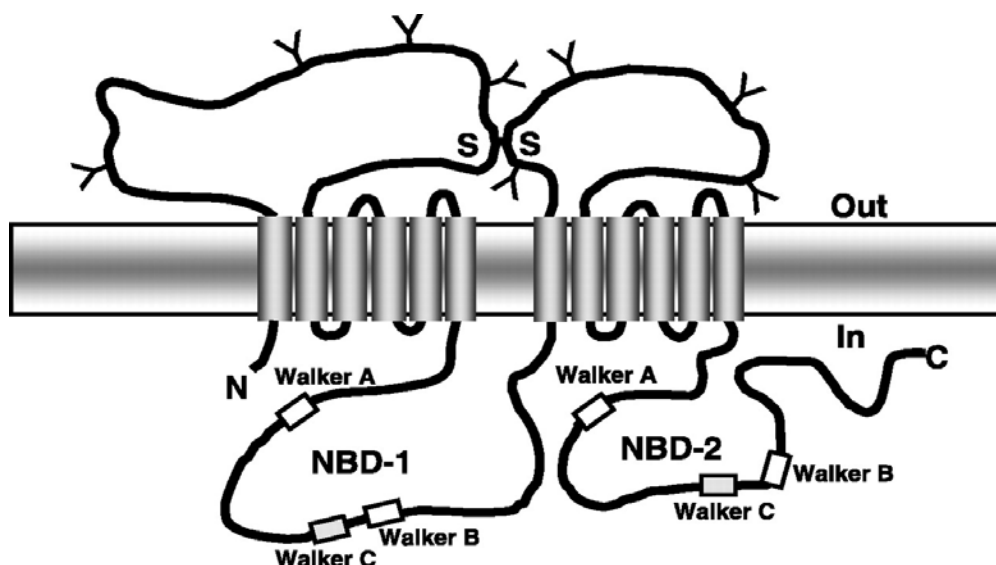
Les transporteurs ABC sont constitués de 4 domaines au minimum associés en tandem :

- 2 domaines hydrophiles responsables de l'activité ATPasique : les NBD (Nucleotide Binding Domains)
- 2 domaines hydrophobes, les TM (TransMembrane domains) traversant généralement 6 fois la membrane, constituant le canal que les allocrites vont emprunter.

## **II. Structure du transporteur ABCA1**

ABCA1 est une protéine membranaire composée de 2261 acides aminés. Il est constitué d'une seule chaîne peptidique formant deux structures similaires conférant une certaine symétrie à la protéine (Fitzgerald et al., 2001).

Il comprend un domaine de liaison nucléotidique cytoplasmique servant de support à son activité ATPasique et un domaine d'ancrage à 6 hélices transmembranaires capable de former un chenal pour le transport de molécules hydrophobes, en particulier de phospholipides et de cholestérol à travers la membrane plasmique (Figure 19).



**Figure 19 :** Organisation en domaine du transporteur ABCA1 (d'après Oram and Heinecke, 2005).

### III. Expression et distribution tissulaire de ABCA1

Le transporteur ABCA1 est largement exprimé dans de nombreux tissus. Chez l'homme, son expression est particulièrement abondante dans le foie et le placenta (Kielar et al., 2001, Lawn et al., 2001). ABCA1 est également exprimé dans les cellules de la lignée myéloïde (Luciani et al., 1994). Il est également présent dans les plaquettes et son ARNm augmente au cours de la différenciation mégacaryocytaire (Nofer et al., 2004, Barlage et al., 2006).

Au niveau cellulaire, ABCA1 est majoritairement localisé au niveau de la membrane plasmique.

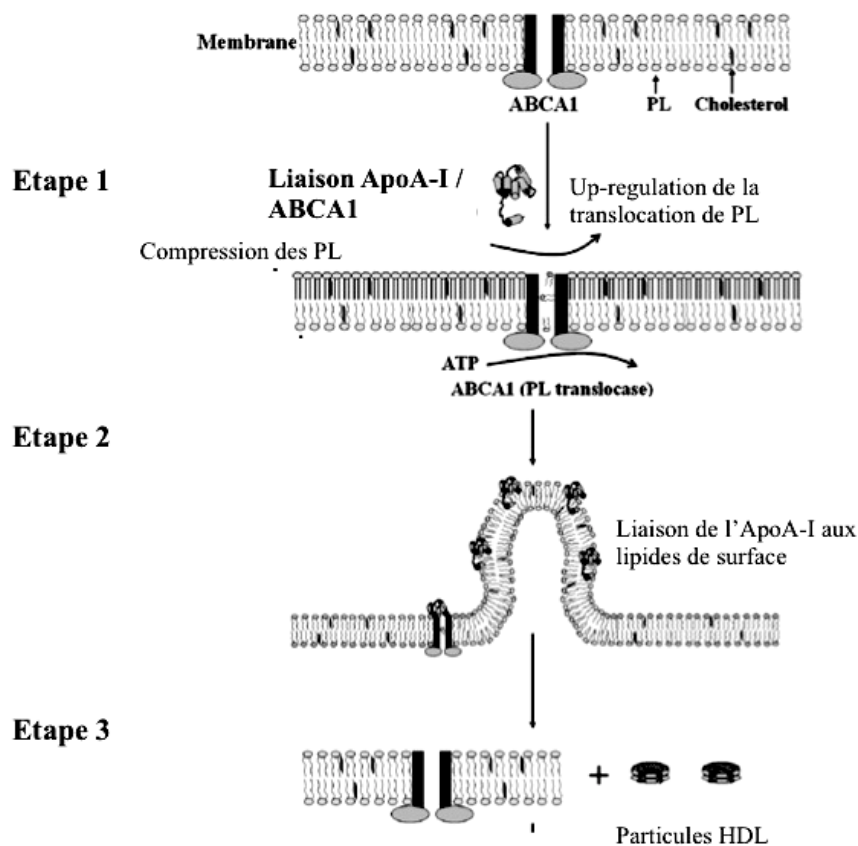
### IV. Fonction

Le transporteur ABCA1 est impliqué dans la première étape du processus de transport réverse du cholestérol correspondant au transfert des phospholipides et du cholestérol vers l'apolipoprotéine A-I au niveau de la membrane plasmique cellulaire (Tang and Oram, 2009). La génération de souris déficientes en ABCA1 a permis de montrer son rôle clé dans le transport reverse du cholestérol en permettant sa sortie des cellules incapables de le

métaboliser vers les apolipoprotéines des particules HDL en formation (pré $\beta$  HDL). En effet, ces souris sont caractérisées par une absence de particules HDL (Christiansen-Weber et al., 2000, Hamon et al., 2000, McNeish et al., 2000, Orso et al., 2000).

L'interaction ABCA1-ApoA-I est un élément déterminant de l'efflux de cholestérol depuis les membranes cellulaires vers les lipoprotéines. La nature de l'interaction moléculaire entre Apo-AI et ABCA1 demeure incertaine.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'efflux de cholestérol assuré par ABCA1 depuis les macrophages vers l'Apo A-I. Il existe de nombreux arguments pour une interaction directe entre Apo A-I et ABCA1 à la surface de la membrane plasmique (Oram et al., 2000). Des travaux utilisant des cellules surexprimant des formes mutées d'ABCA1 ont démontré que les boucles extracellulaires localisées entre TMS1 (Trans Membrane Segment 1) et TMS2 et entre TMS7 et TMS8 seraient à l'origine de l'interaction avec l'Apo A-I (Fitzgerald et al., 2002). ABCA1 serait capable d'interagir avec de nombreuses autres apolipoprotéines que l'Apo A-I comme l'Apo A-II, l'Apo E ou l'Apo A-IV (Remaley et al., 2001). Ces apolipoprotéines contiennent des séquences peptidiques communes au sein de leurs hélices  $\alpha$  (Segrest et al., 1992). Des peptides de synthèse dont la séquence est analogue aux hélices  $\alpha$  des particules HDL sont capables de reproduire un efflux de cholestérol et de phospholipides dépendant de l'activité de ABCA1 (Remaley et al., 2003). L'ApoA-I possède deux sites de haute affinité pour sa liaison à la surface des cellules. Le premier serait constitué par l'interaction directe de l'ApoA-I avec le transporteur ABCA1. Le second site, de plus forte capacité, ne serait pas dépendant de l'interaction ApoA-I/ABCA1 mais serait lié à des interactions ApoA-I / lipides membranaires (Vedhachalam et al., 2007b). Un mécanisme schématique de l'efflux de cholestérol et de phospholipides membranaires dépendant de ABCA1 est proposé dans la figure 20.



**Figure 20 : Mécanisme en 3 étapes de l'interaction ABCA1 – APOA-I.** Etape 1 : Une faible quantité d'ApoA-I interagit avec le transporteur ABCA1. Cette interaction est à l'origine d'une augmentation de l'activité de ABCA1 qui assure la translocation des PL vers le feuillet externe de la membrane cellulaire. Ceci aboutit à une accumulation de PL sur le feuillet externe et à leur raréfaction sur le feuillet interne. Etape 2 : Cette asymétrie de répartition des PL entre les 2 feuillets génère des contraintes et aboutit à la déformation locale de la membrane sous la forme d'un domaine « d'exovésiculation » capable de lier l'ApoA-I avec une grande affinité. Au sein de ces domaines, de grandes quantités d'Apo-AI interagissent directement avec les lipides membranaires. Etape 3 : Elle correspond à la formation spontanée de particules HDL par la mise en suspension de ces domaines où les phospholipides et le cholestérol ont lié l'ApoA-I. PL : phospholipides (**d'après Vadhachalam et al., 2007a**).

ABCA1 est également impliqué dans le processus de phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages (Hamon et al., 2000) et a été proposé comme étant impliqué dans la genèse de microparticules à partir de la membrane plasmique (Combes et al., 2005, Duong et al., 2006). Les mécanismes moléculaires de ces processus restent mal connus.

## **V. ABCA1 et maladie de Tangier**

Dès 1999, plusieurs équipes ont impliqué ABCA1 dans la maladie de Tangier (Bodzioch et al., 1999, Brooks-Wilson et al., 1999, Rust et al., 1999).

### ***A. Phénotype de la maladie de Tangier***

La maladie de Tangier (du nom de l'île de Tangier où a été identifié le premier cas) a été décrite pour la première fois en 1961 par Frederickson (Fredrickson, 1964). Les patients atteints par cette pathologie rare présentent une hépato-splénomégalie, une lymphadénopathie, une augmentation de volumes des amygdales. Cette hypertrophie de l'ensemble des tissus lymphoïdes est due à une accumulation d'esters de cholestérol. L'accumulation de cholestérol dans les cellules et en particulier les macrophages alors baptisés « foam cells » est associée au développement d'un athérome précoce et à un sur risque d'événements cardiovasculaires. En effet, les patients atteints d'une forme homozygote ont un risque d'événements coronarien multiplié par 6 après l'âge de 30 ans (Serfaty-Lacrosniere et al., 1994).

La maladie de Tangier est marquée par un profond dysfonctionnement du métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines (Huang et al., 1995) se traduisant par un effondrement des taux de HDL plasmatiques et de l'apolipoprotéine A-I entraînant une baisse du cholestérol sanguin. Chez les sujets hétérozygotes, le taux de HDL cholestérol est diminué de moitié par rapport à celui observé chez les sujets sains.

A ce jour, quelques cas de saignements ont été rapportés chez des patients atteints de maladie de Tangier, notamment une hémorragie digestive (Bektas et al., 2008) et un hématome spontané splénique (Hooper et al., 2009). Des dysfonctionnements de l'hémostase ont été rapportés chez les patients atteints de la maladie de Tangier ainsi que chez les souris déficientes en ABCA1 mais les causes exactes restent inconnues (Orso et al., 2000, Nofer et al., 2004).

### ***B. Génétique de la maladie de Tangier***

La maladie de Tangier est une maladie héréditaire autosomique récessive. Sa prévalence est rare avec une centaine de cas rapportés dans la littérature (Oram, 2000). De multiples mutations du gène ABCA1 ont été décrites chez les patients atteints de la maladie de Tangier et il est probable que selon le type de mutation, un large spectre de pathologies

ABCA1 dépendantes existe depuis la maladie de Tangier correspondant à une perte complète de la fonction de ABCA1 jusqu'à un risque modéré de développement de pathologies cardiovasculaires (Brooks-Wilson et al., 1999). D'une manière générale, une maladie cardiovasculaire précoce est associée avec toute mutation aboutissant à une perte de fonction de ABCA1 (Singaraja et al., 2003). Par ailleurs, certains polymorphismes d'ABCA1 sont associés à des taux de HDL cholestérol plus élevés et à un risque d'événement cardiovasculaire plus faible (Ma et al., 2011).

## **VI. Rôle de ABCA1 dans l'exposition des PS ?**

L'exposition des PS au niveau de la cellule cible est un élément crucial dans la reconnaissance et le déclenchement de la phagocytose des cellules apoptotiques. ABCA1 serait impliqué dans l'exposition des PS sur le feuillet externe des membranes plasmiques au cours de l'apoptose (Hamon et al., 2000) ; les macrophages de souris ABCA1 *-/-* perdant leur capacité à phagocyter leur cible apoptotique.

Le rôle d'ABCA1 dans l'exposition des PS sur le feuillet externe des plaquettes a été évoqué, notamment à partir d'un cas rapporté de mutation du gène ABCA1 chez un patient atteint du syndrome de Scott (Albrecht et al., 2005). Cette hypothèse a été contestée par des travaux menés sur un modèle canin du syndrome de Scott, ne retrouvant pas de lien entre l'expression d'ABCA1 et le phénotype canin du syndrome de Scott (Brooks et al., 2008). Une étude réalisée sur les plaquettes de patients atteints de maladie de Tangier suggère également qu'ABCA1 ne serait pas nécessaire à l'exposition des PS (Nofer et al., 2004). Nous étudierons cet aspect dans les plaquettes de souris déficientes en ABCA1 dans le chapitre résultats.

## **VII. ABCA1 et signalisation**

ABCA1 est régulée par le taux d'AMPc à un niveau transcriptionnel (Oram et al., 2000). Il semble que la voie AMPc/PKA joue également un rôle essentiel dans la phosphorylation du transporteur ABCA1 (See et al., 2002). La phosphorylation de ABCA1 sur une sérine en position 2054 serait indispensable à la liaison ApoA-I / ABCA1 et donc à l'efflux de cholestérol.

Si l'interaction ABCA1/ApoA-I est essentielle à l'efflux cellulaire de cholestérol, le rôle du transporteur ABCA1 comme protéine de signalisation est moins bien décrit.

Cependant, l'ApoA-I est capable d'activer des protéines G de la famille Rho (Cdc42, Rac 1 et Rho) et induit la polymérisation d'actine dans les cellules fibroblastiques (Nofer et al., 2003). L'activation de Cdc42 et Rac1 serait importante pour l'efflux de cholestérol. Selon le même auteur, ABCA1 jouerait le rôle d'un véritable récepteur à l'Apo-AI, dont la présence est nécessaire à l'activation des protéines G de la famille Rho (Nofer et al., 2006).

Une autre molécule activée par l'interaction ApoA-I / ABCA1 est la tyrosine kinase JAK2 (Tang et al., 2006). L'interaction ApoA-I/ ABCA1 aboutit en effet à l'autophosphorylation de JAK2, générant une forme active de la tyrosine kinase capable de phosphoryler ses cibles. L'inhibition de JAK2 n'a pas d'effet sur l'activité de transporteur de ABCA1 mais réduit l'interaction ApoA-I/ ABCA1 indispensable à un efflux de lipide efficace. Par ailleurs, l'activation de JAK2 contribue au rôle inhibiteur de ABCA1 sur la synthèse de molécules proinflammatoires comme le TNF, l'IL1, l'IL6 (Tang et al., 2009). Cette activité pourrait expliquer, à côté de ses effets plasmatiques (modification de la composition lipidique du plasma), un effet protecteur autonome dans l'athérosclérose.

Les mécanismes moléculaires permettant à ABCA1 de transmettre un signal d'activation à JAK2 et aux GTPases de la famille Rho restent inconnus mais une interaction directe entre ABCA1 et Cdc42 a été rapportée (Nofer et al., 2006).

## **Chapitre 3 : La plaquette en pathologie humaine**

Les maladies cardiovasculaires constituent une des premières causes de décès dans le monde, représentant près de 30% de la mortalité dans les pays industrialisés (Kung et al., 2008). Toutefois, la mortalité cardiovasculaire a diminué de façon constante depuis 50 ans. L'apparition de nouvelles armes pharmacologiques, le développement de la cardiologie interventionnelle et de l'angioplastie coronaire comme celui de la chirurgie cardiaque et la chirurgie de pontage ne sont pas étrangers à l'amélioration spectaculaire de l'espérance de vie. Néanmoins, l'angioplastie coronaire, consistant en l'implantation d'endoprothèses coronaires, a généré une nouvelle pathologie : la thrombose de stent, qui a failli coûter la vie à la technique avant l'arrivée du concept de double antiagrégation associant aspirine et thienopyridine.

Si les plaquettes sont des acteurs clefs de l'hémostase physiologique, elles participent également à la formation pathologique du thrombus au cours des diverses manifestations de la pathologie athérotrombotique (syndromes coronariens aigus, accident vasculaire cérébral ischémique, ischémie aigue de membre inférieur). A côté de leur rôle évident dans l'hémostase, les plaquettes participent à la croissance des plaques d'athérome.

### **I. Plaquette et athérotrombose**

L'athérotrombose associe une lésion d'athérosclérose à une réaction thrombotique où de nombreuses cellules sont impliquées et en particulier les plaquettes (Ross, 1999). La gravité de l'athérosclérose coronaire est surtout liée au risque d'accident aigu (angor instable ou infarctus du myocarde) en rapport avec l'initiation du processus thrombotique à la surface d'une plaque rompue.

#### ***A. Rôle des plaquettes dans l'athérogénèse et dans l'inflammation***

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique de la paroi des vaisseaux largement influencée par les cellules circulantes dont les plaquettes. L'athérosclérose se développe particulièrement au niveau des artères de gros et moyen calibre (aorte, artères carotides, artères coronaires, artères des membres inférieurs) sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux. Si les monocytes semblent jouer un rôle important dans



l'initiation et la progression des lésions d'athérosclérose, des travaux récents soulignent le rôle des plaquettes dans les premières étapes du développement de la plaque d'athérosclérose et l'entretien du processus inflammatoire (Ross, 1999, Huo and Ley, 2004, Weber, 2005, Nieswandt et al., 2005). Une des premières étapes du développement d'une plaque d'athérome est représentée par l'activation de l'endothélium source d'interactions plaquette-endothélium (Massberg et al., 2002). Ces interactions plaquettes-endothélium, y compris sur un endothélium apparemment intact et en dehors de toute rupture de plaque, ont été démontrées *in vitro* et *in vivo* (Gawaz, 2003, Gawaz, 2006, Gawaz et al., 2000, Gawaz et al., 2005, Massberg et al., 2003). Lorsque les plaquettes adhèrent aux cellules endothéliales, les cellules endothéliales sont activées. Les cellules endothéliales expriment de nombreuses molécules d'interaction à leur surface comme ICAM-1, VCAM-1, la E-selectine ou la P-sélectine et sécrètent des chémokines comme MCP-1 et l'interleukine 8 favorisant la réaction inflammatoire à l'origine du développement d'une plaque d'athérome (Gawaz et al., 2000). Les plaquettes sont également capables d'interagir avec les monocytes. Les interactions plaquette-monocytes passent par une reconnaissance P-Sélectine plaquettaire /PSGL-1 exprimé sur le monocyte, entraînant une activation des monocytes, dont le rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose est bien connu (Manka et al., 2004).

## ***B. La plaquette comme cible antithrombotique***

Le rôle majeur des plaquettes dans la phase initiale de la formation d'un thrombus après rupture de plaque d'athérome en a fait la cible idéale des médicaments antithrombotiques utilisés en prévention secondaire d'un événement athérothrombotique.

### **1. Médicaments antithrombotiques d'aujourd'hui**

#### **a. Aspirine**

Synthétisée en 1897 et largement utilisée depuis plus de 100 ans, elle a été initialement employée uniquement pour ses propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (Levesque and Lafont, 2000). Ses propriétés antiagrégantes plaquettaires, initialement considérées comme un effet indésirable, sont aujourd'hui utilisées dans la prévention primaire et surtout secondaire des complications athérothrombotiques des maladies cardiovasculaires.

Son mécanisme d'action a n'été mis à jour que dans les années 70 (Vane, 1971, Smith and Willis, 1971). Son action antiagrégante est en rapport avec sa capacité d'inhiber la

production de TXA2 par les plaquettes via l'inhibition de la COX-1 plaquettaire, qui est irréversible en raison de l'absence de possibilité d'une synthèse de novo de cyclo-oxygénase (COX). L'aspirine exerce son effet inhibiteur par l'acétylation d'un résidu sérine en position 529 de la COX-1. La COX-1 est l'enzyme aboutissant à la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Elle possède deux sites catalytiques : le premier a une activité cyclo-oxygénase, qui transforme l'arachidonate en prostaglandine G (PGG) ; le second a une activité peroxydase, qui transforme la PGG en prostaglandine H (PGH), précurseur pour la synthèse des prostaglandines et du thromboxane. La prostaglandine H est ensuite transformée par des isomérases spécifiques en prostaglandine E2, D2, F2A, I2 (prostacycline) et en TXA2 (Bjorkman, 1998). Dans les plaquettes, la synthèse est orientée vers le TXA2 sous l'effet de la thromboxane synthase alors que dans les cellules endothéliales, elle est orientée vers la prostacycline.

#### **b. Inhibiteurs du récepteur P2Y12**

Les effets indésirables de l'aspirine, en particulier les hémorragies digestives, ont conduit l'industrie pharmaceutique à rechercher de nouvelles molécules antiagrégantes. Le succès clinique des inhibiteurs du récepteur P2Y12 a confirmé le rôle majeur de l'ADP dans l'agrégation plaquettaire. Le premier inhibiteur du P2Y12 commercialisé est la ticlopidine, molécule découverte en 1972 et introduite sur le marché en 1978 (Savi and Herbert, 2005). Malgré des effets bénéfiques démontrés dans les suites d'un accident vasculaire cérébral ou d'un infarctus du myocarde, son utilisation s'est rapidement vue limitée par la survenue de thrombopénie et surtout de neutropénie de mécanisme immuno-allergique (Carlson and Maesner, 1994, Hass et al., 1989, Janzon et al., 1990). Néanmoins, son succès initial dans la prévention des événements ischémiques a permis le développement du clopidogrel.

#### ***Clopidogrel***

Le clopidogrel est un inhibiteur sélectif et irréversible du récepteur P2Y12 à l'ADP. Chez l'homme, le clopidogrel est métabolisé dans sa forme active par le cytochrome hépatique P450 (CYP 3A4).

Au cours de l'angioplastie, l'inhibition de l'activation plaquettaire sous bithérapie (clopidogrel–aspirine) permet une réduction marquée des événements cardiovasculaires (Steinhuyl et al., 2001). L'association thienopyridine–aspirine a, ces dernières années, permis le développement de l'angioplastie coronaire percutanée en diminuant de manière importante le risque de thrombose de stent. Néanmoins, en dépit de l'usage croissant d'une bithérapie

antiplaquettaire, la thrombose aiguë ou subaiguë de stent demeure une complication dramatique touchant près de 1 % des patients (Holmes et al., 2010).

Plusieurs équipes ont démontré dans une proportion élevée de patients de cardiologie interventionnelle, la persistance sous clopidogrel d'une agrégation plaquettaire intense à l'ADP, témoin d'une variabilité marquée de la réponse individuelle au clopidogrel (Muller et al., 2003). Cette variabilité importante pourrait s'apparenter, chez certains patients, à une véritable « résistance » biologique au traitement. De multiples travaux suggèrent un lien entre la « non-réponse » biologique au traitement et la survenue de récurrences thrombotiques (Matetzky et al., 2004, Cuisset et al., 2006, Wenaweser and Hess, 2005). Dans ce contexte, l'optimisation du traitement antithrombotique constitue un enjeu majeur chez les patients identifiés comme « non-répondeurs ».

L'origine de cette variabilité interindividuelle de la réponse au clopidogrel est liée au métabolisme de la molécule. En effet, le clopidogrel est une prodrogue dénuée d'action. L'action antiplaquettaire du clopidogrel est médiée par un métabolite actif possédant un groupement thiol, responsable d'un blocage irréversible par liaison covalente du récepteur P2Y<sub>12</sub>. La majeure partie du clopidogrel absorbé (85 %) est inactivée par des estérases. La production du métabolite actif résulte de la transformation du clopidogrel non inactivé par deux étapes d'oxydation successives sous l'action d'enzymes principalement hépatiques : les cytochromes P450 et, en particulier, les isoformes 2C19 et 3A4/5. L'expression et l'activité de ces cytochromes P450 sont très variables selon les individus, et cette variabilité est en grande partie d'origine génétique. Plusieurs variants génétiques ont été identifiés dans le gène CYP2C19, qui conduisent à une perte de fonction de la protéine. Le variant génétique CYP2C19\*2, qui code une enzyme CYP2C19 instable, est ainsi responsable d'une « perte de fonction » intermédiaire chez les hétérozygotes mutés et totale chez les homozygotes mutés. Plusieurs travaux ont clairement établi que la présence du variant génétique CYP2C19\*2 est significativement associée à une diminution de la réponse biologique au clopidogrel (Hulot et al., 2006, Brandt et al., 2007, Mega et al., 2009). Plus récemment, la paraoxonase-1 (PON1), hydrolase synthétisée par le foie, a été identifiée comme une enzyme jouant un rôle central dans la conversion du clopidogrel en métabolite actif (Bouman et al., 2011). La séquence de l'enzyme comporte un polymorphisme relativement commun, caractérisé par la présence d'une glutamine ou d'une arginine en position 192 de la chaîne peptidique. Ce polymorphisme semble étroitement impliqué dans le taux de formation du métabolite actif, la réponse pharmacocinétique au clopidogrel et donc l'efficacité clinique de l'antiagrégant plaquettaire. L'influence du polymorphisme de PON1 sur la réactivité plaquettaire et la survenue

d'événements thrombotiques demeure néanmoins controversé (Cuisset et al., 2011, Simon et al., 2011).

### ***Prasugrel***

Le prasugrel appartient à la famille des thienopyridines comme le clopidogrel (Sugidachi et al., 2000). Par rapport au clopidogrel, on lui attribue une inhibition plaquettaire plus rapide et plus puissante. Son effet est par ailleurs moins soumis à une moindre variabilité interindividuelle (Jakubowski et al., 2007). Tout comme le clopidogrel, il s'agit d'une prodrogue dont la transformation en sa forme active passe par un métabolisme hépatique. Cette molécule dispose d'une autorisation de mise sur le marché dans les suites d'un syndrome coronarien aigu.

### ***Ticagrelor***

Le ticagrelor est une nouvelle classe biochimique d'inhibiteur du P2Y<sub>12</sub> appartenant à la famille des cyclopentyl-triazolo-pyrimidines (CPTP). Son action ne nécessite pas d'étapes de transformation enzymatique. Il s'agit d'un inhibiteur réversible du récepteur P2Y<sub>12</sub>. Son essai de phase III (étude PLATO) devrait lui permettre une autorisation de mise sur le marché en France dans le courant de l'année 2012 (Wallentin et al., 2009).

### ***Elinogrel***

L'elinogrel est le dernier inhibiteur du P2Y<sub>12</sub> en voie de développement utilisable par voie orale et intraveineuse. Il exerce une inhibition compétitive et donc réversible sur le récepteur P2Y<sub>12</sub>. Les essais de phase III sont actuellement en cours.

### **c. Anti-GP IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ )**

Après la découverte des glycoprotéines plaquettaires et l'étude de la fonction d' $\alpha_{IIb}\beta_3$  grâce à un anticorps neutralisant, l'idée originale a été de prouver l'efficacité de ce réactif de laboratoire dans des modèles de thrombose, puis de l'utiliser chez l'homme sous la forme de l'abciximab (Coller, 1997). Les industriels ont alors reproduit l'activité de cet anticorps par d'autres molécules, comme l'eptifibatide et le tirofiban.

Beaucoup d'industriels se sont lancés dans le développement de molécules anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$  actives par voie orale. Or, pour être antithrombotique, il faut inhiber la totalité des intégrines  $\alpha_{IIb}\beta_3$  et reproduire alors, volontairement, un état proche de la thrombasthénie de Glanzmann dont le risque et la gravité des accidents hémorragiques associés sont connus. Ce risque, acceptable à la phase initiale d'un syndrome coronaire aigu, est inacceptable pour un traitement chronique. Les développeurs ont utilisé une dose réduite, croyant limiter le risque

hémorragique. Le résultat a été une absence d'efficacité antithrombotique et même un risque thrombotique augmenté (Holmes et al., 2000). Cette erreur conceptuelle a donc conduit à un échec de développement. Actuellement, ces molécules sont exclusivement utilisées par voie parentérale lors de la phase aiguë des syndromes coronariens aigus (Batchelor et al., 2002).

## **2. Les nouvelles cibles antithrombotiques**

### **a. La voie du TXA2**

L'inhibition de la synthèse du TXA2 semble intéressante, le succès clinique de l'aspirine ayant démontré l'intérêt du blocage de la production de TXA2. Cibler la synthèse du TXA2 permettrait en outre d'éliminer une partie des effets indésirables de l'aspirine liée à l'inhibition de la COX-1 dans l'estomac. Un grand nombre d'inhibiteurs de la thromboxane synthase ont été développés (dazoxiben, isbogrel, ozagrel) mais ces molécules se sont révélées décevantes dans leur utilisation clinique en pathologie cardiovasculaire (Randall et al., 1981, Hattori et al., 1991, Terashita et al., 1995). Une des explications évoquées à cette inefficacité passe par l'accumulation de PGH2 (le substrat de la thromboxane synthase) dans les plaquettes et sa capacité à activer les récepteurs au TXA2 (Hamberg et al., 1974, Kinsella et al., 1997). Ces données ont orienté les recherches vers des inhibiteurs du récepteur TP au TXA2. Le ridogrel a été le premier inhibiteur du récepteur au TXA2. Son effet s'est révélé décevant en pratique clinique (1994). De multiples molécules ont été développées sans preuve clinique à ce jour pour leur supériorité par rapport à l'aspirine (Bousser et al., 2011).

### **b. La voie de la thrombine**

La thrombine est un agoniste majeur dans les thromboses pathologiques mais pourrait être moins essentielle à une hémostase physiologique. Ces données sont suggérées par les observations effectuées chez des souris déficientes en récepteur PAR-4 (principal récepteur à la thrombine chez la souris) qui présentent une croissance plus lente des thrombi dans la lumière d'un vaisseau lésé mais ne présentent pas d'hémorragies spontanées et ont un temps de saignement normal (Vandendries et al., 2007). Des antagonistes spécifiques du récepteur plaquettaire à la thrombine PAR-1 (Vorapaxar SCH 530348 et Atopaxar) sont en cours de phase III (2009).

### **c. La voie du collagène**

Les récepteurs au collagène sont également des cibles antithrombotiques en cours de validation. OM2 est un anticorps anti-GPVI qui a démontré ex vivo chez l'animal des capacités à inhiber l'agrégation plaquettaire induite par le collagène (Matsumoto et al., 2006).

***C. Plaquettes et développement de thérapies ciblant les acteurs clefs de la signalisation***

Cet aspect, lié notamment au développement exponentiel d'inhibiteurs ciblés en thérapie anticancéreuse, est traité dans les revues générales ci-dessous.

## **Targeted drug therapy: the platelet side.**

Thibault Lhermusier, Jérôme Van Rothem, Cédric Garcia, Marie-Pierre Gratacap,  
Bernard Payrastre

Platelets. 2011;22(7):479-84.

REVIEW

## Targeted drug therapy: The platelet side

T. LHERMUSIER<sup>1</sup>, J. VAN ROTHEM<sup>1</sup>, C. GARCIA<sup>2</sup>, M.P. GRATACAP<sup>1</sup>, & B. PAYRASTRE<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U1048 and Université Toulouse III Paul Sabatier, I2MC, 31024 Toulouse Cedex 03, France and <sup>2</sup>CHU de Toulouse, Laboratoire d'Hématologie, 31059 Toulouse Cedex 03, France

### Abstract

Targeted therapy is certainly considered the future of cancer treatment. Several new molecules targeting critical intracellular signaling actors, particularly kinases, are arriving in clinics and many other are under development. However, proteins targeted by these drugs are common to many cell types and are particularly implicated in the highly dynamic processes of platelet activation. Therefore, the effects of targeted drugs, including kinase inhibitors, on platelet activation have to be considered in clinical practice. Moreover, their analysis also represents an opportunity to increase our knowledge in platelet biology and physiology and to develop novel antiplatelet strategies. In this review we briefly describe the major platelet signaling pathways that may be affected by these new drugs and discuss some clinical implications of their use.

**Keywords:** Targeted drugs, tyrosine kinase inhibitors, platelet activation, haemostasis

### Introduction

In the last decades, the increment in our understanding of molecular biology of cancer cells, led to the identification of a number of potential drug targets [1]. The critical role of protein kinases, lipid kinases, and other signaling enzymes in major cell functions such as proliferation, apoptosis, cell migration, and invasion has been clearly established. As expected, these molecular actors have been chosen *a priori* by pharmaceutical industries as potential targets in oncology and also in immunotherapy. Unlike the drugs used in conventional chemotherapy, these agents are designed to specifically interfere with key molecular events involved in the malignant phenotype and are thus expected to have fewer side effects. In addition, these targeted drugs provide unique opportunities for combination therapies with other conventional agents that have non-overlapping toxicities. Currently, more than 500 targeted molecules are in the pipelines of pharmaceutical industry and around 100 of them are under pre-clinical or clinical steps development [2].

Some of these drugs are highly specific of an intracellular signaling actor while others have several targets. This is, for instance, the case of kinase

inhibitors that can target a receptor or an oncogenic kinase with high specificity but can also target several other kinases. Indeed, due to similarities of the catalytic pockets of kinases, small molecules acting as ATP-competitors often target, more or less efficiently, different kinases.

It is important to consider that many of these drug targets can regulate different pathways shared by various cell types, especially platelets. Indeed, platelets are regulated by highly dynamic and sophisticated signaling mechanisms involving many different protein and lipid kinases, GTPases and other actors that are often deregulated in cancer cells or implicated in immune cell activation.

We would like to exemplify three types of drugs here which are already in clinics or just entering clinical trials and which may affect platelet functions.

About 10 years ago, imatinib, the first targeted tyrosine kinase inhibitor used in clinic, has revolutionized the treatment of chronic myeloid leukemia (CML). Imatinib is an ATP competitor of the oncogenic tyrosine kinase BCR-ABL which is responsible for malignant transformation in CML. Imatinib targets ABL, cKit, and PDGF-receptor. To face some problems of imatinib resistance due to



mutation in the catalytic pocket of BCR-ABL, a second-generation inhibitor has been developed [3]. This drug, called dasatinib, very efficiently targets BCR-ABL but also platelet-derived growth factor (PDGF) receptor, c-Kit (as imatinib), and in addition, Src-kinases. As a consequence, dasatinib has additional side effects compared to imatinib and, as developed below, affects platelet activation.

A second example of targeted drug that may impact on platelets concerns the inhibitors of the spleen tyrosine kinase (Syk and its homologue ZAP70), a cytoplasmic tyrosine kinase that associates with different receptors on the surface of immune cells (including B cells, mast cells, macrophages, and neutrophils). Immune cells receptors, including Fc receptors and B-cell receptors, are important for both allergic and antibody-mediated autoimmune diseases. The engagement of these receptors by their ligands activates Syk leading to different cellular responses such as cytokine production (in T cells and monocytes) and phagocytosis (in macrophages). Thus, inhibiting Syk has been proposed to represent a mean to treat disorders such as rheumatoid arthritis, allergic conditions, systemic lupus erythematosus, and B cell related hematological malignancies [4, 5]. Fostamatinib (R788), a prodrug of the Syk inhibitor R406, or the PRT-060318 compound, are potential candidates for treatment of rheumatoid arthritis. Fostamatinib, the most developed oral Syk inhibitor, is undergoing phase III clinical trial program.

The last example concerns phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) which are widely expressed lipid kinases phosphorylating phosphoinositides at the D-3 position of the inositol ring. These enzymes function as signal transducers downstream of cell-surface receptors and their lipid products are considered as second messengers having central roles in the regulation of cell growth, differentiation, motility, proliferation, and survival [6]. PI3Ks are important effectors of many oncogenes and oncogenic gain of function mutations of the PI3K $\alpha$  isoform have been described in different human cancers [7]. The PI3K-Akt survival pathway is considered as a cornerstone in the development of cell malignancy and is actively studied in order to develop new anticancer drugs. Two well known pan-PI3Ks inhibitors are the fungal metabolite wortmannin and LY294002 [8]. These two inhibitors, which however affect many kinases of the PI3K superfamily, have been important research tools to elucidate the role of PI3Ks in the biology of human cancer cells. Moreover, the development of mouse models expressing inactive PI3K isoforms has shown a certain degree of specialization of the different isoforms. This observation has motivated the development of isoform specific PI3K inhibitors and some

of them are entering in clinic as anticancer drugs [9, 10]. As developed below, recent studies have demonstrated the important role of PI3Ks in platelet activation suggesting that potential side effects of these drugs may be expected.

### Major platelet signaling pathway potentially affected by new targeted drugs

Platelet activation and formation of a platelet thrombus is a highly regulated physiological process triggered by a vessel-wall injury [11]. Platelet activation is initiated by interaction with immobilized molecules of the matrix (collagen, Von Willebrand factor) and amplified by soluble agonists (thrombin, ADP, thromboxane A<sub>2</sub>; [12–14]). Many receptors for adhesive ligands and soluble agonists involved in the haemostatic and prothrombotic function of platelets have been identified. Many signaling mechanisms initiated by these receptors have been characterized in these last few years and share several similarities with the mechanisms described in nucleated cells stimulated by growth factors or hormones. Some important pathways of platelet activation are briefly summarized below.

#### *ITAM-mediated platelet activation*

Primary adhesion of platelets to the subendothelial extracellular matrix (ECM) involves the platelet Von Willebrand factor receptor GPIb/V/IX and the collagen receptors  $\alpha 2\beta 1$  and GpVI. GPVI uses an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) to signal [15, 16]. Indeed, GPVI is in complex with the Fc receptor (FcR) $\gamma$ -chain which contains an ITAM. Upon GPVI triggering a signal transduction mechanism is initiated through the tyrosine phosphorylation of the FcR $\gamma$ -chain ITAM. Src-family kinases (SFKs) have been shown to phosphorylate conserved tyrosine residues within the ITAM of the FcR $\gamma$ -chain providing a docking site for the tyrosine kinase Syk. Upon interaction with the phosphorylated ITAM, Syk becomes activated and phosphorylates a number of proteins including the important docking protein, linker for activation of T cells (LAT) [17]. This leads to the formation of a signalosome that is composed of a series of adapters and effector proteins. At the core of this signalosome are the adapter LAT and the two cytosolic adapters SLP-76 and Gads. These proteins recruit a number of signaling molecules to regulate a major effector enzyme in the GPVI signaling cascade, phospholipase C (PLC) $\gamma 2$  [15, 18, 19]. Activation of PLC $\gamma 2$ , which requires tyrosine phosphorylations (likely *via* the Bruton's tyrosine-kinase BTK and SFKs) and PI3K $\beta$  activation, leads to intracellular calcium mobilization and protein kinase C (PKC)

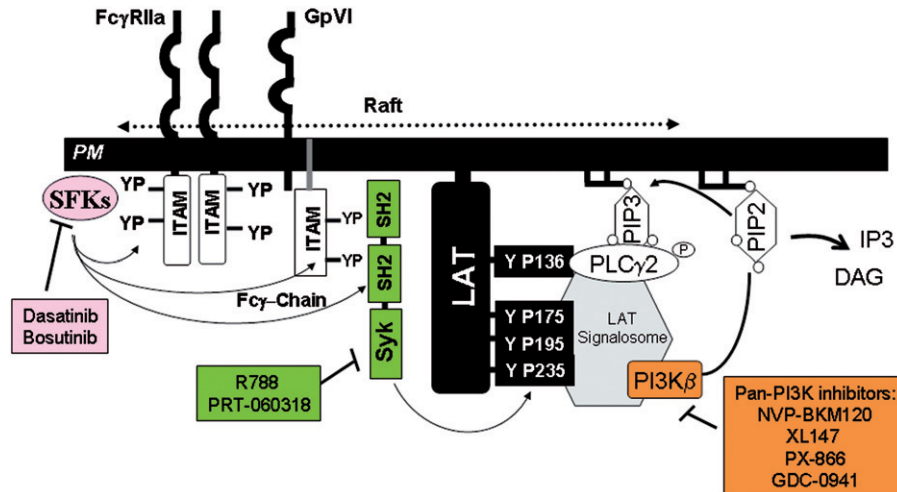


Figure 1. ITAM-signaling, tyrosine kinases, platelet activation and targeted drugs. Cross-linking of GPVI and Fc $\gamma$ RIIA induces tyrosine phosphorylation of ITAMs by the Src kinases (Fyn and Lyn) leading to the recruitment and activation of the tyrosine kinase Syk. This initiates a Syk-dependant signaling cascade contributing to the formation of a LAT signalosome and in turn to the activation of PLC $\gamma$ 2 through mechanisms involving tyrosine phosphorylations and PI3K. The targeted drugs already in clinic or under clinical trials affecting key enzymes of these pathways are indicated.

activation, which are two mandatory events for platelet secretion and aggregation (Figure 1).

#### Integrins-mediated platelet activation

Integrins such as the collagen receptor  $\alpha 2\beta 1$  or the fibrinogen receptor  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  are critical players in platelet adhesion and aggregation. During  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  integrin outside-in signaling, tyrosine kinases including SFKs and the focal adhesion kinase (FAK) as well as serine/threonine-kinases like ILK are activated and play an important role in the formation of a focal adhesion complex containing actin cytoskeleton regulatory and structural proteins as well as many signaling enzymes such as PI3K and lipid and protein phosphatases [15, 18].

In the same way, under flow condition, the binding of Von Willebrand factor to the glycoprotein GpIb $\alpha$ , induces the activation of SFKs and other signaling enzymes such as PI3K.

#### G Protein-Coupled Receptors (GPCRs)-mediated platelet activation

During the formation of a platelet plug, a variety of locally accumulating soluble agonists are produced or released and play an important role in the amplification of platelet activation leading to the recruitment of additional platelets from the circulation. These agonists include ADP, thromboxane A2 (TxA2), which are secreted or released from activated platelets and thrombin, which is produced on the surface of activated platelets *via* the coagulation cascade. All these soluble agonists activate heterotrimeric G-proteins coupled receptors (GPCRs) [20].

Platelet activation *via* GPCRs involves three major G protein-mediated signaling pathways that are initiated by the activation of G $_q$ , G $_{13}$  or G $_i$ . ADP acts through two GPCRs, P2Y1 coupled to G $_q$  and P2Y12 coupled to G $_i$ -type G proteins.

Thrombin, a potent platelet activator, acts through protease-activated receptors (PARs), particularly PAR1 which couples to G $_q$  and G $_{12/13}$  and to a lesser extent to G $_i$  and PAR4 which couples to G $_q$  and G $_{12/13}$  in human platelets. Like ADP, TxA2 acts as a positive feedback mediator secreted during platelet activation, its receptor couples to G $_q$  and G $_{12/13}$ .

The G $_q$  family of heterotrimeric G-proteins activate the  $\beta$  isoforms of PLC [20] resulting in the formation of inositol trisphosphate and diacylglycerol leading to an elevation of cytoplasmic calcium concentration and PKC activation, respectively. Calcium mobilization and PKC activation are critical in platelet activation. Indeed, this pathway regulate a number of molecular mechanisms involving calcium-calmodulin-dependant kinases, MAP-kinases, GTPases, phospholipase A2, and several other actors required for cytoskeleton remodeling, secretion, and integrin activation.

G $_{13}$ , a member of the G $_{12/13}$  family, is known to regulate several signaling pathways of which the Rho/Rho kinase pathway is the best characterized. G $_i$  is an important inhibitor of adenyl cyclase which in turns decreases cAMP level [21]. In addition, G $_i$  type G proteins are a major source for  $\beta\gamma$  complexes, which are released upon G-protein activation and can regulate a variety of channels and enzymes including some PI3K isoforms.

### The PI 3-kinase pathway

PI3Ks are divided into three classes (I, II, and III) based on their structure, mode of regulation, and substrate specificity [22, 23]. Platelets contain all PI3K isoforms. Class I PI3Ks ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\gamma$ ) isoforms are responsible for agonist-induced production of the second messenger phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate that is mandatory for Akt activation and contribute to the activation of several effectors including PLC $\gamma$ 2, BTK, and Rap1B. Thus, the PI3K pathway impacts on the regulation of a broad range of functional platelet responses. Class Ia isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$ ) are classically regulated by tyrosine kinases, whereas the class Ib isoform ( $\gamma$ ) is activated by G-protein-coupled receptors [24]. PI3K $\delta$  has a minor role in platelets [25], PI3K $\gamma$  is important downstream of the ADP receptor P2Y<sub>12</sub> [26]. PI3K $\beta$  appears to play a critical role in platelet activation particularly in high shear stress conditions and may be a potentially interesting antithrombotic drug target [27, 28]. The function of PI3K $\alpha$  is still unclear but it may play a cooperative and non-redundant role with PI3K $\beta$  [29, 30].

### Platelet side effect of clinically available kinase inhibitors: the example of dasatinib

As mentioned above, dasatinib (BMS-354825) is a second-generation tyrosine kinase inhibitor, more potent than imatinib on BCR-ABL, which has demonstrated high efficiency in patients with imatinib-resistant CML. In addition to the tyrosine kinases inhibited by imatinib (cKIT and PDGF-receptor), dasatinib also affects SFKs. Six members of the SFKs have been shown to be expressed in human platelets (c-Src, Lyn, Fgr, Fyn, Lck, and Yes; [31]). Dasatinib has a weak effect on platelet activation in response to thrombin but, as expected from the critical role of SFKs in ITAM signaling, it efficiently inhibits GPVI-mediated platelet activation *in vitro* [32]. It is also a potent inhibitor of platelet signaling initiated by collagen and Fc $\gamma$ RIIA cross-linking (Figure 1). Moreover, dasatinib increases the tail bleeding time of mice in a dose-dependant and reversible manner. Using whole blood we could show that dasatinib treatment rapidly decreases the volume of thrombi formed over a matrix of collagen under arterial flow conditions. This effect was also observed using whole blood from patients treated with dasatinib. These effects are rapidly reversible after interruption of the treatment. In conclusion, dasatinib is affecting platelet functions *in vitro*, *ex-vivo* and *in vivo*, which has potential implications in clinic and may explain bleeding events observed in patients under treatment. Considering the rapid and reversible effect of dasatinib on platelets functions *in vivo*,

invasive surgical gesture should be avoided during the first hours following dasatinib intake.

### Tyrosine kinase inhibitors as anti-platelet drugs?

An interesting question concerns the potential use of SFKs inhibitors as antiplatelet drugs. The data obtained with dasatinib indicate that non-selective SFKs inhibitors would increase the bleeding risk and our unpublished data suggest a relatively modest anti-thrombotic effect of this compound in a mouse model of carotid injury (M-P Gratacap, personal observation). In this context, it appears important to define which SFK member is involved downstream of the different platelet receptors and the degree of redundancy of these kinases. These information are required to estimate whether or not selective inhibitors of the different members of the family have a chance to reduce the thrombosis risk while sparing primary haemostasis.

In general, the potential interest of tyrosine kinases inhibitors as antithrombotic drugs remains to be established. However, these compounds may be relevant therapeutic options in the treatment of certain immune complexes-mediated platelet activation and thrombotic complications. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is a drug-induced immune thrombocytopenia where antibodies reactive with heparin-PF4 complexes lead to Fc $\gamma$ RIIA-mediated platelet activation. Interestingly, both dasatinib [32] and Syk inhibitors [33] efficiently prevent platelet activation induced by Fc $\gamma$ RIIA-clustering, induced by HIT antibodies from patients. The beneficial effect of Syk inhibition on HIT has been demonstrated *in vivo*, in a mouse model of the pathology [32]. Importantly, targeting Syk does not significantly increase the bleeding risk in mouse [4, 34]. Moreover, the rapid reversibility of the effect of these inhibitors and the fact that they may also inhibit monocyte activation, an important aspect of the pathology, suggest that Syk inhibition is an attractive therapeutic strategy in the treatment of HIT.

### Conclusion

Next to the expected therapeutic effect, platelet side effects of emerging targeted drugs used in oncology can occur and have to be considered. Drug developers as well as clinicians may have to take into account this potential impact on haemostasis, particularly bleeding disorders. Furthermore, the understanding of the effects of these incoming targeted drugs on platelet signaling and functions is an opportunity to increase our knowledge of the molecular processes of platelet activation.

Current antiplatelet drugs interfere with important steps of their activation, including TxA<sub>2</sub> synthesis, P2Y<sub>12</sub> ADP receptor activation, or  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin engagement. So far, intracellular signaling actors have not been targeted by antiplatelet drug in clinic. Interestingly, some tyrosine kinase inhibitors such as Syk inhibitors may be of interest in the therapeutic strategies to fight against immune complexes-mediated thrombotic complications.

## References

1. Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer: Journal for Clinicians* 2009;59:111–137.
2. Pytel D, Sliwinski T, Poplawski T, Ferriola D, Majsterek I. Tyrosine kinase blockers: New hope for successful cancer therapy. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 2009; 9:66–76.
3. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, et al. Chronic myeloid leukemia: An update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:6041–6051.
4. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, Qu K, Herlaar E, Lau A, Young C, et al. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006;319:998–1008.
5. Riccaboni M, Bianchi I, Petrillo P. Spleen tyrosine kinases: Biology, therapeutic targets and drugs. *Drug Discovery Today* 2010;15:517–530.
6. Vanhaesebroeck B. 2010. Spleen tyrosine kinases: Biology, therapeutic targets and drugs. In: Rommel C, Vanhaesebroeck B, Vogt P. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Heidelberg, Dordrecht, London, New York 2010;1–19.
7. Ihle NT, Powis G. Take your PIK: Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors race through the clinic and toward cancer therapy. *Molecule Cancer Therapeutics* 2009;8:1–9.
8. Arcaro A, Wymann MP. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: The role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochemical Journal* 1993;296 (Pt 2):297–301.
9. Garcia-Echeverria C, Sellers WR. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 2008; 27:5511–5526.
10. Maira SM, Stauffer F, Schnell C, Garcia-Echeverria C. PI3K inhibitors for cancer treatment: Where do we stand? *Biochemical Society Transactions* 2009;37:265–272.
11. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *The New England Journal of Medicine* 2008;359:938–949.
12. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2008;28:403–412.
13. Smyth SS, Woulfe DS, Weitz JI, Gachet C, Conley PB, Goodman SG, Roe MT, Kuliopulos A, Moliterno DJ, French PA, et al. G-protein-coupled receptors as signaling targets for antiplatelet therapy. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2009;29:449–457.
14. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 2007;100:1673–1685.
15. Kasirer-Friede A, Kahn ML, Shattil SJ. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunological Reviews* 2007;218:247–264.
16. Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL, Watson SP. The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *Embo Journal* 1997;16:2333–2341.
17. Watson SP. Collagen receptor signaling in platelets and megakaryocytes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1999;82:365–376.
18. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005;3:1752–1762.
19. Suzuki-Inoue K, Wilde JI, Andrews RK, Auger JM, Siraganian RP, Sekiya F, Rhee SG, Watson SP. Glycoproteins VI and Ib-IX-V stimulate tyrosine phosphorylation of tyrosine kinase Syk and phospholipase Cgamma2 at distinct sites. *Biochemical Journal* 2004;378:1023–1029.
20. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation Research* 2006;99:1293–1304.
21. Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP. Nucleotide receptor signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006;4:2317–2326.
22. Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: A conserved family of signal transducers. *Trends in Biochemical Sciences* 1997;22:267–272.
23. Anderson KE, Jackson SP. Class I phosphoinositide 3-kinases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2003;35:1028–1033.
24. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Experimental Cell Research* 1999;253:239–254.
25. Senis YA, Atkinson BT, Pearce AC, Wonerow P, Auger JM, Okkenhaug K, Pearce W, Vigorito E, Vanhaesebroeck B, Turner M, et al. Role of the p110delta PI 3-kinase in integrin and ITAM receptor signalling in platelets. *Platelets* 2005;16:191–202.
26. Hirsch E, Bosco O, Tropel P, Laffargue M, Calvez R, Altruda F, Wymann M, Montrucchio G. Resistance to thromboembolism in PI3Kgamma-deficient mice. *FASEB Journal* 2001;15:2019–2021.
27. Jackson SP, Schoenwaelder SM, Goncalves I, Nesbitt WS, Yap CL, Wright CE, Kenche V, Anderson KE, Dopheide SM, Yuan Y, et al. PI 3-kinase p110beta: A new target for antithrombotic therapy. *Nature Medicine* 2005;11:507–514.
28. Martin V, Guillermet-Guibert J, Chicanne G, Cabou C, Jandrot-Perrus M, Plantavid M, Vanhaesebroeck B, Payrastre B, Gratacap MP. Deletion of the p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase in platelets reveals its central role in Akt activation and thrombus formation *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 2010;115:2008–2013.
29. Gilio K, Munnix IC, Mangin P, Cosemans JM, Feijge MA, van der Meijden PE, Olieslagers S, Chrzanowska-Wodnicka MB, Lillian R, Schoenwaelder S, et al. Non-redundant roles of phosphoinositide 3-kinase isoforms alpha and beta in glycoprotein VI-induced platelet signaling and thrombus formation. *The Journal of Biological Chemistry* 2009;284:33750–33762.
30. Kim S, Mangin P, Dangelmaier C, Lillian R, Jackson SP, Daniel JL, Kunapuli SP. Role of phosphoinositide 3-kinase beta in glycoprotein VI-mediated Akt activation in platelets. *The Journal of Biological Chemistry* 2009;284:33763–33772.
31. Pestina TI, Stenberg PE, Druker BJ, Steward SA, Hutson NK, Barrie RJ, Jackson CW. Identification of the Src family kinases, Lck and Fgr in platelets. Their tyrosine phosphorylation status and subcellular distribution compared

- with other Src family members. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1997;17:3278–3285.
32. Gratacap MP, Martin V, Valera MC, Allart S, Garcia C, Sie P, Recher C, Payrastra B. The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 2009;114:1884–1892.
  33. Reilly MP, Sinha U, Andre P, Taylor SM, Pak Y, Deguzman FR, Nanda N, Pandey A, Stolla M, Bergmeier W, et al. PRT- 060318, a novel Syk inhibitor, prevents heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis in a transgenic mouse 628 model. *Blood* 2011;117:2241–2246.
  34. Clark EA, Shattil SJ, Ginsberg MH, Bolen J, Brugge JS. Regulation of the protein tyrosine kinase pp72syk by platelet agonists and the integrin alpha IIb beta 3. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269:28859–28864.

**Nouvelles molécules ciblées et modulation des fonctions plaquettaires  
: anticiper, démontrer, gérer, utiliser**

Martine Jandrot-Perrus, Marie-Pierre Gratacap, Thibault Lhermusier, Pierre Sié,  
Bernard Payrastre

Hématologie Volume n° 16, Numéro 5, septembre-octobre 2010

## Nouvelles molécules ciblées et modulation des fonctions plaquettaires : anticiper, démontrer, gérer, utiliser

### New targeted drugs and modulation of platelet functions

Martine Jandrot-Perrus<sup>1,2</sup>  
Marie-Pierre Gratacap<sup>3</sup>  
Thibault Lhermusier<sup>3</sup>  
Pierre Sié<sup>4</sup>  
Bernard Payrastra<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Inserm U698

<sup>2</sup> Laboratoire d'hématologie,  
Hôpital Bichat, Paris  
<martine.jandrot-perrus@inserm.fr>

<sup>3</sup> Inserm U563,  
Centre de physiopathologie  
de Toulouse-Purpan  
et Université Paul-Sabatier,  
Toulouse

<sup>4</sup> Laboratoire d'hématologie,  
CHU de Toulouse, Toulouse  
<bernard.payrastra@inserm.fr>

**Résumé.** Des avancées thérapeutiques importantes ont été réalisées ces dernières années, notamment en cancérologie, avec l'arrivée de molécules ciblant des relais de transmission de signaux intracellulaires, l'activité kinasique de récepteurs spécifiques ou des régulateurs du système de maintenance de l'homéostasie cellulaire [1]. Or, de nombreuses protéines ciblées par ces médicaments sont communes à plusieurs types cellulaires et particulièrement impliquées dans les voies d'activation plaquettaire qui font appel à des mécanismes de signalisation hautement performants et régulés. Ces nouvelles thérapies sont donc susceptibles d'avoir un impact sur l'hémostase, pouvant entraîner des épisodes hémorragiques plus ou moins importants. Il sera pertinent d'anticiper et d'analyser leurs effets potentiels sur l'activation plaquettaire. Ces effets sont parfois incomplètement caractérisés lors des phases de développement des inhibiteurs ciblés, les équipes travaillant dans ce domaine très spécialisé de l'hémostase étant relativement peu impliquées. Ces éléments sont importants à prendre en considération d'un point de vue clinique mais leur analyse apporte également des données précieuses dans le domaine de la physiologie plaquettaire et de la pharmacologie antiplaquettaire. Il sera donc important de caractériser les mécanismes moléculaires et les réponses plaquettaires affectés par certaines des molécules ciblées qui vont arriver en force sur le marché dans un proche avenir. Outre l'évaluation des conséquences cliniques, ces études devraient contribuer à accroître nos connaissances dans le domaine de l'hémostase. Cette revue a pour objectif de résumer le contexte actuel dans le domaine et de décrire les principales voies d'activation plaquettaires susceptibles d'être ciblées par de nouveaux médicaments d'ores et déjà utilisés ou en développement.

**Mots clés :** molécules ciblées, inhibiteurs de tyrosine kinase, activation plaquettaire, hémostase

**Abstract.** Important therapeutic advances have been made these recent years, particularly in oncology, with the development of molecules targeting critical intracellular signalling actors, the kinase activity of specific receptors or regulators of cellular homeostasis. However, several proteins targeted by these drugs are common to many cell types and are particularly implicated in platelet activation processes which involve highly efficient and regulated signalling mechanisms. These new therapies are likely to impact on haemostasis, potentially leading to more or less important bleeding episodes. It is therefore relevant to anticipate and analyze their potential effects on platelet activation processes. These effects are sometimes incompletely characterized during the development of selective inhibitors, as research groups working in this highly specialized field of haemostasis are relatively weakly involved. It is of course important to consider these aspects at a clinical point of view but their analysis also provides valuable information to increment our knowledge in platelet physiology and antiplatelet pharmacology. Thus, it will be important to be able to characterize the platelets molecular mechanisms and

functional responses affected by some of the numerous targeted drugs which will be available in the near future. This review aims to summarize the current situation in the field and to describe the major platelet signalling pathways which may be targeted by these new drugs.

**Key words:** *targeted drugs, tyrosine kinase inhibitors, platelet activation, haemostasis*

## Le développement exponentiel des inhibiteurs ciblés

Les travaux de recherche fondamentale ont mis en avant le rôle clé des protéines kinases, des lipides kinases ou des GTPases dans la régulation de grandes fonctions cellulaires (prolifération, survie et apoptose, angiogenèse, migration cellulaire et invasion) et leur dérégulation dans de nombreuses pathologies, notamment cancéreuses. Ces acteurs des cascades de signalisation amplifient et distribuent l'information. Il est donc logique que l'industrie pharmaceutique ait, a priori, choisi ces relais de signalisation comme cibles d'intérêt pour le développement de nouvelles molécules anticancéreuses. Les traitements ciblés représentent un espoir en oncologie pour remplacer les thérapies actuelles fondées essentiellement sur des chimiothérapies dont l'effet toxique est souvent difficile à maîtriser. Les petites molécules inhibitrices des protéines kinases présentent l'avantage que leur efficacité ne se limite pas à des cibles membranaires et qu'elles peuvent inhiber plusieurs kinases de la même voie en raison des homologues structuraux de leur domaine catalytique. Ainsi, un grand nombre d'inhibiteurs de kinase ont été et continuent à être développés. Certaines de ces molécules sont d'ores et déjà des médicaments, plusieurs autres le deviendront dans un avenir proche. Le succès du Glivec® ou STI-571 (imatinib mésilate), premier inhibiteur de kinase à avoir été mis sur le marché en 2001 (inhibiteur de la tyrosine kinase oncogénique BCR-ABL), a révolutionné le traitement de la leucémie myéloïde chronique [2]. Depuis, d'autres inhibiteurs de kinases ont été mis sur le marché [3], environ 600 sont actuellement étudiés, essentiellement par l'industrie pharmaceutique, et près d'une centaine sont dans une phase avancée. Ce sont donc des dizaines de nouvelles molécules ciblées qui deviendront disponibles dans la décennie à venir (malgré la question de leur coût, de leur prise en charge et donc de l'équité d'accès des patients à ces thérapies). D'autres relais de signalisation ou acteurs de grandes fonctions cellulaires (protéasome par exemple) sont également activement ciblés.

## Les grandes voies de signalisation plaquettaire

La formation d'un thrombus plaquettaire est la réponse physiologique à une lésion vasculaire. Elle a pour but initial

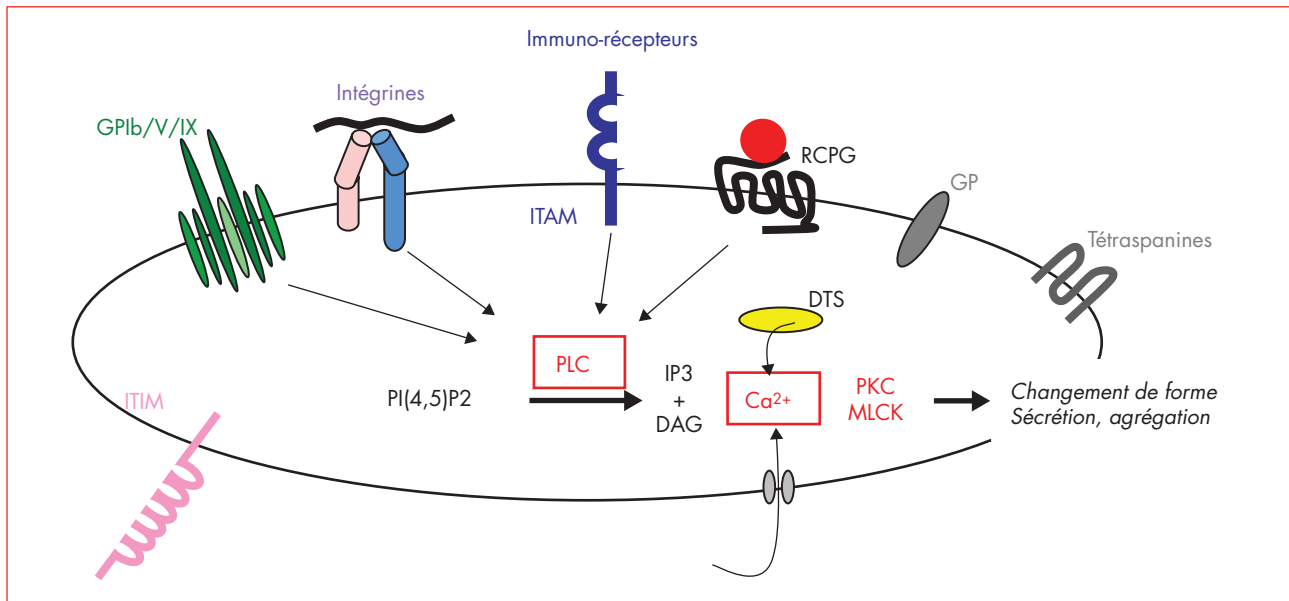
de stopper le saignement et doit donc être rapide et contrôlée dans l'espace. Le caillot est aussi nécessaire à la cicatrisation et doit être stable jusqu'à ce que celle-ci ait pris place. L'importance physiologique de ce processus se traduit par la multiplicité et la complémentarité des voies d'activation qui ont permis, au cours de l'évolution, d'atteindre un système plaquettaire hautement performant [4, 5]. L'activation des plaquettes implique des molécules adhésives de support (collagène, facteur Von Willebrand) et des molécules solubles (thrombine, ADP, thromboxane A2) [6-9]. Certains agonistes sont plutôt impliqués dans l'initiation de l'activation plaquettaire (facteur Von Willebrand, collagène), d'autres dans la propagation (ADP, thromboxane A2) ou les deux (thrombine), enfin certains participent à la stabilisation (ADP, fibrinogène). La participation d'un nombre grandissant de récepteurs à la croissance et à la stabilisation de l'agrégat plaquettaire est démontrée grâce aux études de souris génétiquement modifiées (Gas6 [10], Eph/EphR [11], JAM-1 [12], CLEC-2 [13], TLT-1 [14]). De façon schématique, on peut considérer que la plupart des agonistes plaquettaires solubles utilisent des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RPCG) [6] alors que les molécules adhésives mobilisent des intégrines ou des glycoprotéines de surface couplées à l'activation de tyrosine kinases et à la phosphorylation de motifs particuliers dont les ITAM (*immuno-tyrosine based activation motifs*) (figures 1, 2) [15]. Ces récepteurs plaquettaires ne sont pas tous responsables d'une activation : des mécanismes d'inhibition plaquettaire mettent en jeu des récepteurs RCPG (PGI<sub>2</sub>) et la voie du NO qui activent des adénylate et guanylate cyclases [16, 17] ou des immunorécepteurs à motif ITIM (*immuno-tyrosine based inhibition motifs*) (PECAM ou CD31, G6Bb et CAECAM) [18-20] mobilisant spécifiquement certaines phosphatases.

Ainsi, une réponse plaquettaire optimale est conditionnée par de nombreux acteurs de signalisation rendant ces cellules vulnérables aux molécules ciblant les relais de transmission des signaux (protéine ou lipide kinases notamment). Un certain nombre de voies de signalisation majeures conduisant à l'activation des plaquettes sont aujourd'hui identifiées.

## Agonistes solubles, GPCR et activation plaquettaire

Parmi les récepteurs plaquettaires aux agonistes solubles activateurs les plus importants, on compte les récepteurs de





**Figure 1.** Des récepteurs membranaires spécifiques à l'activation de la voie calcique. L'activation plaquettaire générée par des agonistes solubles ou des molécules d'adhésion, via divers type de récepteurs, entraîne l'activation de phospholipases C (PLC) et la génération d'inositol (1,4,5) trisphosphate (IP<sub>3</sub>). La liaison de l'IP<sub>3</sub> à ses récepteurs présents sur le système tubulaire dense (DTS) initie la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> à partir des stocks intracellulaire. L'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire est amplifiée par un influx de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire et va permettre, entre autres, l'activation de protéines dépendantes du Ca<sup>2+</sup> comme la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) permettant la génération de forces contractiles nécessaires au changement de forme des plaquettes ou à la rétraction du clou de fibrine. RCPG : récepteur couplé aux protéines G ; GP : glycoprotéine ; ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* ; ITIM : *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* ; PLC : phospholipase C ; PI(4,5)P<sub>2</sub> : phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate ; IP<sub>3</sub> : inositol triphosphate ; DAG : diacylglycérol ; PKC : protéine kinase C ; MLCK : *myosin light chain kinase*.

la thrombine (PAR1 et PAR4), de l'ADP (P2Y1 et P2Y12) ou du thromboxane A<sub>2</sub> (TP $\alpha$ ). Le *tableau 1* résume les voies de signalisation activées par ces récepteurs. Les récepteurs PAR1 et 4 mais également TP $\alpha$  et P2Y1 sont couplés aux protéines G hétérotrimériques G<sub>q</sub> qui activent la phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) et, en aval, les PKCs et la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> (*figures 1, 2*) [6, 8]. Ces deux systèmes de transmission des signaux sont critiques dans la plaquette et mettent en jeu de nombreux acteurs tels que les kinases Ca<sup>2+</sup>-calmoduline dépendantes (CAM kinases), les MAP-kinases ou des modulateurs de l'activation des intégrines et de la dynamique du cytosquelette et de la sécrétion.

PAR1, PAR4 et TP $\alpha$  sont aussi couplés à G<sub>12/13</sub> (*figure 2*), protéines G hétérotrimériques capables d'entraîner l'activation de la GTPase RhoA responsable notamment de l'activation de la kinase ROCK, un régulateur de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine [21]. Le récepteur de l'ADP P2Y12 est fortement couplé à la protéine G<sub>i</sub> (*figure 2*) conduisant à l'inhibition de l'adénylate cyclase et l'abaissement de l'AMPc connu pour agir comme un frein de l'activation plaquettaire [22]. Le récepteur de la thrombine PAR1 est également couplé à G<sub>i</sub>. La plupart de ces récepteurs sont aussi capables d'activer la voie des phosphoinositide 3-kinases (PI3K), certaines tyrosines kinases et des GTPases mais les isoformes et les mécanismes moléculaires impliqués sont encore incomplètement caractérisés.

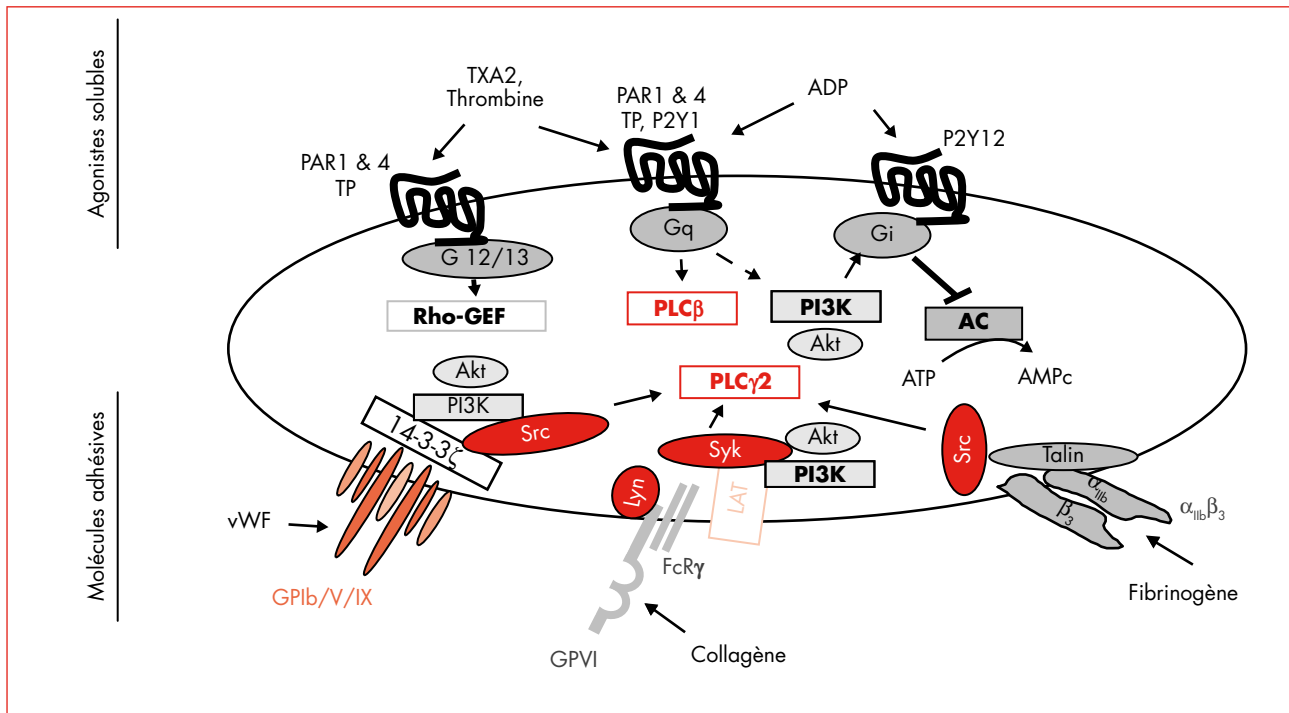
## Récepteurs d'adhésion, ITAM, tyrosines kinases et activation plaquettaire

Plusieurs classes de récepteurs sont impliquées dans l'adhésion et l'activation des plaquettes par des protéines adhésives et des complexes immuns :

- famille des immuno-récepteurs à motif ITAM comme la glycoprotéine VI (GPVI), récepteur du collagène, et le récepteur de basse affinité du fragment Fc des IgG, Fc $\gamma$ R1IA (ou CD32) [23, 24] (*figure 3*) ;
- famille des intégrines comme l'intégrine  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, récepteur du collagène, et l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, récepteur du fibrinogène [25] (*figure 4*) ;
- famille des protéines riches en leucine (GPIIb $\alpha$ , récepteur du facteur Von Willebrand) [26] (*figure 1*).

Des tétraspanines et d'autres glycoprotéines peuvent également contribuer à l'activation plaquettaire.

Les voies des tyrosines kinases non récepteur sont particulièrement sollicitées en aval de GPVI et de Fc $\gamma$ R1IA (*figure 3*). Dans les deux cas, le regroupement des récepteurs par leur ligand induit l'activation de kinases de la famille des Src (Fyn, Lyn notamment) permettant la phosphorylation des deux tyrosines du motif ITAM de la chaîne gamma associée à GPVI ou de Fc $\gamma$ R1IA. La tyrosine kinase Syk est alors recrutée par ses domaines SH2 sur les ITAM phosphorylés et va phosphoryler à son tour les protéines adaptatrices comme



**Figure 2.** Quelques grandes voies de signalisation en aval des principaux récepteurs plaquettaire.

Lors d'une rupture de la paroi vasculaire, les plaquettes sont capturées puis immobilisées au niveau du sous endothélium *via* essentiellement la liaison de la GPIb/IX/V au facteur de von Willebrand et de la GPVI au collagène fibrillaire. Les voies de signalisation mises en jeu par ces récepteurs sont fortement dépendantes de tyrosine kinase de la famille Src (pp60, Lyn) et de Syk. Des mécanismes entraînant la sécrétion et la production locale d'agonistes solubles dont l'ADP, le thromboxane A2 ou la thrombine, vont être mis en jeu. La liaison de ces agonistes sur leurs récepteurs respectifs (RCPG) va amplifier l'activation plaquettaire via notamment la mise en jeu de protéines hétérotrimériques G. G $\alpha_q$  est couplée à l'activation de PLC $\beta$  et de la GTPase Rac. Le récepteur de P2Y12 de l'ADP, couplé à G $\alpha_i$ , permet l'inhibition de l'AC et l'activation de PI3K alors que l'activation des protéines G $\alpha_{12/13}$  entraîne l'activation de la GTPase Rho. L'ensemble de ces mécanismes va conduire à l'activation plaquettaire et à l'arrêt du saignement (adapté d'après [9]).

ADP : adénosine diphosphate ; TxA2 : thromboxane A2 ; RCPG : récepteur couplé aux protéines G ; GP : glycoprotéine ; PI3K : PI 3-kinase ; AC : adénylyl cyclase.

LAT ou SLP76. Un complexe de signalisation va se constituer impliquant diverses protéines et conduisant à l'activation de la PLC $\gamma$ 2 [15, 27].

Les tyrosines kinases, en particulier Src et Syk, mais également FAK (*focal adhesion kinase*), sont impliquées dans la signalisation « *outside-in* » des intégrines induite par la liaison du collagène à  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 ou du fibrinogène à  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (*figure 4*). La liaison du facteur de Von Willebrand à GPIb $\alpha$  en condition de flux induit également l'activation de Src [28]. Il faut noter que les récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase sont relativement peu exprimés dans les plaquettes, mais le récepteur de l'IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) pourrait par exemple contribuer à leur activation. De façon générale, les tyrosines kinases, qu'elles soient de type récepteur ou non récepteur, sont souvent dérégulées dans les cellules tumorales et représentent des cibles pharmacologiques de choix [3]. Des inhibiteurs des kinases de la famille Src sont déjà disponibles en thérapie anticancéreuse, d'autres visant à cibler plus sélectivement les divers membres de la famille sont en développement. La kinase FAK est également ciblée dans le but d'inhiber le développement de métastases et

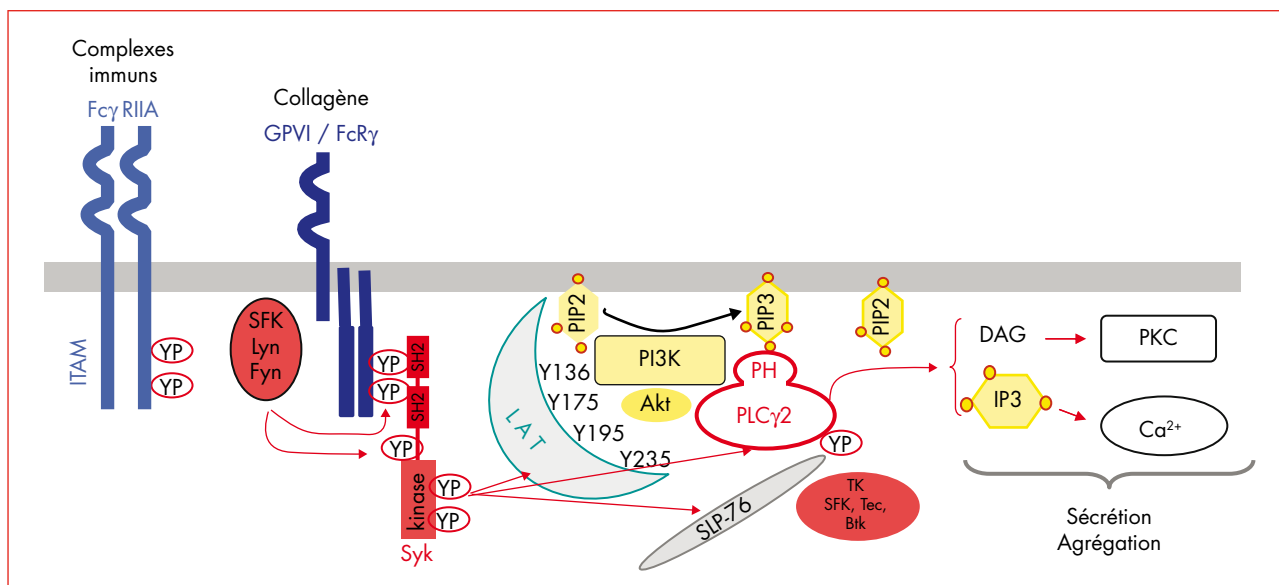
d'augmenter la sensibilité des cellules tumorales à la chimiothérapie. Le développement d'inhibiteurs de la kinase Syk suscite actuellement beaucoup d'intérêt dans un contexte de traitement de pathologies immunitaires (arthrite rhumatoïde, asthme, PTI) et anticancéreuses (lymphomes) [29-33]. Le récepteur de l'IGF1 est ciblé par des anticorps neutralisants et des petites molécules inhibitrices de son activité tyrosine kinase dans le but de limiter la tumorigénèse, car ce récepteur est impliqué dans plusieurs cancers (ostéosarcome, côlon, sein) où il joue un rôle dans la mitogénèse, l'établissement et la maintenance d'un phénotype transformé et la protection des cellules contre l'apoptose.

### La voie des phospholipases C (PLC)

L'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PI(4,5)P $_2$ ) par les PLC $\beta$  ou  $\gamma$  génère deux seconds messagers, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG), conduisant respectivement à l'augmentation du Ca $^{2+}$  intracytoplasmique et à l'activation des protéines kinase C (PKC) (*figure 1*). Cette voie de signalisation est indispensable à

**Tableau 1**  
Récepteurs plaquettaire majeurs et voies de signalisation mises en jeu

Agonistes	Récepteurs	Quelques effecteurs majeurs
Thrombine	PAR1	G <sub>q</sub> /G <sub>12-13</sub> → PL Cβ/PI3K/RhoA G <sub>i</sub> → Adénylate cyclase
	PAR4	G <sub>q</sub> /G <sub>12-13</sub> → PLCβ/PI3K/RhoA
Thromboxane A <sub>2</sub>	TPα	G <sub>q</sub> /G <sub>12-13</sub> → PLCβ/PI3K/RhoA
ADP	P2Y12	G <sub>i</sub> → PI3Kγβ Adénylate cyclase
	P2Y1	G <sub>q</sub> → PLCβ
Collagène	GPVI	SFK/Syk/PI3K/PLCγ <sub>2</sub> /Rho GTPases
	α <sub>2</sub> β1	SFK/Syk/PI3K/PLCγ <sub>2</sub>
Facteur Von Willebrand	Gplb-IX-V	SFK
Complexes immuns	FcγRIIIa	SFK/Syk/PI3K/PLCγ <sub>2</sub>
Fibrinogène	α <sub>IIb</sub> β <sub>3</sub>	SFK/FAK/Syk/PI3K/PLCγ <sub>2</sub>



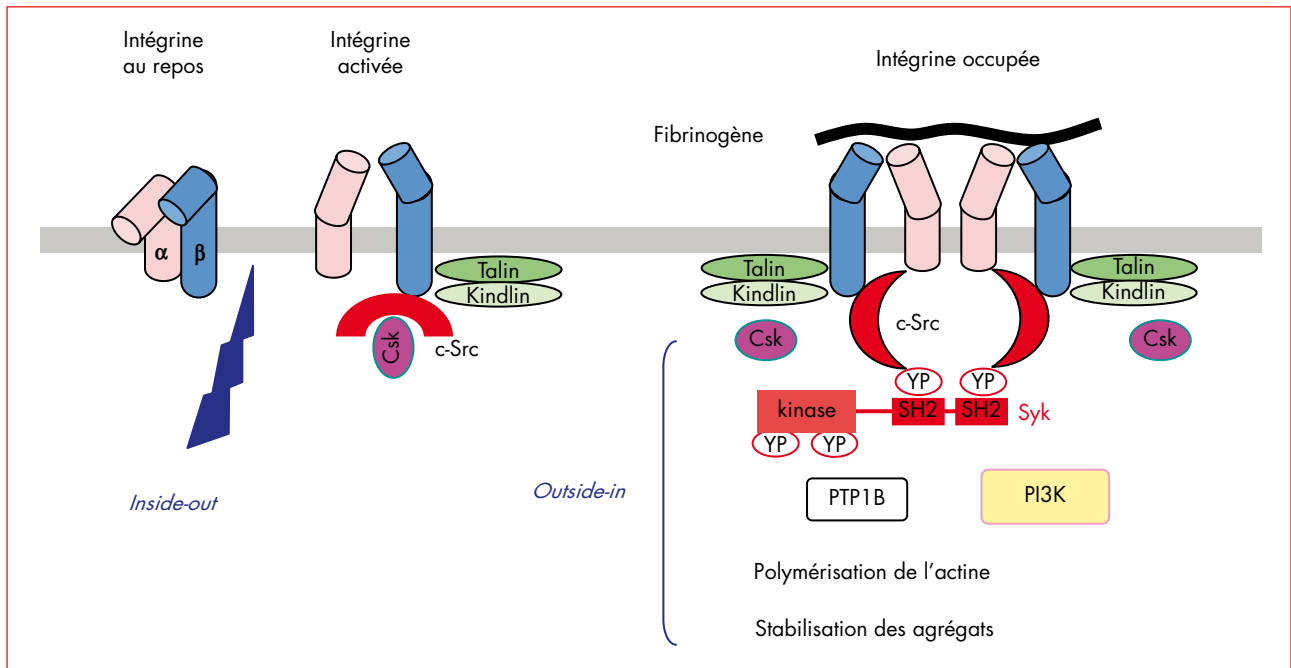
**Figure 3.** Récepteurs à motifs ITAM, tyrosines kinases et activation plaquettaire.

Le regroupement de GPVI et de FcγRIIA par leur ligand (collagène et IgG respectivement) induit l'activation de kinases de la famille des Src (Fyn, Lyn notamment) permettant la phosphorylation des deux tyrosines du motif ITAM de la chaîne gamma associée à GPVI ou de FcγRIIA. Ceci permet la liaison de la tyrosine kinase Syk par ses domaines SH2 et son activation qui va conduire à la phosphorylation de protéines adaptatrices comme LAT ou SLP76 induisant l'assemblage d'un complexe de signalisation au sein duquel PLCγ2 sera phosphorylée par Syk et d'autres tyrosines kinases de la famille Src (Lyn, Fyn, Yes notamment) ou Tec (Tec et Btk). La phosphorylation de la PLCγ2 ne suffit pas à elle seule pour entraîner la génération des seconds messagers IP3 et DAG. En effet, la PLCγ2 doit également être relocalisée et stabilisée à la membrane plasmique, prêt de son substrat le PI(4,5)P<sub>2</sub>. Cette relocalisation nécessite un des produits de la PI3K, le PIP<sub>3</sub> (adapté d'après [27]).

SFK : Src family kinases ; LAT : linker of adaptation of T cell ; SLP76 : Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa ; TK : tyrosines kinases ; Y : tyrosine ; PY : phospho-tyrosine ; PH : pleckstrin homology domain ; SH : Src homology domain.

l'activation plaquettaire. Selon le récepteur membranaire impliqué, différentes isoformes de PLC sont mises en jeu et activées par des mécanismes moléculaires spécifiques. Les récepteurs couplés à G<sub>q</sub> activent les PLCβ [6], alors que

les récepteurs mobilisant les tyrosines kinases activent la PLCγ2 par l'intermédiaire de la phosphorylation de molécules adaptatrices et de la PLCγ2 elle-même [figure 2] [34]. La mobilisation du Ca<sup>2+</sup> est une étape clé de l'activation plaquettaire.



**Figure 4.** Signalisation dépendante de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ .

La signalisation induite par la fixation d'un agoniste sur son récepteur (*figure 2*) va entraîner un changement conformationnel de l'intégrine (signalisation dite « *inside-out* ») et lui permettre de lier le fibrinogène qui va créer des ponts entre les plaquettes permettant le phénomène d'agrégation. Lorsque l'intégrine est engagée, elle va entraîner une signalisation dite « *outside-in* » qui va mettre en jeu différents acteurs, notamment les tyrosines kinases Src et Syk, mais également FAK (*focal adhesion kinase*). La signalisation « *outside-in* » sera importante pour la croissance du thrombus et sa stabilité (adapté d'après [15]).

Cet ion est un cofacteur indispensable à l'activation de nombreuses enzymes régulant ainsi les réponses plaquettaires, de la sécrétion à l'activation de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  et au remodelage du cytosquelette [35]. L'activation des PKC est également critique car ces kinases phosphorylent et régulent de nombreux acteurs de la dynamique plaquettaire impliqués dans la plupart des réponses plaquettaires [36]. Des inhibiteurs de certaines isoformes de PKC sont en développement dans le traitement de diverses pathologies [36].

### La voie des PI3K

Les PI3K sont des lipides kinases produisant un second messager important, le phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate ( $\text{PIP}_3$ ) qui n'est pas substrat des PLC mais qui interagit directement avec des domaines protéiques spécifiques permettant le recrutement membranaire et l'activation de protéines de signalisation telles que Akt ou la  $\text{PLC}\gamma_2$ . L'activation des PI3K est commune à plusieurs voies de signalisation plaquettaire dans la mesure où, comme pour les PLC, il existe plusieurs isoformes de PI3K régulées par les RCPG ou les récepteurs activant les tyrosines kinases (*figure 2*) [37, 38]. Les PI3K ont à la fois un rôle précoce et un rôle tardif dans les processus d'activation plaquettaire. En aval de  $\text{GPVI}$  ou de  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ , la PI3K recrutée par LAT permet notamment l'ancrage membranaire de  $\text{PLC}\gamma_2$  et sa pleine activité [39],

ainsi que l'activation d'Akt et de  $\text{Rap1b}$  (*figure 3*). Des PI3K de classe I (isoformes  $\gamma$  et  $\beta$ ) sont activées en aval de  $\text{P2Y}_{12}$  et contribuent aux signaux de propagation de l'activation plaquettaire via l'ADP. Plus tardivement, en aval de la liaison du fibrinogène à l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , le  $\text{PIP}_3$  et son produit de dégradation par la phosphatase SHIP1, le  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ , jouent un rôle dans la croissance et la stabilisation de l'agrégation plaquettaire [40, 41].

La voie PI3K/Akt est l'une des voies les plus étudiées dans le domaine de la transformation et de la survie cellulaire. Des mutations gain de fonction de la PI3K de Classe IA (isoforme  $\alpha$ ) et des mutations perte de fonction de la  $\text{PIP}_3$  3-phosphatase PTEN sont retrouvées dans plusieurs cancers et la plupart des oncogènes activent les PI3K. L'activation de cette voie, conduit à des événements aberrants et précoces en cancérogenèse dont l'interruption a des effets antiprolifératifs, proapoptotiques et antiangiogènes. De nombreuses molécules ciblant les diverses isoformes de PI3K de Classe I ( $\alpha, \beta, \delta, \gamma$ ) et Akt sont en développement et commencent à arriver en clinique avec pour objectif de diminuer la survie des cellules cancéreuses [1].

### La voie des Rho GTPases

De nombreux récepteurs, qu'ils soient RCPG, couplés à des tyrosines kinases ou intégrines, stimulent les GTPases de la

famille Rho (RhoA, Rac et Cdc42). Elles jouent un rôle essentiel dans le remodelage intense du cytosquelette d'actine qui sous-tend les changements morphologiques des plaquettes lors des diverses phases de leur activation (émission de filopodes, étalement, agrégation, rétraction du caillot de fibrine) [42]. La régulation de ces GTPases est complexe et encore assez mal connue dans les plaquettes, elle fait appel à des facteurs d'échanges du GDP pour le GTP (GEFs), des inhibiteurs de l'échange du GDP (GDI) et des activateurs de l'activité GTPasique intrinsèque (GAPs). RhoA et Rac mobilisent des effecteurs spécifiques, notamment les sérines/thréonines kinases ROCK et PAK, respectivement. RhoA joue un rôle important dans le contrôle du système contractile d'actomyosine via ROCK qui régule négativement la phosphatase de la chaîne légère de la myosine. Rac joue un rôle important pour la formation de lamellipodes et l'étalement des plaquettes en adhésion et Cdc42 contribue à la formation des filopodes.

Les voies de signalisation régulées par les GTPases Rho commencent à être ciblées notamment dans le cadre de thérapies visant à bloquer l'invasion des cellules tumorales et la formation de métastases [43]. La kinase ROCK est la cible d'inhibiteurs sélectifs à l'étude dans diverses pathologies, notamment en cancérologie mais également dans le domaine cardiovasculaire grâce à leurs effets sur la tonicité vasculaire [44].

### **Anticiper, démontrer, gérer l'effet des molécules ciblant les voies de signalisation sur l'activité plaquettaire et en tirer des informations pour la pharmacologie antiplaquettaire**

L'avancée des connaissances dans le domaine des voies de signalisation régulant les différentes phases de l'activation plaquettaire, dans diverses conditions, *in vitro* et de plus en plus *in vivo*, permet aujourd'hui de pouvoir anticiper l'effet potentiel d'inhibiteurs ciblés. Leurs effets sur l'hémostase sont souvent insuffisamment évalués *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* (tableau 2). Seuls les médicaments induisant des thrombopénies importantes (l'exemple récent des BH3 mimétiques susceptibles d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses et entraînant aussi une mort et une élimination intense des plaquettes les plus âgées [45] est particulièrement intéressant) ou des hémorragies sévères sont écartés. Cependant, de nombreuses molécules peuvent interférer de manière subtile sur la physiologie plaquettaire. Ces molécules pourraient également perturber l'hémostase en affectant certaines fonctions des cellules endothéliales.

L'exemple du dasatinib (BMS-354825 ou Sprycel®) [46, 47], l'un des premiers inhibiteurs de tyrosines kinases, y compris celles de la famille Src, à arriver en clinique, illustre bien la situation. En effet, le dasatinib, capable d'inhiber certaines formes mutées de l'oncogène BCR-ABL résistantes à l'imatinib et ciblant également d'autres tyrosines kinases (PDGFR, c-Kit et les kinases de la famille Src) induit une inhibition des

réponses plaquettaires au collagène *ex vivo* et affecte l'hémostase *in vivo* de façon réversible [48, 49]. En agissant sur les voies de signalisations activées en aval de GPVI et/ou des intégrines, de telles molécules réduisent de façon rapidement réversible (suivant la pharmacocinétique de la molécule) la formation des agrégats plaquettaires et les fonctions hémostatiques des plaquettes. Outre les informations cliniques non négligeables, conduisant à la recommandation d'éviter tout geste invasif pendant les 10 premières heures suivant la prise du dasatinib, ces études permettent d'évaluer l'intérêt pharmacologique de cibler telle ou telle voie de signalisation en thérapie antiplaquettaire. Peser le risque hémorragique et le bénéfice anti-thrombotique consécutif à l'inhibition d'une voie en particulier apporte des informations très intéressantes. En effet, si l'on peut s'attendre à ce que les inhibiteurs des tyrosine kinases de la famille Src, mais également ceux ciblant Syk, aient un retentissement sur l'activation des plaquettes par le collagène (en aval de GPVI), sur la croissance et la stabilisation de l'agrégat (en aval de  $\alpha IIb\beta 3$ ) et accroissent le risque de saignement, ces inhibiteurs pourraient aussi être utiles dans le traitement de pathologies mettant en jeu l'activation plaquettaire par les complexes antigène/anticorps, en aval de Fc $\gamma$ RIIA. Ces kinases constituent des cibles pour le développement de molécules visant à réduire les cytopénies immunologiques en agissant sur les macrophages activés via les récepteurs Fc $\gamma$ Rs qui mobilisent les kinases Src et Syk [33]. De tels médicaments à l'effet réversible en quelques heures pourraient améliorer la prise en charge des patients atteints de thrombocytopénies induites par l'héparine en réduisant l'activité destructrice des macrophages et les thromboses en agissant sur les plaquettes [50].

Les inhibiteurs de l'activité kinase de Syk pourraient représenter une nouvelle classe de médicaments antithrombotiques [51], en raison de leur pouvoir inhibiteur sur la formation d'agrégats plaquettaires.

La réduction des fonctions plaquettaires par les molécules ciblées pourrait avoir un effet bénéfique en oncologie en réduisant la dissémination métastatique, processus que les plaquettes sont supposées favoriser en adhérant aux cellules tumorales dans le flux sanguin, en les protégeant des défenses immunitaires et en contribuant à leur extravasation. Cependant, cet effet non prouvé pourrait se payer par un risque hémorragique accru. Il est donc important de caractériser précisément l'effet de telles molécules sur l'hémostase afin d'établir des protocoles dans lesquels le risque hémorragique serait négligeable au regard des effets thérapeutiques. Certaines molécules agissant sur la signalisation *outside-in* de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  pourraient également induire une instabilité des thrombi entraînant la formation d'embols plaquettaires pouvant contribuer à des accidents ischémiques plus ou moins sévères.

Enfin, il n'est pas exclu que certaines molécules ciblées puissent contribuer à activer les plaquettes en affectant les mécanismes de régulation négative. L'utilisation d'anticorps thérapeutiques peut également induire l'activation des

**Tableau 2**  
Tests fonctionnels d'exploration des fonctions plaquettaire *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*

<b>Numération/ taille plaquettaire</b>	Mesure le nombre de plaquettes et le volume plaquettaire	
<b>In vitro</b>	Méthode agrégométrique en turbinométrie	Agrégation plaquettaire induite en PRP, en sang total ou sur plaquettes isolées par addition de différents inducteurs de l'agrégation plaquettaire (ADP, Collagène, Acide Arachidonique, Thrombine, Ristocétine, Thromboxane A2)
	Cytométrie de flux	Utilisation d'anticorps spécifiques d'antigènes de surfaces marqueurs de l'activation plaquettaire (P-sélectine, complexe GpIIb/IIIa activé ou fibrinogène fixé à ce complexe) ou de phosphoprotéines intraplaquettaires de signalisation (P-VASP, P-Akt) après stimulation des plaquettes <i>in vitro</i> par différents agonistes physiologiques
	PFA-100	Mime l'analyse du temps de saignement <i>in vitro</i> = temps d'obstruction d'une membrane biologiquement active capable de déclencher l'adhésion puis l'agrégation plaquettaire
	VerifyNow	Permet de mesurer la réponse plaquettaire à divers agonistes en termes d'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$
<b>Ex vivo</b>	Formation de thrombi en flux	Sang total perfusé sur une surface coatée avec différentes matrices, à un flux choisi. Grâce à de l'imagerie ultrarapide (caméra couplée à un microscope), l'adhésion et la formation des thrombi plaquettaire sont visualisés en temps réels. La surface occupée ainsi que le volume de ces thrombi sont ensuite évalués grâce à des logiciels adaptés.
<b>In vivo (chez la souris)</b>	Temps de saignement à la queue Modèle de thromboembolisme généralisé	Test qui prend en compte toutes les composantes de l'hémostase primaire : plaquettaire (quantitative et qualitative), plasmatique et vasculaire. Mesure de la résistance d'une souris à un processus thromboembolique aiguë induit par injection d'un mélange collagène/adrénaline au niveau de la veine jugulaire. Des agrégats plaquettaires se forment dans la circulation aboutissant à l'obstruction de la microcirculation pulmonaire. L'étude histologique de la vascularisation pulmonaire permet d'évaluer la taille et la composition des thrombi formés.
	Modèle de thrombose artérielle induite au laser (microscopie intravitale)	Un laser pulsé est focalisé au travers de l'objectif du microscope et permet de réaliser une lésion ponctuelle du vaisseau observé (artérioles mésentériques ou du muscle crémaster). L'évolution de la thrombose est suivie en temps réel par microscopie intravitale. La taille des thrombi et leur cinétique de formation/déformation sont évaluées.
	Modèle de thrombose artérielle induite au FeCl <sub>3</sub>	Le FeCl <sub>3</sub> est appliqué à l'aide d'un papier filtre. Les artères ciblées peuvent être de diamètre important (artères carotides, fémorales). L'évolution de la thrombose est suivie en temps réel par microscopie intravitale ou grâce à une sonde Doppler qui permet d'évaluer les variations de débit sanguin et de déterminer le temps d'occlusion (total ou partiel). Après sacrifice de l'animal, le thrombus formé peut aussi être recueilli, son poids pouvant être mesuré et sa structure histologique examinée.

plaquettes (notamment *via* Fc $\gamma$ RIIA) et des complications thrombotiques comme cela a été montré dans le cas du bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF utilisé dans les thérapies antiangiogéniques [50].

## Conclusion

L'arrivée de molécules ciblant les voies de signalisation en thérapeutique oblige à une certaine vigilance dans le domaine de l'hémostase, où les plaquettes, de grandes spécialistes des mécanismes de signalisation, sont en première ligne. Les enseignements cliniques et les informations concernant la physiologie et pharmacologie plaquettaire que l'on

peut tirer dans ce domaine justifient d'organiser un réseau national afin d'accroître notre réactivité à l'analyse de l'effet de ces nouveaux médicaments. ■

**Remerciements.** Cette revue a été rédigée dans le cadre de la commission pharmacologie – thème « traitements en oncologie » – du Groupe français d'étude sur l'hémostase et la thrombose (GEHT) et de la Société française d'hématologie.

**Conflit d'intérêts :** aucun.

## RÉFÉRENCES

1. Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2009 ; 59 : 111-37.
2. Baccarani M, Cortes J, Pane F, *et al*. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 6041-51.

3. Pytel D, Sliwinski T, Poplawski T, *et al.* Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2009 ; 9 : 66-76.
4. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 938-49.
5. Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2009 ; 7 (Suppl. 1) : 17-20.
6. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006 8 ; 99 : 1293-304.
7. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 2007 22 ; 100 : 1673-85.
8. Smyth SS, Woulfe DS, Weitz JI, *et al.* G-protein-coupled receptors as signaling targets for antiplatelet therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 ; 29 : 449-57.
9. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 ; 28 : 403-12.
10. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, *et al.* Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest* 2005 ; 115 : 237-46.
11. Prevost N, Woulfe DS, Jiang H, *et al.* Eph kinases and ephrins support thrombus growth and stability by regulating integrin outside-in signaling in platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 9820-5.
12. Sobocka MB, Sobocki T, Babinska A, *et al.* Signaling pathways of the F11 receptor (F11R; a.k.a. JAM-1, JAM-A) in human platelets : F11R dimerization, phosphorylation and complex formation with the integrin GPIIb3a. *J Recept Signal Transduct Res* 2004 ; 24 : 85-105.
13. May F, Hagedorn I, Pleines I, *et al.* CLEC-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. *Blood* 2009 ; 114 : 3464-72.
14. Washington AV, Gibot S, Acevedo I, *et al.* TREM-like transcript-1 protects against inflammation-associated hemorrhage by facilitating platelet aggregation in mice and humans. *J Clin Invest* 2009 ; 119 : 1489-501.
15. Kasirer-Friede A, Kahn ML, Shattil SJ. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunol Rev* 2007 ; 218 : 247-64.
16. Gleim S, Kasza Z, Martin K, *et al.* Prostacyclin receptor/thromboxane receptor interactions and cellular responses in human atherosclerotic disease. *Curr Atheroscler Rep* 2009 ; 11 : 227-35.
17. Roberts W, Riba R, Homer-Vanniasinkam S, *et al.* Nitric oxide specifically inhibits integrin-mediated platelet adhesion and spreading on collagen. *J Thromb Haemost* 2008 ; 6 : 2175-85.
18. Falati S, Patil S, Gross PL, *et al.* Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation *in vivo*. *Blood* 2006 15 ; 107 : 535-41.
19. Mori J, Pearce AC, Spalton JC, *et al.* G6b-B inhibits constitutive and agonist-induced signaling by glycoprotein VI and CLEC-2. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 35419-27.
20. Wong C, Liu Y, Yip J, *et al.* CEACAM1 negatively regulates platelet-collagen interactions and thrombus growth *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 2009 ; 113 : 1818-28.
21. Ono A, Westein E, Hsiao S, *et al.* Identification of a fibrin-independent platelet contractile mechanism regulating primary hemostasis and thrombus growth. *Blood* 2008 ; 112 : 90-9.
22. Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, *et al.* Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 2317-26.
23. Gratacap MP, Payrastré B, Viala C, *et al.* Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C-gamma2 is an early key event in Fc-gammaRIIA-mediated activation of human platelets. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 24314-21.
24. Poole A, Gibbins JM, Turner M, *et al.* The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *Embo J* 1997 ; 16 : 2333-41.
25. Shattil SJ. The beta3 integrin cytoplasmic tail: protein scaffold and control freak. *J Thromb Haemost* 2009 ; 7 (Suppl. 1) : 210-3.
26. Bergmeier W, Chauhan AK, Wagner DD. Glycoprotein Iba-1 and von Willebrand factor in primary platelet adhesion and thrombus formation: lessons from mutant mice. *Thromb Haemost* 2008 ; 99 : 264-70.
27. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, *et al.* GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2005 ; 3 : 1752-62.
28. Wu Y, Asazuma N, Satoh K, *et al.* Interaction between von Willebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinase in human platelets: role of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 2003 ; 101 : 3469-76.
29. Buchner M, Fuchs S, Prinz G, *et al.* Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 5424-32.
30. Denyer J, Patel V. Syk kinase inhibitors in allergic diseases. *Drug News Perspect* 2009 ; 22 : 146-50.
31. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, *et al.* Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009 ; 115 : 2578-85.
32. Hueber AJ, McInnes IB. Is spleen tyrosine kinase inhibition an effective therapy for patients with RA? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2009 ; 5 : 130-1.
33. Podolanczuk A, Lazarus AH, Crow AR, *et al.* Of mice and men: an open-label pilot study for treatment of immune thrombocytopenic purpura by an inhibitor of Syk. *Blood* 2009 ; 113 : 3154-60.
34. Suzuki-Inoue K, Wilde JI, Andrews RK, *et al.* Glycoproteins VI and Ib-IX-V stimulate tyrosine phosphorylation of tyrosine kinase Syk and phospholipase C-gamma2 at distinct sites. *Biochem J* 2004 ; 378 : 1023-9.
35. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2009 ; 7 : 1057-66.
36. Harper MT, Poole A. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2009 ; 8 : 454-62.
37. Cosemans JM, Munnix IC, Wetzker R, *et al.* Continuous signaling via PI3K isoforms beta and gamma is required for platelet ADP receptor function in dynamic thrombus stabilization. *Blood* 2006 ; 108 : 3045-52.
38. Gilio K, Munnix IC, Mangin P, *et al.* Non-redundant roles of phosphoinositide 3-kinase isoforms alpha and beta in glycoprotein VI-induced platelet signaling and thrombus formation. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 33750-62.
39. Ragab A, Severin S, Gratacap MP, *et al.* Roles of the C-terminal tyrosine residues of LAT in GPVI-induced platelet activation: insights into the mechanism of PLC gamma 2 activation. *Blood* 2007 ; 110 : 2466-74.
40. Canobbio I, Stefanini L, Cipolla L, *et al.* Genetic evidence for a predominant role of PI3Kbeta catalytic activity in ITAM- and integrin-mediated signaling in platelets. *Blood* 2009 ; 114 : 2193-6.
41. Martin V, Guillermet-Guibert J, Chicanne G, *et al.* Deletion of the p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase in platelets reveals its central role in Akt activation and thrombus formation *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 2010 ; 115 : 2008-13.

42. Calaminus SD, Thomas S, McCarty OJ, *et al.* Identification of a novel, actin-rich structure, the actin nodule, in the early stages of platelet spreading. *J Thromb Haemost* 2008 ; 6 : 1944-52.
43. Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009 ; 28 : 65-76.
44. Lu Q, Longo FM, Zhou H, *et al.* Signaling through Rho GTPase pathway as viable drug target. *Curr Med Chem* 2009 ; 16 : 1355-65.
45. Qi B, Hardwick JA. Bcl-xL timer sets platelet life span. *Cell* 2007 ; 128 : 1035-6.
46. Cortes J, Rousselot P, Kim DW, *et al.* Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood* 2007 ; 109 : 3207-13.
47. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, *et al.* Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2006 ; 354 : 2531-41.
48. Gratcap MP, Martin V, Valera MC, *et al.* The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 2009 ; 114 : 1884-92.
49. Quintas-Cardama A, Han X, Kantarjian H, *et al.* Tyrosine kinase inhibitor-induced platelet dysfunction in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009 ; 114 : 261-3.
50. Reilly MP, Sinha R, André P, *et al.* PRT060318, a novel Syk inhibitor, prevents heparin-induced thrombocytopenia in a transgenic mouse model. *Blood* 2008 ; 112 : 106.
51. Delaney S, Sinha U, Nanda N, *et al.* Specific pharmacological targeting of the Syk kinase activity in platelets: a novel, safe, anti-thrombotic strategy. *Blood* 2008 ; 112 : 157.



## **II. Plaquette et thrombopénie immunoallergique à l'héparine**

### ***A. Epidémiologie***

La thrombopénie induite par l'héparine (TIH) est une complication du traitement par l'héparine en rapport avec la formation d'anticorps dirigés contre les complexes PF4 – héparine. Il s'agit d'une pathologie rare mais grave dont la fréquence varie de 0,5 % à 5 % selon les séries (Martel et al., 2005, Warkentin et al., 1995, Girolami et al., 2003). Les facteurs qui influencent la survenue d'une TIH se rangent en deux catégories : les facteurs liés à l'administration de l'héparine et les facteurs liés au patient. Les facteurs liés à l'administration de l'héparine sont représentés par le type d'héparine (fréquence des TIH plus importante sous héparine non fractionnée versus héparine de bas poids moléculaire) et la durée du traitement (fréquence accrue avec la durée d'exposition à l'héparine) (Martel et al., 2005). A côté de ses facteurs liés au traitement, il existe des facteurs liés au patient et notamment aux conditions d'utilisation de l'héparine. La fréquence des TIH est plus importante en milieu chirurgical, c'est à dire dans les situations de suite opératoire par rapport à une utilisation en milieu médical (Warkentin et al., 1995). Au sein de la chirurgie, il existe également des disparités. La chirurgie la plus à risque est la chirurgie orthopédique alors que la chirurgie cardiaque, s'il elle est associée à un taux important de séroconversion (50 % des patients ont des anticorps dirigés contre les complexes PF4-héparine après la chirurgie), n'entraîne que peu de TIH avérée (2 à 3 %) (Warkentin et al., 2000, Pouplard et al., 1999). Ces différences n'ont pas d'explication physiopathologique évidente. Des hypothèses concernant le degré d'activation plaquettaire, la réaction inflammatoire associée et le relargage de PF4 ont été avancées.

### ***B. Aspects cliniques***

Le diagnostic de TIH est basé sur la présence d'anticorps anti PF4-héparine dans le sérum des patients susceptibles d'induire une activation plaquettaire dépendante de l'héparine associée à un tableau clinique compatible (Warkentin, 2005). Le diagnostic est évoqué devant une thrombopénie ou une chute du nombre de plaquette d'au moins 50 % chez un patient

traité par héparine. Le délai classique de survenue de la chute de la numération plaquettaire par rapport au début du traitement héparinique est de 5 à 14 j (Warkentin and Kelton, 2001). Un délai plus court peut néanmoins être observé chez des patients possédant des anticorps anti PF4-héparine issus d'une immunisation antérieure. La survenue d'une thrombopénie est un événement fréquent chez un patient traité par héparine qui ne signe pas nécessairement la présence d'une TIH (Oliveira et al., 2008). Des scores de probabilité diagnostique, tel le score 4T, ont donc été développés tenant compte de la profondeur de la thrombopénie, du délai de survenue par rapport à l'introduction de l'héparine, de la survenue d'événements cliniques thrombotiques et de la présence d'autres explications plausibles à la survenue de la thrombopénie (Tableau 3) (Lo et al., 2006).

	Points (0, 1 ou 2 pour chaque catégorie) Score maximal possible = 8		
	2	1	0
Thrombopénie	Nadir 20-100 x 10 <sup>9</sup> /L (chute d'au moins 30%) Ou diminution d'au moins 50% du pool plaquettaire	Nadir 10-19 x 10 <sup>9</sup> /L Ou diminution de 30 à 50 % du pool plaquettaire	Nadir <10 x 10 <sup>9</sup> /L Ou diminution de moins de 30 % du pool plaquettaire
Délai de survenue de la chute plaquettaire (J0 = 1 <sup>er</sup> jour d'héparine)	5 à 10 j (< 1j chez un patient traité par héparine dans les 30 derniers j)	> 10 j	≤ 4 j sans exposition récente à l'héparine
Evénement thrombotique	Nouvel événement thrombotique, nécrose cutanée	Thrombose extensive sous traitement, thrombose veineuse des membres supérieurs	Aucun
Autre cause de thrombopénie	aucune	possible	certaine

**Tableau 3 : probabilité pré-test de TIH : le score « 4T » (d'après Warkentin and Heddle, 2003).**

La principale manifestation clinique de la TIH, qui peut sembler paradoxale chez des patients thrombopéniques, est la thrombose veineuse ou artérielle, événement mettant en jeu le pronostic vital des patients. Le plus souvent, il s'agit de thromboses veineuses profondes ou d'embolies pulmonaires mais il peut s'agir de thromboses artérielles (accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde).

Le diagnostic est fondé sur des tests immunologiques capables de détecter la présence d'anticorps circulants dirigés contre les complexes PF4-héparine dans le sérum des patients

par méthode ELISA et des tests fonctionnels capables de démontrer une activation plaquettaire par l'héparine sous l'effet de ces anticorps.

Une TIH est toujours une situation à très haut risque thrombotique même si la thrombopénie est isolée. Cette notion justifie le consensus actuel préconisant un arrêt de l'héparine et la prescription d'un antithrombotique immédiatement efficace. À ce titre, les héparines de bas poids moléculaire ayant une réactivité croisée avec les anticorps dans près de 100 % des cas *in vitro* et fréquente *in vivo* ne sont pas utilisables. Les AVK nécessitent pour être efficaces plusieurs jours de traitement, induisent rapidement un déficit en protéine C qui peut aggraver les thromboses et par conséquent ne doivent pas être prescrits seuls dès le diagnostic (Warkentin, 2001).

En fait, seuls deux anticoagulants sont aujourd'hui utilisables en pratique : l'hirudine et le danaparoïde sodique. L'hirudine, peptide de 65 acides aminés produit par les glandes salivaires de sangsue, est un puissant inhibiteur direct de la thrombine. Elle est produite par génie génétique et commercialisée sous le nom de lépirudine (Refludan®). Elle n'établit aucune interaction avec le PF4 (Greinacher et al., 1999). Elle bénéficie en Europe d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement des TIH compliquées d'une thrombose évolutive. Son utilisation s'associe à un risque d'événements hémorragiques notamment s'il existe une insuffisance rénale. Une autre molécule inhibant directement la thrombine, l'argatroban, est autorisée pour le traitement des TIH en Amérique du Nord (Lewis et al., 2001).

Le danaparoïde est un héparinoïde de faible poids moléculaire (6 kDa) constitué d'un mélange de glycosaminoglycanes extrait comme l'héparine de la muqueuse intestinale de porc. Il est composé majoritairement d'héparan sulfate (80 %), mais aussi de dermatan sulfate (10 %) et de chondroïtine sulfate et interagit très faiblement avec le PF4. Il ne contient pas d'héparine ou de fragments hépariniques. L'activité antithrombotique du danaparoïde est principalement liée à son activité anti-facteur Xa (anti-Xa) associée à une action antithrombinique (anti-IIa) plus faible. L'activité anti-Xa du danaparoïde s'exerce par l'intermédiaire de l'antithrombine. Il est indiqué dans le traitement préventif et curatif des thromboses veineuses ou artérielles en cas de TIH ancienne ou récente. Dans 10 % des cas de TIH, une réactivité croisée des anticorps est objectivée avec le danaparoïde sodique par les tests d'activation plaquettaire avec parfois absence de correction rapide de la numération plaquettaire et un autre traitement anti-thrombotique doit être envisagé (Vun et al., 1996).

## C. Physiopathologie

### 1. Le facteur 4 plaquettaire (PF4)

Le PF4 est une glycoprotéine tétramérique chargée positivement, constituée de quatre polypeptides identiques comprenant chacun 70 acides aminés. Sa synthèse se fait quasi exclusivement dans les mégacaryocytes (Lane et al., 1984). Deux monomères de PF4 forment spontanément à pH et à force ionique physiologiques un dimère. Deux dimères s'assemblent ensuite dos à dos au niveau des zones hydrophobes des feuilletts beta pour former un tétramère. Les hélices alpha et les résidus lysines étant exposés à l'extérieur du tétramère, le PF4 tétramérique présente ainsi un anneau de charge positive permettant la fixation de l'héparine.

Le PF4 est une chémokine de la famille CXC synthétisée par les mégacaryocytes, contenue dans les granules  $\alpha$  des plaquettes, et relarguée au cours de l'activation plaquettaire (Holt and Niewiarowski, 1985). Il est libéré *in vivo* par les plaquettes circulantes sous la forme d'un complexe associant quatre molécules de PF4 et un protéoglycane lui-même constitué d'un noyau protéique et de chondroïtine-4-sulfate. Il est également présent sous une forme circulante, en faible quantité par rapport au stock intraplaquettaire. Les effets cellulaires du PF4 ne font pas intervenir de récepteurs cellulaires à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G comme pour d'autres chémokines de la famille CXC telles que l'IL-8, le NAP-2, ou Gro-alpha. Son rôle physiologique apparaît dans des processus comme la coagulation, l'inflammation et la réparation tissulaire.

#### a. PF4 et thrombose.

La libération de PF4 en grande quantité sur le site d'une blessure vasculaire du fait de l'activation plaquettaire entraîne une neutralisation des surfaces cellulaires des plaquettes et des cellules endothéliales chargées négativement (Eslin et al., 2004). Ceci faciliterait les interactions plaquette – plaquette et plaquette – endothélium favorisant ainsi la formation du thrombus. Le PF4 se lie avec une grande affinité à l'héparine et aux glycoaminoglycanes chargés négativement présents à la surface des cellules comme l'héparan sulfate, la dermatan sulfate ou les chondroïtine sulfates. Sa grande affinité pour les glycoaminoglycanes assure sa rétention à la surface des cellules.

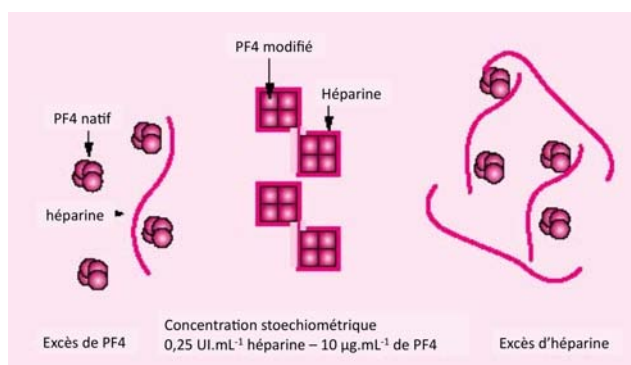
La neutralisation de l'effet anticoagulant des glycoaminoglycanes chargés négativement, dont l'héparine, explique probablement en partie son effet procoagulant.

## b. PF4 et chémoattractisme

Les interactions PF4 – leucocytes, et en particulier les monocytes, pourraient également participer à son effet prothrombotique. En cas de brèche vasculaire, les concentrations de PF4 augmentent de façon majeure à près de cent fois la concentration retrouvée dans un sérum normal (Lambert et al., 2007). Le PF4 possède un pouvoir chimiotactique élevé vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles, des monocytes et induit l'adhésion des polynucléaires neutrophiles et leur dégranulation. Ce processus pourrait contribuer à la cicatrisation.

## 2. Interactions héparine – PF4

Après exposition à l'héparine, certains individus sont susceptibles de développer une réponse immunitaire aboutissant à la synthèse d'anticorps dirigés contre des complexes formés par le facteur 4 plaquettaire et l'héparine (Visentin et al., 1994, Greinacher et al., 1994, Kelton et al., 1994). Les cibles antigéniques sont des épitopes du PF4 qui sont normalement masqués du système immunitaire mais deviennent exposés du fait du changement conformationnel de la molécule lorsqu'elle se complexe à l'héparine (Ziporen et al., 1998, Li et al., 2002, Visentin et al., 2001, Newman and Chong, 1999). La formation de complexes moléculaires Héparine-PF4 serait maximale avec un rapport H:PF4 de 1 UI pour 40 µg (Greinacher et al., 1994, Amiral et al., 1992). Dans ces conditions, tous les sites réactifs du tétramère du PF4 réagissent avec l'héparine, celle-ci créant des tensions intramoléculaires qui modifient sa structure de telle façon que les antigènes reconnus par les anticorps associés aux TIH soient exposés de manière optimale (Figure 21).



**Figure 21 : Reconnaissance et modification du PF4 par les anticorps au sein de complexes macromoléculaires en fonction des concentrations définies de PF4 et d'héparine. En cas d'excès relatif de PF4 ou d'héparine, les complexes ne sont pas formés ou se dissolvent (d'après Amiral et al., 1997).**

### **3. Réponse immunitaire**

La réponse immune développée au cours des thrombopénies induites par l'héparine est particulière. En effet, le complexe antigénique résulte d'une liaison non covalente entre une protéine du soi (le PF4) et l'héparine dont la structure est proche de celle de l'héparan sulfate normalement présent à la surface de l'endothélium. Cependant, les anticorps qui réagissent contre le complexe PF4-héparine ne sont pratiquement jamais retrouvés chez des sujets non traités par l'héparine. Les trois étapes mises en jeu lors de la réaction immune induite par les complexes Héparine-PF4 sont :

1. Une reconnaissance par les lymphocytes B d'antigènes exprimés par le PF4 modifié après interaction avec l'héparine.

2. Une internalisation de ce complexe par les lymphocytes B suivie d'une présentation aux lymphocytes T helper de fragments peptidiques dérivés du PF4 associés à des molécules HLA de classe II.

3. Une stimulation des lymphocytes T avec synthèse de lymphokines, suivie d'une expansion du clone de lymphocyte B avec production d'anticorps.

L'implication des lymphocytes T helper lors de la réponse immune développée au cours des TIH est soutenue notamment par le fait que les anticorps anti-Héparine-PF4 sont d'abord d'isotype IgM puis essentiellement des IgG

La synthèse d'anticorps est donc polytypique, représentée par des IgM, des IgA et des IgG. Cependant, seuls les anticorps de la classe IgG ont un potentiel pathogène (Suh et al., 1997, Untch et al., 2002).

### **4. Activation plaquettaire par les anticorps anti PF4**

Lorsque ces anticorps de la classe IgG lient les complexes PF4-héparine à la surface des plaquettes, leur fragment Fc se lie au récepteur Fc $\gamma$ RIIa sur la même plaquette ou les plaquettes adjacentes, induisant une activation plaquettaire source d'une agrégation plaquettaire et de l'émission de microparticules (Reilly et al., 2001). Le rôle prépondérant du fragment Fc des IgG et de Fc $\gamma$ RIIa a été confirmé par plusieurs travaux montrant que l'effet des Ac de TIH était inhibé par un anticorps monoclonal (IV.3) bloquant spécifiquement Fc $\gamma$ RIIa (Kelton et al., 1988). In vivo, de nombreux patients traités par l'héparine développent des Ac héparine-dépendants anti-FP4 sans nécessairement présenter une thrombopénie. Les anticorps ne seraient donc pathogènes que dans des circonstances bien définies mais non encore

élucidées. Le polymorphisme de FcγRIIIa pourrait être l'un des facteurs régulant la pathogénicité des anticorps bien que des résultats contradictoires soient retrouvés concernant cette hypothèse (Burgess et al., 1995, Carlsson et al., 1998).

A côté du rôle central des plaquettes, les cellules endothéliales et les monocytes semblent jouer un rôle important dans la pathogénèse des TIH et la pathogénicité des anticorps d'isotype IgG n'est sans doute pas limitée aux plaquettes. Quelle que soit leur spécificité, les IgG peuvent fixer leur fragment Fc à d'autres récepteurs cellulaires de forte affinité comme FcγRI (CD64) exprimé par les monocytes-macrophages et FcγRIIIa (CD16) présent également sur les monocytes-macrophages mais aussi les cellules NK et les lymphocytes T. Un récepteur de plus faible affinité (FcγRIIIb) est exprimé aussi par les granulocytes.

Une activation de l'endothélium par les anticorps de TIH a été évoquée à partir de travaux montrant l'expression d'une activité procoagulante par des cellules endothéliales après incubation avec du sérum de malades contenant des anticorps héparine-dépendants (Cines et al., 1987). Cette activité n'est pas retrouvée si les cellules endothéliales sont traitées par l'héparinase, suggérant une fixation des anticorps aux molécules d'héparan sulfate. Une fixation des anticorps héparine-dépendants IgG ou IgM aux cellules endothéliales a été démontrée (Cines et al., 1987). Les complexes immuns pourraient, par un mécanisme encore mal connu, activer les cellules endothéliales répondant par une expression accrue de molécules adhésives et prothrombotiques comme la E-sélectine et le facteur vW (Blank et al., 2002). Une expression endothéliale de facteur tissulaire, de E selectine, de VCAM et de ICAM-1 en présence de plaquettes et de sérum de TIH, associée à une libération d'IL1-β, de TNFα et de PAI-1 a également été montrée (Herbert et al., 1998).

Les complexes peuvent également lier les monocytes via Fcγ et induire l'expression de facteur tissulaire (Pouplard et al., 2001, Arepally and Mayer, 2001). Le plasma de patients TIH peut induire en présence de PF4 l'expression d'une activité procoagulante par des monocytes isolés (Pouplard et al., 2001). Par ailleurs, les IgG purifiées de malades ajoutés au sang total induisent une synthèse d'ARN messager spécifique du facteur tissulaire par les monocytes, mais uniquement en présence de PF4 et d'héparine. Arepally et al. ont ensuite objectivé la fixation PF4-dépendante de KKO (anticorps monoclonal anti- héparine/PF4) aux monocytes qui sécrètent ensuite de l'IL-8 et expriment une activité procoagulante due à la synthèse de facteur tissulaire (Arepally and Mayer, 2001). In vivo, il est possible que cette

activation monocytaire implique des interactions entre plaquettes activées et monocytes dépendante de la P-sélectine, mais aussi une activation directe des monocytes après fixation des anticorps aux récepteurs des fragments Fc.



# Résultats

## **ARTICLE 1**

### **ABCA1 deficiency affects platelet activation and signaling but spares calcium-induced PS exposure and platelet lipid composition**

Thibault Lhermusier, Jerome Van Rotttem, Cédric Garcia , Ashraf Ragab, Justine Bertrand-Michel, Beatrice Hechler, Cyril Brocardo, Marie-Pierre Gratacap, Giovanna Chimini and Bernard Payrastre

Manuscrit en préparation

## I. Introduction

ABCA1 est un transporteur impliqué dans l'homéostasie lipidique au niveau plasmatique et cellulaire. Plusieurs observations ont montré un phénotype hémorragique lié à une déficience en ce transporteur. Les explications avancées pour expliquer ces manifestations demeurent controversées. ABCA1 est impliqué dans l'absorption intestinale des vitamines liposolubles, dont la vitamine K, et un déficit isolé de la coagulation en rapport avec un déficit en vitamine K a été évoqué comme hypothèse physiopathologique à ces phénomènes hémorragiques chez la souris. De même, ABCA1 a été proposé comme protéine candidate à l'activité scramblase, permettant l'exposition des PS sur le feuillet externe des membranes plasmiques et l'activité procoagulante des plaquettes. L'objectif de notre étude a été d'évaluer le rôle d'ABCA1 dans l'hémostase primaire et d'élucider le rôle de ce transporteur dans les fonctions plaquettaires.

L'influence des désordres lipidiques sur la réactivité plaquettaire est connue de longue date et quelques observations ont suggéré une moindre réactivité plaquettaire chez les patients atteints de maladie de Tangier (Shastri et al., 1980). Il nous a donc paru important de connaître l'impact d'ABCA1 et de la baisse de HDL circulant sur la composition lipidique des plaquettes et sur leur réactivité.

Une étude chez l'homme n'était pas envisageable compte tenu de la rareté de cette pathologie sous sa forme homozygote. Quant aux formes hétérozygotes, elles peuvent constituer une perte de fonction partielle. Cependant, l'effet hétérogène de ces mutations au sein de la population ne permet pas de conduire une étude fiable. Nous avons donc obtenu un modèle de souris knock out pour le gène ABCA1 grâce à une collaboration avec le Dr. Giovanna Chimini du Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy. Ce modèle nous permettait d'envisager une étude relativement complète du rôle de ce transporteur dans l'activation des plaquettes isolées et lavées (en dehors du contexte plasmatique perturbé chez ces souris) et également in vivo.

A travers cette étude, nous avons souhaité répondre aux questions spécifiques suivantes : i) Quel est l'impact d'ABCA1 sur l'hémostase primaire et les réponses des plaquettes lavées ?, ii) quel est le rôle d'ABCA1 dans le contrôle de la composition lipidique (cholestérol et phospholipides majeurs) des plaquettes ?, iii) ABCA1 a-t-il un impact sur l'exposition des PS dépendante du calcium dans les plaquettes ?, iv) ABCA1 joue-t-il un rôle

dans la signalisation intraplaquettaire ?, v) ABCA1 a-t-il un impact sur les réponses plaquettaires lors d'une lésion endothéliale in vivo ?.

## **ABCA1 deficiency affects platelet activation and signaling but spares their lipid composition and calcium-induced PS exposure**

Thibault Lhermusier<sup>1</sup>, Jerome Van Rottem<sup>1</sup>, Cédric Garcia<sup>2</sup>, Ashraf Ragab<sup>1</sup>, Justine Bertrand-Michel<sup>3</sup>, Beatrice Hechler<sup>4</sup>, Cyril Brocardo<sup>5</sup>, Marie-Pierre Gratacap<sup>1</sup>, Giovanna Chimini<sup>6</sup> and Bernard Payrastre<sup>1,2</sup>

Inserm, U1048 and Université Toulouse 3, I2MC, 31432 Toulouse Cedex 04, France<sup>1</sup>; CHU de Toulouse, Laboratoire d'Hématologie, 31059 Toulouse Cedex 04, France<sup>2</sup>; I2MC, Lipidomic Core Facility-MetaToul, 31432 Toulouse Cedex 04, France<sup>3</sup>; Inserm UMR-S949, Etablissement Français du Sang-Alsace, 10 rue Spielmann BP36, 67065 Strasbourg, France<sup>4</sup>; Inserm U1037, CRCT, 31 Toulouse Cedex 04, France<sup>5</sup>; CIML, parc scientifique de Luminy, Case 906, 13288 Marseille Luminy, France<sup>6</sup>.

Address for correspondence : Bernard Payrastre, Inserm U1048, I2MC, 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 04, France. Phone: +33-5-62-74-45-25; Fax: +33-5-62-74-45-58; E-mail: [bernard.payrastre@inserm.fr](mailto:bernard.payrastre@inserm.fr)

### **Running head:** ABCA1 in platelets

T.L. participated in designing and performing the research and analyzed data; J.V.R., C.G. and A.R. performed experiments, J.B-M performed the lipidomic analysis, B.H. performed the intravital microscopy, C.B. and C.G. provided the mice model and analyzed data, M.P.G. controlled experimental approaches and B.P. controlled, analyzed data, and wrote the paper. All authors checked the final version of the manuscript.

## Summary

The ATP-binding cassette transporters ABCA1 is required for the conversion of apoA1 to high density lipoprotein (HDL) and its defect causes Tangier disease, a rare disorder characterized by an absence of circulating HDL and accumulation of cholesterol in peripheral tissues. The role of ABCA1 in haemostasis and platelet functions remains unclear although bleeding defects have been reported in some Tangier patients. There are controversies concerning the implication of ABCA1 in processes as fundamental as platelet dense granule and lysosomal granule maturation, calcium-induced phosphatidylserine exposure and control of platelet membrane lipid composition. Here, we show that mouse platelets deficient for ABCA1 have an increased size and a defect in response to low concentrations of thrombin and collagen. However, they have no apparent defect in granules morphology and number, they expose phosphatidylserine in response to calcium ionophore or thrombin *plus* collagen stimulations and have normal amounts of cholesterol and major phospholipids molecular species. We show that the functional platelet defect is due to a signal transduction deficiency with normal PI3K and PLC activation but reduced Akt and Erk activation. Overall, these data show that ABCA1 impacts on the platelet size and is involved in the efficiency of signaling events rather than in the control of the scramblase machinery and the platelet major lipid composition.

## Introduction

The ATP-binding cassette transporters ABCA1 has been demonstrated to be crucial in the reverse cholesterol transport pathway by loading cholesterol and phospholipids into apoA-1 to generate high density lipoprotein (HDL) particles.<sup>1-7</sup> ABCA1 has two transmembrane domains and two ATP-binding domains. It is highly expressed in intestine and liver but is also found in many other tissues including myeloid cells. Mutations in ABCA1 are responsible for Tangier disease, a rare autosomal recessive disorder characterized by a virtual absence of circulating HDL, a reduction of low-density lipoproteins (LDL), a weak elevation of triglycerides and an accumulation of cholesterol in peripheral tissues accompanied by atherosclerosis development.<sup>1-6</sup> The impact of ABCA1 in HDL biogenesis has been confirmed in mice in which the ABCA1 gene was disrupted.<sup>8</sup> These mice have a dramatic decrease in circulating HDL particles indicating a major role of the ABCA1 transporter in the efflux of cholesterol and phospholipids from cells to HDL particles. Liver and intestinal ABCA1 are thought to be responsible for producing most circulating HDL. However, macrophage ABCA1 is also important to mediate the efflux of cholesterol from these cells to prevent formation of foam cells.<sup>9</sup> The molecular mechanisms of ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-1 are still incompletely understood but appears to involve appropriated interaction of apoA-1 with the transporter and the formation of a channel for passage of the substrate, possibly through formation of ABCA1 dimers or tetramers.<sup>9</sup> Hyporeactivity of platelets from patients with Tangier disease has been reported<sup>10-12</sup> and a bleeding tendency of a Tangier patient with a nonsense mutation in ABCA1 gene and a mild thrombocytopenia has been observed.<sup>13</sup> Moreover, ABCA1-deficient mice present a hemorrhagic diathesis.<sup>7</sup> ABCA1 has been shown to be expressed in human platelets and its mRNA increases

during megakaryocytic maturation.<sup>11,14</sup> Many fundamental questions remain concerning the role of ABCA1 in the regulation of platelet functions. It has been postulated that this transporter is involved in the calcium-dependent exposure of the anionic phospholipid phosphatidylserine (PS), a crucial step in the procoagulant activity of platelets.<sup>15</sup> Indeed, a defect of clearance of apoptotic cells by macrophages linked to PS exposure has been described in the absence of ABCA1.<sup>8</sup> Moreover, a missense mutation in the ABCA1 gene was reported in a Scott syndrome patient suggesting that this transporter could be part of the scramblase activity required for PS exposure in platelets.<sup>16</sup> However, several reports argue against its direct implication in lipid scrambling.<sup>11,17</sup> Other studies have shown ultrastructural platelet defects in platelets from a Tangier patient with a reduced number of dense granules and the presence of some giant granules.<sup>11</sup> These ultrastructural abnormalities appears to be heterogeneous since in an other study, platelets from Tangier patients were shown to have expanded Golgi complexes and reduced open canalicular system without significant modification of granules.<sup>7</sup> Finally, the impact of ABCA1 in the control of platelet lipid composition remains poorly known. The rarity of Tangier patients is a limiting factor for the characterization of the role of this lipid transporter in haemostasis. Therefore, in this study, we took advantage of the ABCA1 deficient mouse model to gain insight into the role of ABCA1 in platelet regulation.

## **Methods**

### **Materials**

The mouse monoclonal anti ABCA1 (ab18180) was from Abcam (Paris, France), the anti-phospho-Akt (S473 and T308) and the peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines,



France), the FITC-labelled anti-GPVI was from Emfret Analytics and the FITC-labelled anti-GpIIb was from BD Pharmingen.

Horn collagen from equine tendon was from Nycomed (Konstanz, Germany). Bovin liver phosphatidylinositol (PI) and porcine brain phosphatidylethanolamine (PE) were from Avanti Polar Lipids (Coger, Paris, France). All other reagents including other phospholipid standards were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France) unless otherwise indicated.

## **Animals**

Wild type and ABCA1<sup>-/-</sup> mice were of DBA1/*lacJ* genetic background as described previously.<sup>7,8</sup> All mice experiments were approved by the institutional review board.

## **Preparation and activation of mouse platelets**

Blood was collected into ACD (Acid-Citrate-Dextrose) and platelets were isolated as described previously.<sup>18</sup> Briefly, blood was mixed with 1 volume of modified HEPES-Tyrode's buffer (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 mM glucose, 0.35% BSA, 5 mM HEPES, pH 6.7). After centrifugation at 250g for 4 min, PRP was removed and a further 300 µl of modified HEPES-Tyrode's buffer was added to the remaining blood which was then centrifuged at 250g for 4 minutes. Then, PGI<sub>2</sub> was added to the PRP at a final concentration of 500 nM and platelets were pelleted by centrifugation at 850g for 4 minutes at 37°C. Platelet pellets were finally resuspended in modified HEPES-Tyrode's buffer containing 2 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.38), pooled at a density of 5 x 10<sup>8</sup> platelets/ ml in the presence of the ADP scavenger apyrase (adenosine-5'-triphosphate diphosphohydrolase), and incubated for 1 hour at 37°C before platelet stimulation. Platelet aggregation experiments were

monitored under continuous stirring at 900 rpm at 37°C by a turbidimetric method and ATP secretion was recorded by measuring the luminescence from the firefly luciferin-luciferase reaction using the Chrono-log® aggregometer (Kordia).

**Tail bleeding time.** Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (25 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and a 3 mm segment of the tail tip was cut off with a scalpel. Tail bleeding was monitored by gently absorbing the bead of blood every 15 seconds with a filter paper without contacting the wound site. When no blood was observed on the paper after 15-second intervals, bleeding was determined to have ceased. The experiment was stopped after 30 minutes if no cessation of blood flow occurred.

**Fibrinogen binding assays.** Washed platelets ( $1 \times 10^8$  platelets/ml) were incubated simultaneously with 0.1 or 0.3 IU/ml thrombin, Oregon Green 488–conjugated fibrinogen (150 µg/ml in final volume), and Tyrode's buffer in a final volume of 100 µl. After 10 minutes at 37°C without shaking, samples were fixed by the addition of formalin (1% in final volume) and then diluted 5 times with HEPES-Tyrode's buffer. Samples were analyzed by flow cytometry using a FACScan and Win MDI software.

**Gel electrophoresis and immunoblotting.** Proteins were resuspended in electrophoresis sample buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 15% (vol/vol) glycerol, 25 mM DTT, and 3% SDS, boiled for 5 minutes, separated on SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (Gelman Sciences), and analyzed as previously described<sup>18</sup> using the relevant antibody.

**Lipid analysis.** To simultaneously separate phospholipids LC-MS/MS analysis was performed on UHPLC system (Agilent LC1290 Infinity) coupled to Agilent 6460 triple

quadrupole MS (Agilent Technologies) equipped with electro-spray ionization operating in negative mode. Polar phase UHPLC was performed using Silice Upti-prep (column (2.1 mm-50 mm-2.2  $\mu$ m) (INTERCHIM) in an oven at 40°C with a gradient elution. Mobile phase A consisted of hexane and isopropanol (82/18); and B of isopropanol and water (85/15), both phase contained 0.014% of triethylamin and 0.5% of acid acetic. Compounds were separated with a linear gradient from 40% of B to 65% in 1.5 min, then to 90% of B in 6.5 min, and to 100% in 0.2 min. Isocratic elution continued for 4 min at 100 % then 0% was reached in 0.2 min and maintained to 14 min. The flow rate was 0.3mL/min. The autosampler was set at 5°C and the injection volume was 5  $\mu$ L.

Mass spectrometer parameters were optimized according to manufacturer's indications. The optimised parameters used were as follow: source temperature=325 °C, nebulizer gas (nitrogen) flow rate=10 L/min, sheath gas (nitrogen) flow rate=10 L/min, sheath gas temperature=400 °C, spray voltage=4000 V, nozzle=1000V. Data were acquired in precursor ion or neutral loss mode depending on the phospholipid class with optimized conditions (fragmentors (F) and collision energy (CE)). Nebulisation pressure was 20 psi except for SM where it was 30Psi. Neutral loss scanning for  $m/z$  141 in positive mode was used for PE (RT = 1.9min, F=160V, EC=20V). Precursor ion scanning for  $m/z$  241 in negative mode was used for PI (RT = 4min, F=160V, EC=35V). Neutral loss scanning for  $m/z$  87 in negative mode was used for PS (RT = 4.6min, F=160V, EC=20V). Precursor ion scanning for  $m/z$  184 in positive mode was used for PC (RT = 8.5min, F=150V, EC=20V). Precursor ion scanning for  $m/z$  184 in positive mode was used for SM (RT = 11.3min, F=150V, EC=25V). Peak detection and integration were done using Mass Hunter Qualitative

analysis software (Agilent Technologies). Quantifications were calculated with equation obtained with calibration curves.

For cholesterol quantification, lipids were extracted in the presence of 15 µg stigmasterol as internal standard and injected into a gas chromatograph (Hewlett-Packard), as described.<sup>19</sup>

For D3-phosphoinositide and phosphatidic acid (PtdOH) measurements, platelets were labelled with 0.6 mCi/ml [<sup>32</sup>P]orthophosphate during 45 min in a phosphate-free Hepes-Tyrode's buffer (pH 6.5) at 37°C. Phosphoinositides and PtdOH were quantified as described.<sup>18</sup>

**Measurement of PS exposure.** PS exposure was monitored by using the FITC-annexin V probe according to the manufacturer recommendations (BD Pharmingen). Briefly, platelets were activated with indicated agonists for 4 min, incubated with annexin V-FITC for an additional 10 min in the dark, diluted, and analyzed by flow cytometry.

**Electron microscopy.** Platelets were fixed in 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 4 h at 4°C. After two washes in the same buffer, cells were allowed to adhere on poly-lysine coated cover glasses. They were then dehydrated in a graded ethanol series (scanning electron microscope) or embedded in resin and sectioned (transmission electron microscopy) according to standard procedures for electron microscopic imaging.

## Results and Discussion

### **ABCA1 deficiency induces abnormal haemostasis and affects platelet size and aggregation.**

A bleeding phenotype has been reported in patients with Tangier disease<sup>13</sup> as well as in ABCA1-deficient mouse.<sup>7</sup> Here we show that ABCA1 is expressed in mouse platelets (Figure 1A) and that its deficiency leads to a defect in primary haemostasis as indicated by abnormalities in the tail bleeding time (Figure 1B). While bleeding stopped in all control mice within 6 minutes (mean,  $3.16 \pm 0.26$  minutes,  $n=28$ ), bleeding times were variable and generally increased in ABCA1-deficient animals (mean,  $8.52 \pm 1.04$  minutes,  $n=30$ ). However, all tested animals stopped bleeding within the observation period of 25 minutes. Deletion of ABCA1 had no significant impact on the circulating platelet count ( $4.3 \times 10^8$ /ml of blood for ABCA1<sup>-/-</sup> and  $4.6 \times 10^8$ /ml of blood for wild type mice,  $n=5$ ). Moreover, consistent with the observation of Orso et al.<sup>7</sup> that the concentration of liver vitamin K1 is decreased in ABCA1-deficient mouse, we found a significant prolongation of the standard coagulation test prothrombin time (wild type,  $35 \pm 6$  seconds; ABCA1<sup>-/-</sup>,  $92 \pm 18$  seconds,  $p < 0.01$ ,  $n=6$ ). Besides this alteration of the coagulation that may contribute to the hemorrhagic diathesis observed on simple blood drawing,<sup>7</sup> the defect in primary haemostasis prompted us to further analyse ABCA1<sup>-/-</sup> platelet responses.

Platelet aggregation tests of washed ABCA1<sup>-/-</sup> platelets clearly indicated reduced responses to low doses of thrombin and collagen. The overall maximal aggregatory response to high concentrations of these agonists was however similar in ABCA1<sup>-/-</sup> and wild-type platelets (Fig. 1C). The defect observed at low doses of agonists was not due to a decreased expression of platelet surface GPVI and  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin which were comparable in wild type and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets (supplementary figure 1).

Consistent with the aggregation response, the level of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation monitored by oregon-green fibrinogen binding was significantly reduced at low doses of agonists while raising the doses of thrombin reduced the defect (supplementary figure 2A).

Dense granules secretion was then monitored by following the release of ATP (supplementary figure 2B). A decrease in the agonist-induced ATP secretion was observed in ABCA1<sup>-/-</sup> platelets stimulated at low doses of thrombin but again raising the agonist concentrations restored a nearly normal secretion response.

Collectively, these data indicate that loss of ABCA1 results in a reduction of platelet secretion and aggregation following stimulation with low doses of agonists but both responses are restored upon activation with high agonist concentration arguing for a potential defect in signalling.

Remarkably, the shape change of ABCA1<sup>-/-</sup> platelets was consistently more pronounced than the shape change of wild type platelets (Figure 1 C, inset). Scanning electron microscopy studies of platelets stimulated in suspension for 20 seconds with thrombin indicated that the morphological modifications in ABCA1<sup>-/-</sup> platelets (rounding and filopodia formation) were microscopically indistinguishable from those observed in wild type platelets (Figure 2A). A factor that can influence the profile of the shape change monitored by light transmission is the size of platelets. Transmission electron microscopy analysis revealed that the platelet size was indeed significantly increased in ABCA1<sup>-/-</sup> animals, as shown by the measure of platelet width (wild type,  $0.88 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ; ABCA1<sup>-/-</sup>,  $1.28 \pm 0.06 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 22$ ) (Figure 2B). This increased size was accompanied by a slight elevation of the amount of total proteins per platelet (wild type,  $16.1 \pm 0.6 \mu\text{g}/10^7$  platelets; ABCA1<sup>-/-</sup>,  $18.3 \pm 0.3 \mu\text{g}/10^7$  platelets,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) and of total phospholipids (Figure 2B). Observation of

transmission electron microscope micrographs did not indicate obvious modifications in the platelet granule content or size.

Taken together, these results demonstrate that ABCA1 is not required for thrombin-induced shape change but its loss impacts on the platelet size.

**Loss of ABCA1 spares calcium-dependent PS exposure, does not affect cholesterol and phospholipid content of platelets but reduces the efficiency of specific signal transduction processes.**

The major function of ABCA1 described so far is the efflux of cholesterol and phospholipids from cells to HDL particles. Whether this lipid transporter can impact on the homeostasis of cholesterol and phospholipids in platelet membranes is still uncertain. The amount of cholesterol in the plasma membrane is an important determinant of platelet signal transduction efficiency possibly via its impact on lipid rafts organization.<sup>20</sup> Quantification of platelet free cholesterol expressed by  $\mu\text{g}$  of proteins indicated that the level of cholesterol was in fact comparable in control and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets as also shown by the molar ratio of cholesterol/phospholipids which was not significantly different (Figure 3A). The repartition of major phospholipids was not significantly modified neither (Figure 3B) and the molecular species of phospholipids were also quite comparable with only few modifications (supplementary figure 3). Lipid rafts were then visualized with FITC-conjugated cholera toxin which binds the lipid raft marker ganglioside GM<sub>1</sub> on the surface of platelets. Again, the cholera toxin binding was comparable in control and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets either in resting conditions or following ADP stimulation (not shown), suggesting that lipid raft formation was not affected in the absence of ABCA1 in

platelets. Overall, this lipidomic analysis indicates that ABCA1 is not a major regulator of free cholesterol and phospholipid content in mouse platelets membranes.

We then analyzed the potential role of ABCA1 in the calcium-dependent exposure of the anionic phospholipid PS by monitoring annexin V-FITC binding to platelets stimulated either by thrombin *plus* collagen or by the calcium ionophore A23187. As shown Figure 3C-D, no significant difference in the exposure of PS could be observed between control and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets, indicating that this lipid transporter is not involved in the calcium-dependant scramblase machinery in mouse platelets.

To explore the defect of platelet responses observed at low doses of agonists in the absence of ABCA1, we investigated the signalling mechanisms following stimulation by increasing concentrations of thrombin. In wild type platelets, Akt phosphorylation increased in a dose dependant manner and was clearly detectable at 0.2 UI/ml thrombin. In contrast, in ABCA1<sup>-/-</sup> platelets, higher doses of agonists were required to detect Akt phosphorylation (Figure 4A). This difference was not due to a delay in the signalling machinery but to a defect in the intensity of Akt activation and Erk phosphorylation (Figure 4B). Interestingly, this was not caused by a general alteration at the level of receptor-mediated signalling since the activation of phospholipase C and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) were comparable in wild type and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets. Indeed, phosphatidic acid (PtdOH) production which reflects the combined activity of phospholipase C (PLC) and diacylglycerol kinase in platelets was normal in ABCA1<sup>-/-</sup> platelets stimulated by thrombin (Figure 4C). Moreover, the defect in Akt activation was not due to a loss of the phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) production by PI 3-kinase as this second messenger, required for membrane association and phosphorylation of Akt, was generated in



ABCA1<sup>-/-</sup> platelets following thrombin stimulation (Figure 4C). Thus ABCA1 is not mandatory for signal transduction but is involved in the efficiency of specific steps of signalling mechanisms, particularly Akt and Erk activation. High doses of agonists are however able to sufficiently activate these enzymes to induce a normal ABCA1<sup>-/-</sup> platelet aggregation. A role for ABCA1 in facilitating signal transduction in response to apoA-I has previously been reported.<sup>21</sup> It is proposed that ABCA1 has receptor-like properties and can activate signalling pathways including JAK2 and Cdc42 following apoA1 interaction.<sup>22</sup> A direct interaction of Cdc42 and ABCA1 has been described.<sup>21</sup> It is thus conceivable that ABCA1 contributes to the organisation of signalling complexes allowing efficient activation of Akt and Erk. Besides this effect ABCA1 can impact on signal transduction indirectly by modulating the level of membrane cholesterol at least in some cells. Macrophages lacking ABCA1 have an elevated cholesterol content leading to increased sensitivity to lipid rafts-dependent signalling processes and pro-inflammatory response.<sup>23</sup> In platelets, ABCA1 is relatively weakly expressed compared to hepatocytes or macrophages and its absence is not associated with an increase in membrane free cholesterol or a change in the major phospholipid composition. Thus, ABCA1 is not a major actor in the regulation of cholesterol efflux from platelets but acts directly on the efficiency of Akt and Erk activation. Furthermore, our results indicate that a dramatic drop in HDL, as found in ABCA1<sup>-/-</sup> mice,<sup>7</sup> does not significantly impact on the major lipid composition of mouse platelets. HDL have been shown to inhibit platelet responses,<sup>24</sup> thus the decrease in HDL in ABCA1<sup>-/-</sup> mice may compensate the defect of washed ABCA1<sup>-/-</sup> platelet activation. This hypothesis is supported by a model of arterial thrombus formation monitored by intravital microscopy following locally injured mesenteric arteries.<sup>25</sup> Upon induction of a superficial injury using a laser, wild-type

and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets rapidly adhered to the site of endothelial desquamation and formed a comparable thrombus (supplementary figure 4A). Following a deep lesion, the thrombotic response was much stronger and again comparable in wild-type and ABCA1<sup>-/-</sup> mice. However, a faster decrease in thrombus size was observed in ABCA1<sup>-/-</sup> mice. This difference may be due to a reduced formation of thrombin because of the defect in vitamin K and coagulation as the deep injury model is known to generate a thrombin-rich environment and/or to a reduced intensity of signal transduction in platelets that more rapidly detach from the thrombus.

Taken together, our study provides direct evidence that ABCA1 does not impact on mouse platelet major lipid composition, including cholesterol and phospholipids and is not necessary for calcium-dependent PS exposure but is involved in the control of mouse platelet size and in distinct signal transduction mechanisms, including Akt and Erk activation particularly at low doses of agonist. Further studies will be required to assess how ABCA1 impact on specific molecular mechanisms of signal transduction. Interestingly this effect appears specific of ABCA1 since deficiency of ABCA7, an other member of the family expressed in mouse platelets, has no significant effect on platelet activation (not shown). In conclusion our data show that, in mouse, ABCA1 impacts on haemostasis at least at two levels; in controlling coagulation through the regulation of vitamin K and in contributing to platelet signalling efficiency.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grants from Inserm. TL was supported by a grant from CHU-Toulouse, JVR by the Fondation pour la Recherche Médicale.

## References

- 1- McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(8):4245-4250.
- 2- Bodzioch M, Orso E, Klucken T et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*. 1999;22:347-351.
- 3- BrooksWilson A, Marcil M, Clee SM et al. Mutation in ABCA1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*. 1999; 22:336-345.
- 4- Rust S, Rosier M, Funke H et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999;22:352-355.
- 5- Bortnick AE, Rothblat GH, Stoudt G et al. The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem* 2000;275:28634-28640.
- 6- Attie AD. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. *Trends Biochem Sci* 2007;32(4):172-179.
- 7- Orsó E, Broccardo C, Kaminski WE, Böttcher A, Liebisch G, Drobnik W, Götz A, Chambenoit O, Diederich W, Langmann T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lackner KJ, Chimini G, Schmitz G. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet*. 2000;24(2):192-196.
- 8- Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D, Chimini G. ABCA1 promotes engulfment

- of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol* 2000; 2(7): 399-406.
- 9- Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis. *Circulation*. 2006;113(21):2548-55.
- 10- Schmitz G, Schambeck M. Molecular defect in the ABCA1 pathway affect platelet function. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35(1-2):166-174.
- 11- Nofer J-R, Herminghaus G, Brodde M, Morgenstern E, Rust S, Engel T, Seedorf U, Assmann G, Bluethmann H, Kehrel B. Impaired platelet activation in familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *J Biol Chem* 2004; 279 (32): 34032-34037.
- 12- Shastri KM, Carvalho AC, Lees RS. Platelet function and platelet lipid composition in the dyslipoproteinemias. *J Lipid Res* 1980; 21: 467-472.
- 13- Hooper AJ, Robertson K, Ng Lydia, Kattampallil JS, Latchem D, Willsher PC, Thom J, Baker RI, Burnett JR. A novel *ABCA1* nonsense mutation, R1270X, in Tangier disease associated with an unrecognised bleeding tendency. *Clin Chim Acta* 2009; 409(1-2): 136-139.
- 14- Barlage S, Boettcher D, Boettcher A, Dada A, Schmitz G. High density lipoprotein modulates platelet function. *Int Soc Anal Cytol* 2006; 69A: 196-199.
- 15- Lhermusier T, Chap H, Payrastra B. Platelet membrane phospholipid asymmetry : from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost* 2011, in press.
- 16- Albrecht C, McVey JH, Elliott JI, Sardini A, Kasza I, Mumford AD, Naoumova RP, Tuddenham EG, Szabo K, Higgins CF. A novel missense mutation in *ABCA1* results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood* 2005; 106: 542–9.

- 17- Williamson P, Halleck MS, Malowitz J, Ng S, Fan X, Krahling S, Remaley AT, Schlegel RA. Transbilayer phospholipid movements in ABCA1-deficient cells. *PLoS One* 2007, 2: e729.
- 18- Martin V., Guillermet-Guibert J., Chicanne G., Jandrot-Perrus M., Vanhaesebroeck B., Plantavid M., Payrastre B., Gratacap M-P. Deletion of p110 beta isoform of phosphoinositide 3-kinase in platelets reveals its central role in heterotrimeric G protein and ITAM-signaling. *Blood* 2010; 115: 2008-2013.
- 19- Bodin S, Giuriato S, Ragab J, Humbel BH, Viala C, Vieu C, Chap H, Payrastre B. Production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidic acid in platelet rafts: evidence for a critical role of cholesterol-enriched domains in human platelet activation. *Biochemistry* 2001; 40: 15290-15299.
- 20- Bodin S, Tronchère H, Payrastre B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1610: 247-257.
- 21- Nofer J-R, Remaley AT, Feuerborn R, Wolinska I, Engel T, Von Eckardstein A, Assmann G. Apolipoprotein A-I activates cdc42 signaling through the ABCA1 transporter. *J Lipid Res* 2006; 47: 794-803.
- 22- Liu Y, Tang C. Regulation of ABCA1 functions by signalling pathways. *Biochim Biophys Acta* 2011, in press.
- 23- Zhu X, Lee JY, Timmins JM, Brown JM, Boudyguina E, Mulya A, Gebre AK, Willingham MC, Hiltbold EM, Mishra N, Maeda N, Parks JS. Increased cellular free cholesterol in macrophage-specific *Abca1* knock-out mice enhances pro-inflammatory response of macrophages. *J Biol Chem* 2008; 283: 22930-22941.
- 24- Nofer JR, Walter M, Kehrel B, Wierwille S, Tepel M, Seedorf U, Assmann G. HDL3-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide-derived second

messengers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:861-869.

25- Hechler B, Nonne C, Eckly A, Magnenat S, Rinckel J-Y, Denis CV, Freund M, Cazenave J-P, Lanza F, Gachet C. Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb haemost* 2009; 8:173-184.

## Figure legends

### Figure 1

*Expression of ABCA1 in mouse platelets and effect of its deletion on platelet activation.* A: Washed mouse platelets were submitted to Western blotting analysis with the anti-ABCA1 antibody. As a positive control, an hepatocyte homogenate was loaded (H). Results shown are representative of 2 experiments. B: Tail bleeding time of wild type and ABCA1<sup>-/-</sup> mice (3.16 ± 0.26 minutes for wild type mice versus 8.52 ± 1.04 minutes for ABCA1<sup>-/-</sup> mice, p<0.001, n=30). C: Washed platelets were stimulated with increasing doses of thrombin or collagen and aggregation was assessed using a Chrono-log dual-channel aggregometer under stirring at 900 revolution per minutes. The profiles shown are representative of 8 independent experiments.

### Figure 2

*Loss of ABCA1 spares platelet shape change but increases platelet size.* A: Representative scanning electron micrographs of wild type and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets stimulated or not by thrombin (1 IU/ml) in suspension during 20 seconds (left panels). The right panels show a representative transmission electron micrograph of resting wild type and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets. B: Mean platelet width of wild-type and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets (n = 22 per group) showing that ABCA1<sup>-/-</sup> platelets are increased in size. Error bars: wt, 0.88 ± 0.08; ABCA1<sup>-/-</sup>, 1.28 ± 0.06 μm; \*\*\*p < .001. Protein (n=3) and phospholipid (n=2) quantification of control and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets are also shown.

### Figure 3

*Loss of ABCA1 does not impact on platelet major lipid composition and PS exposure.*

A: Amount of cholesterol quantified in wild-type and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets and expressed as nmol/mg of platelet proteins or as cholesterol/phospholipid molar ratio (n = 7). B: The composition of the phospholipids was analyzed by mass spectrometry. Data obtained in two independent experiments are shown and results are expressed as mol% of total phospholipids. The molecular species of phospholipids is shown in supplementary figure 3. C: Exposure of the negatively charged phospholipid PS as determined by annexin V-FITC binding in control and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets. The upper panel shows a characteristic flow cytometry analysis of annexin V-FITC binding on wild-type and ABCA1<sup>-/-</sup> platelets stimulated by the ionophore A23187. The lower panel shows the quantification of annexin V-FITC positive platelets in resting conditions or following collagen (2.5 µg/ml) *plus* thrombin (0.5 UI/ml) or A23187 stimulations. Results are expressed as percentage of annexin V-FITC positive platelets and are mean ± 4 independent experiments.

### Figure 4

*ABCA1<sup>-/-</sup> platelets have a deficiency in signal transduction.*

A: Washed platelets from wild type or ABCA1<sup>-/-</sup> mice were stimulated by increasing concentrations of thrombin and Akt phosphorylation (S473 and T308) was analyzed by western blot. B: Washed platelets were stimulated by 1UI/ml thrombin for increasing period of time and the phosphorylation of Akt (S473 and T308) and Erk were assessed by western blot. The western blots shown are representative of 3 independent experiments.



C:  $^{32}\text{P}$ -labeled washed platelets were stimulated by 0.5 UI/ml thrombin for 5 min and the production of  $^{32}\text{P}$ -PtdOH and  $^{32}\text{P}$ -PtdIns(3,4,5) $\text{P}_3$  were quantified. Representative results are shown.

## Supplementary figures

### Figure S1 :

*ABCA1<sup>-/-</sup> platelets have a normal expression of GPVI and  $\alpha\text{IIb}$ .* The surface expression of GPVI and  $\alpha\text{IIb}$  was analyzed by flow cytometry in platelets from control or ABCA1<sup>-/-</sup> mice. A representative example of 3 independent experiments is shown.

### Figure S2 :

*Defect of  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  activation and ATP secretion in ABCA1<sup>-/-</sup> platelets following thrombin stimulation.* A: The binding of Oregon green 488-conjugated fibrinogen to control and ABCA1<sup>-/-</sup> washed platelets activated or not by thrombin (0.5 and 1 IU/ml) for 5 minutes was measured by flow cytometry. Results are expressed as percentage of Oregon green 488-conjugated fibrinogen positive platelets and are mean  $\pm$  4 independent experiments.

B: ATP secretion of control and ABCA1<sup>-/-</sup> washed platelets was recorded by measuring the luminescence from the firefly luciferin-luciferase reaction by lumi-aggregometry using the Chrono-log® aggregometer (Kordia).

**Figure S3 :**

*Weak modifications of the repartition of phospholipid molecular species in ABCA1<sup>-/-</sup> platelets.* The molecular species of phospholipids (phosphatidylethanolamine, PE; phosphatidylcholine, PC; phosphatidylserine, PS; phosphoinositide, PI; sphingomyelin, SM) in control and ABCA1<sup>-/-</sup> washed platelets were assessed by mass spectrometry analysis. The *m/z* ratio of the different molecular species of phospholipids is indicated in the right column. Results (area of each molecular species pick integration) are from two independent experiments and are expressed as percentage of molecular species for each family of phospholipid.

**Figure S4 :**

*Platelet thrombus formation in control and ABCA1<sup>-/-</sup> mice after superficial and deep laser injury.* Thrombus formation over time following laser-induced injury of mesenteric artery wall of wild-type and ABCA1<sup>-/-</sup> mice was followed by intravital microscopy (objective 40X, scale bar = 20  $\mu$ m). A: superficial injury model, eight wild-type mice (n = 18 vessels) and seven ABCA1<sup>-/-</sup> mice (n = 15 vessels). B: deep injury model, eight wild-type mice (n = 10 vessels) and three ABCA1<sup>-/-</sup> mice (n = 3 vessels). The mean thrombus surface was analyzed at 0.3 second intervals and the shading over the curve represents the SEM at each time point (grey: wild type mice; red: ABCA1<sup>-/-</sup> mice). Time 0 corresponds to the time of injury.

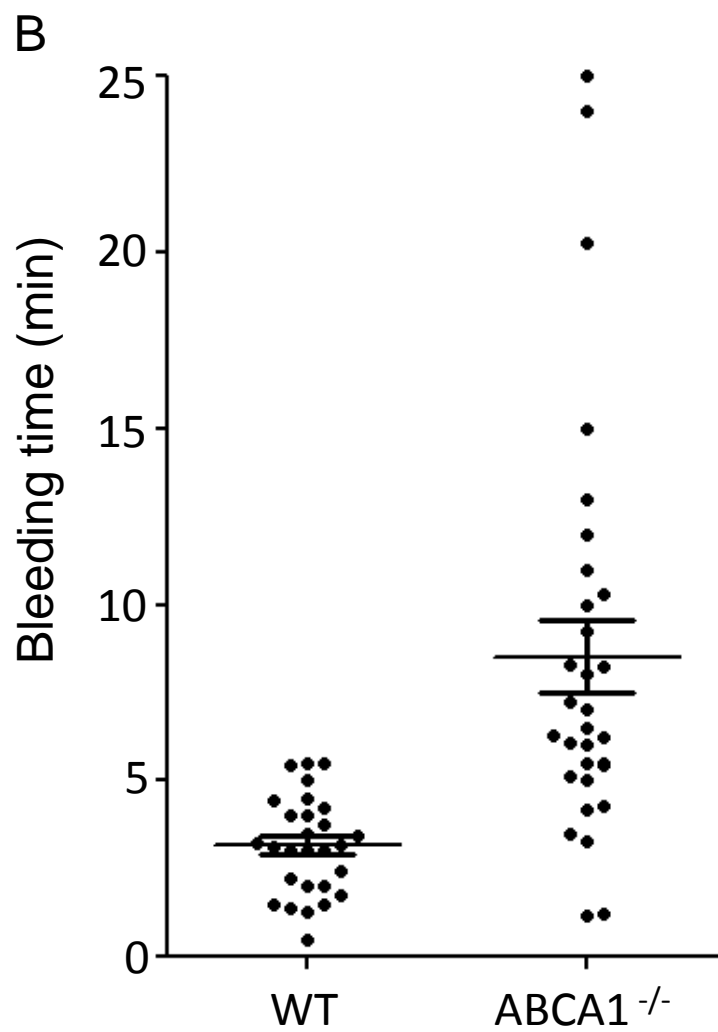
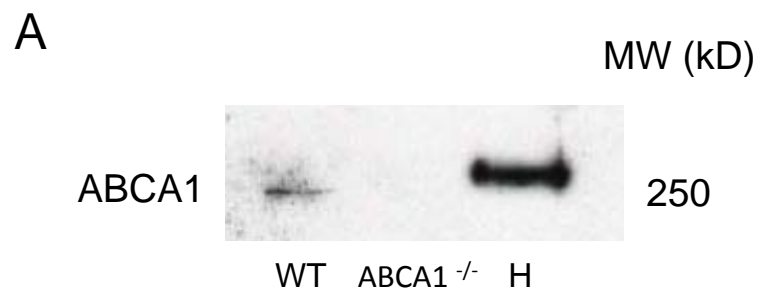


Figure 1 A-B (Lhermusier et al)

C

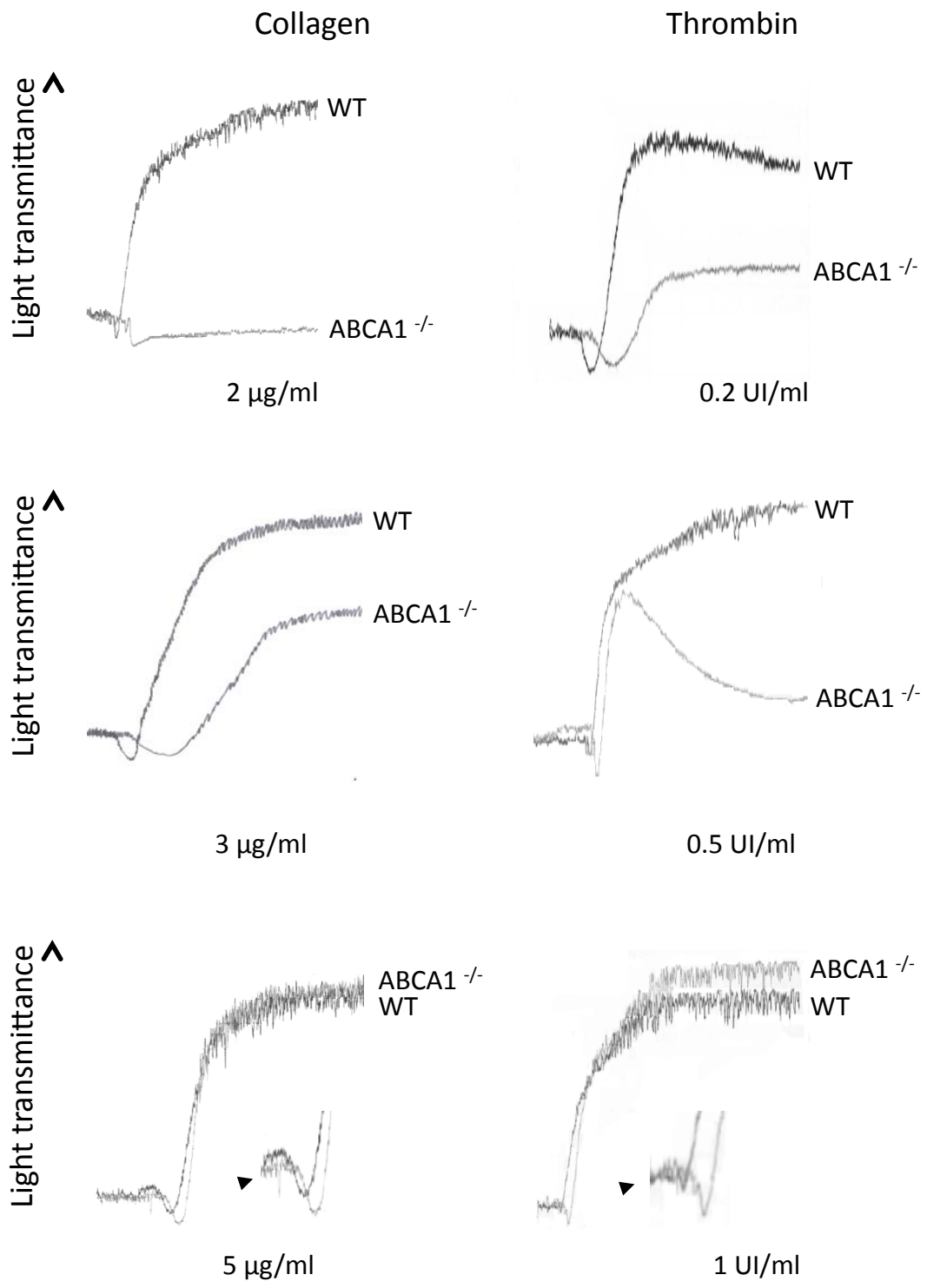
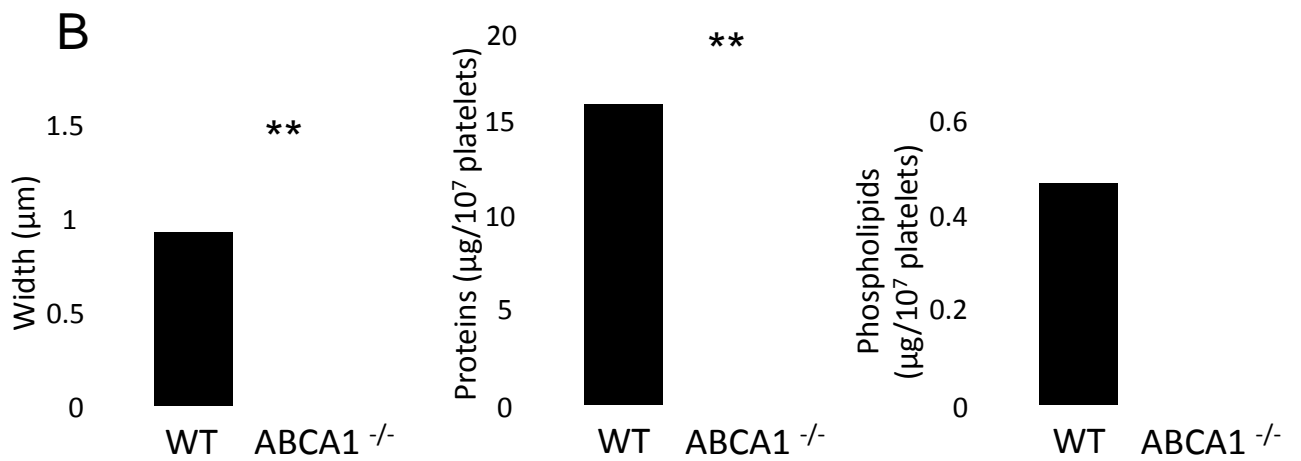
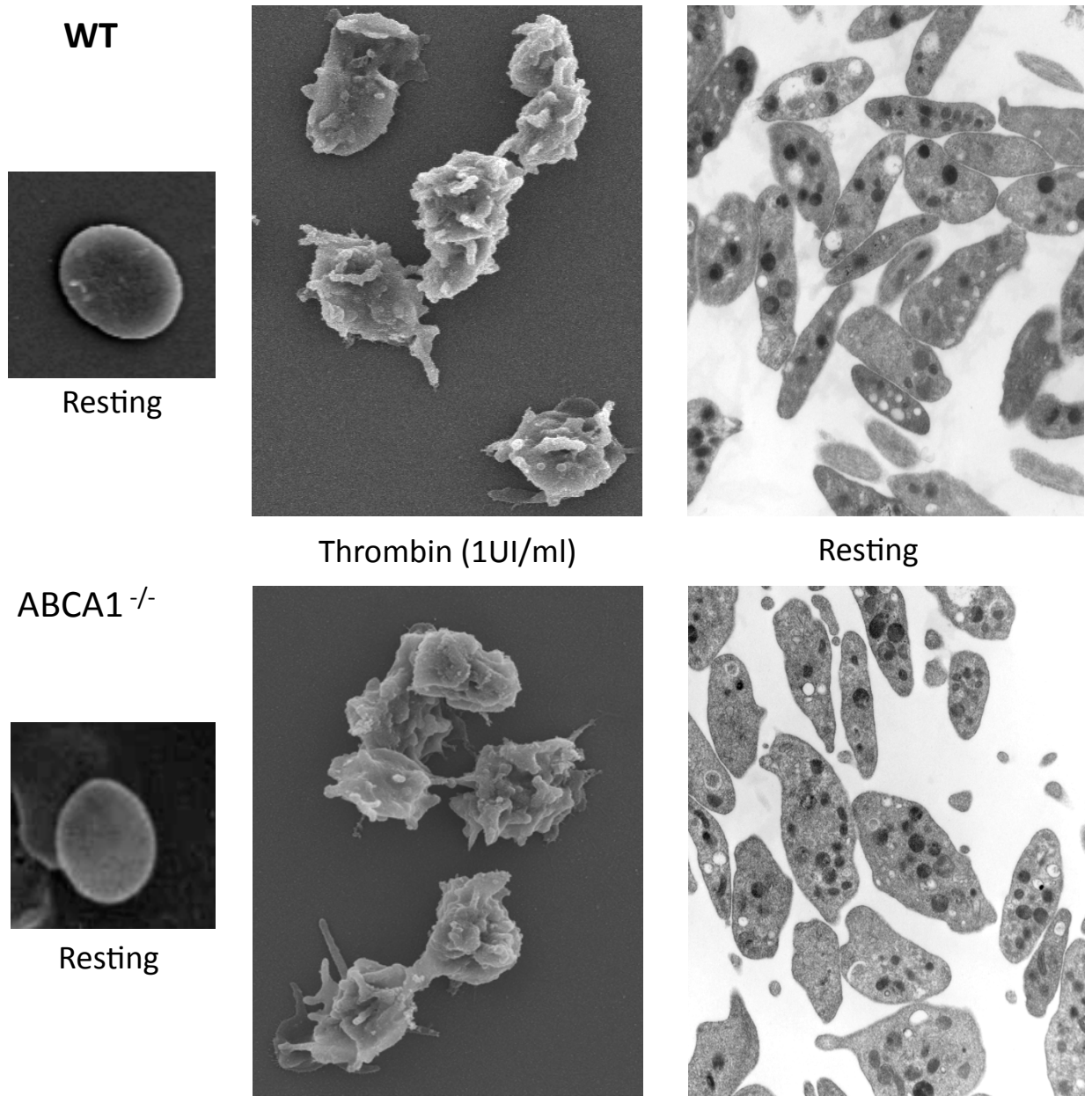


Figure 1 C (Lhermusier et al)

A



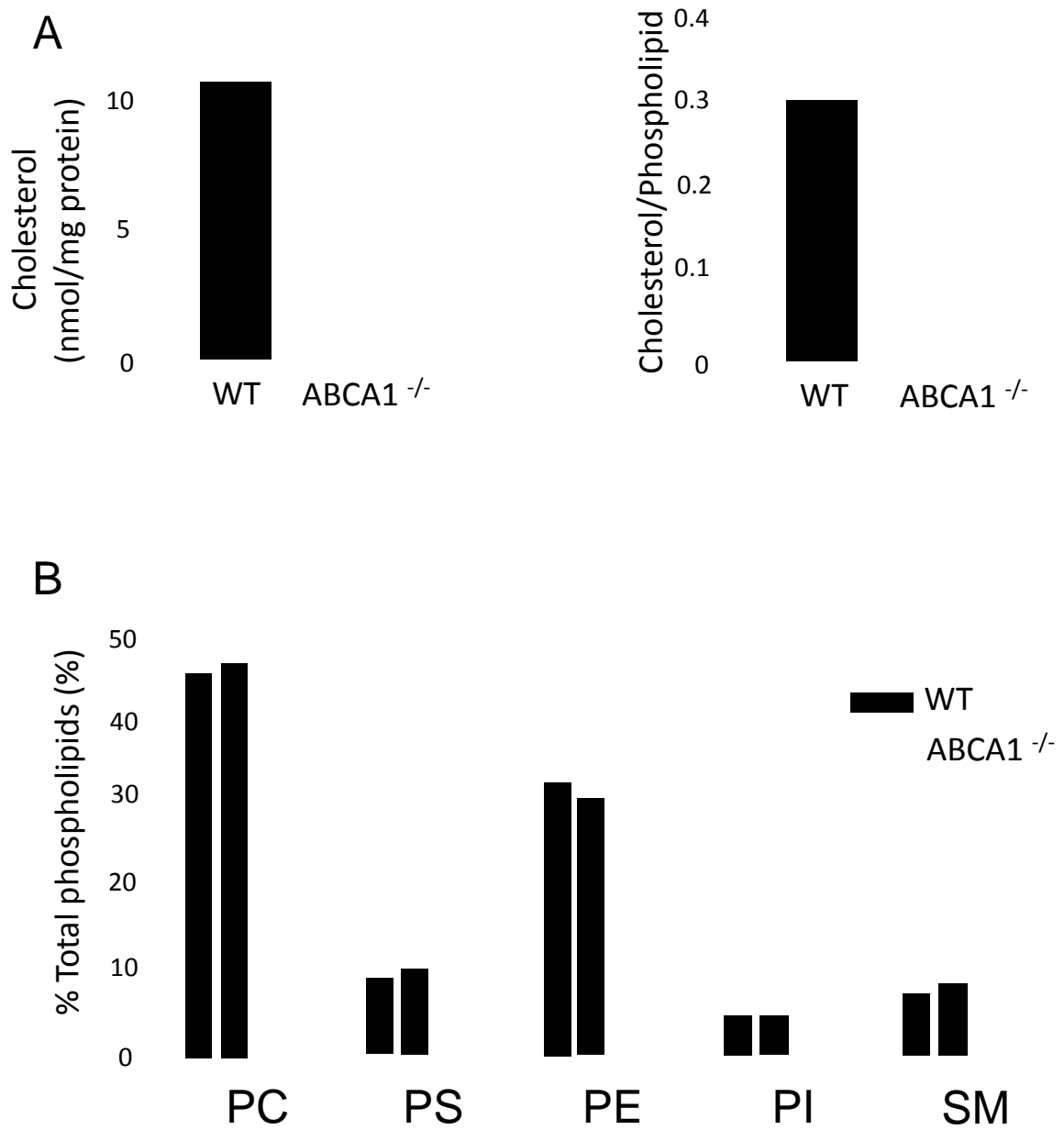


Figure 3 A-B (Lhermusier et al)

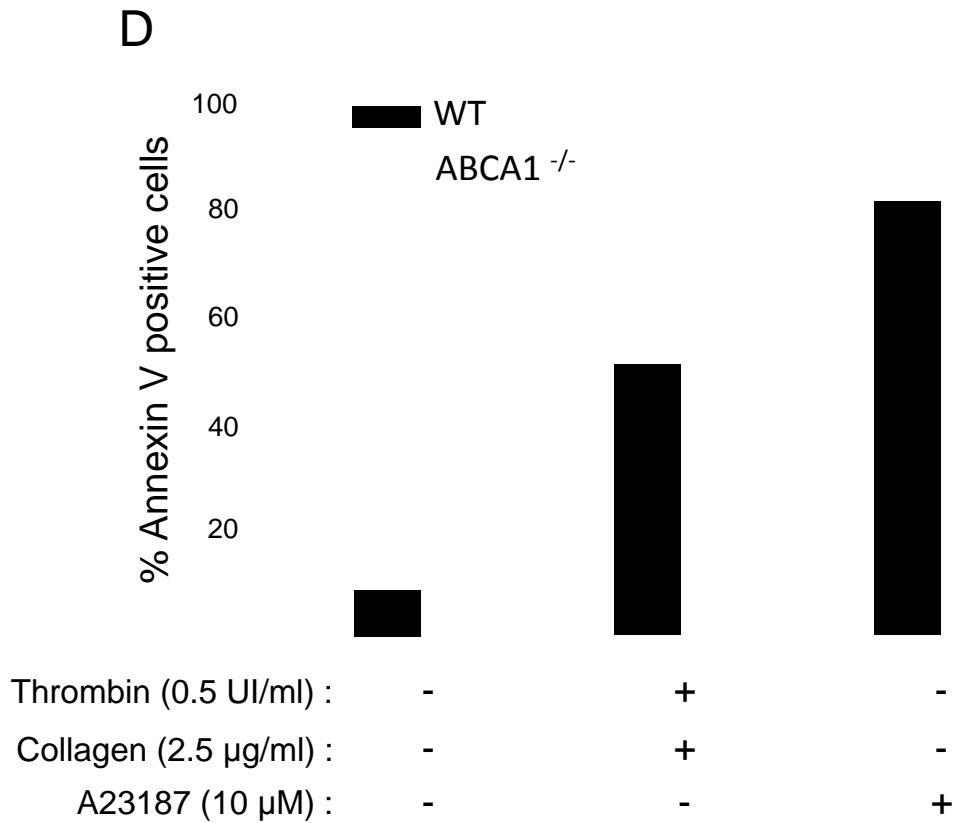
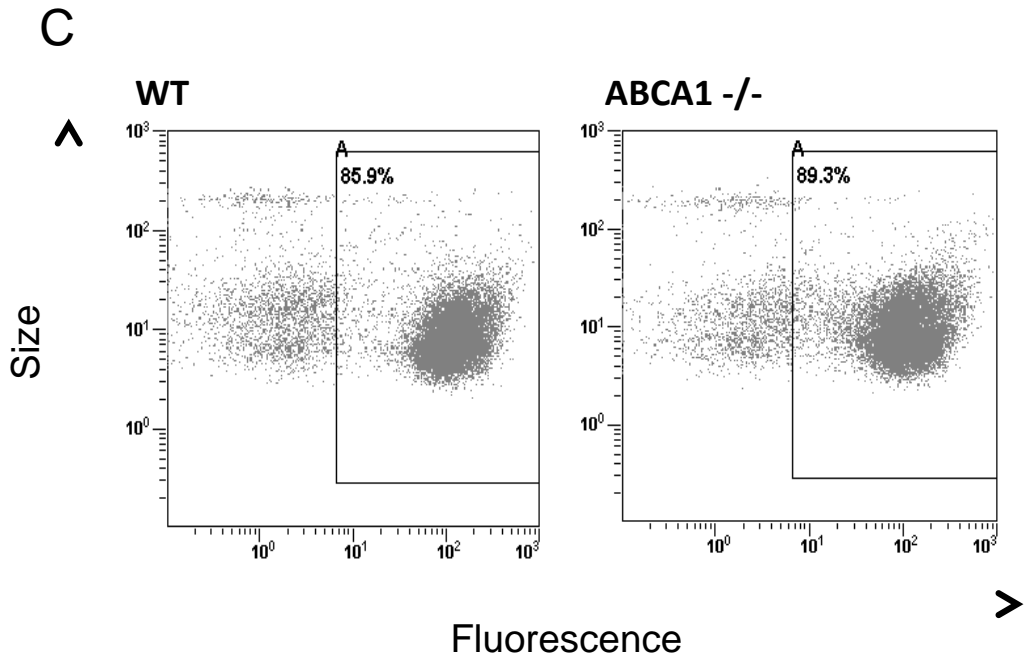


Figure 3 C-D (Lhermusier et al)

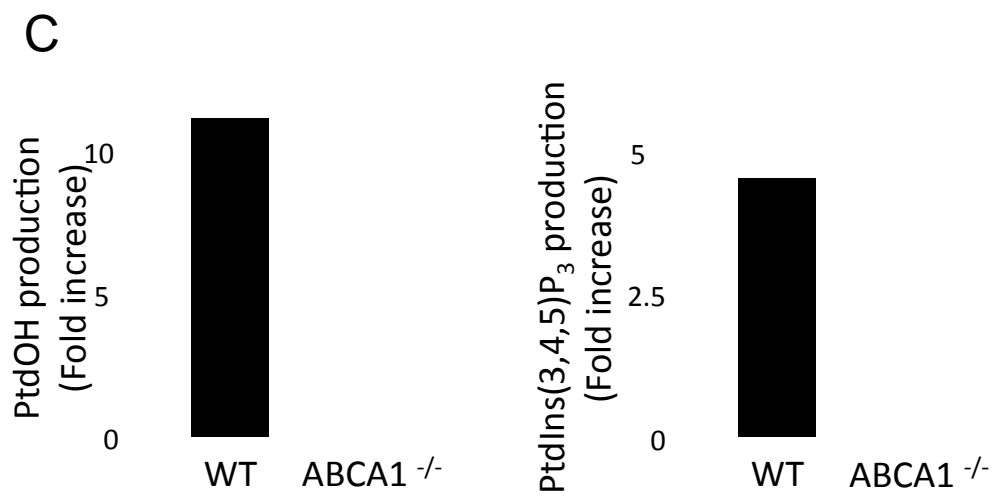
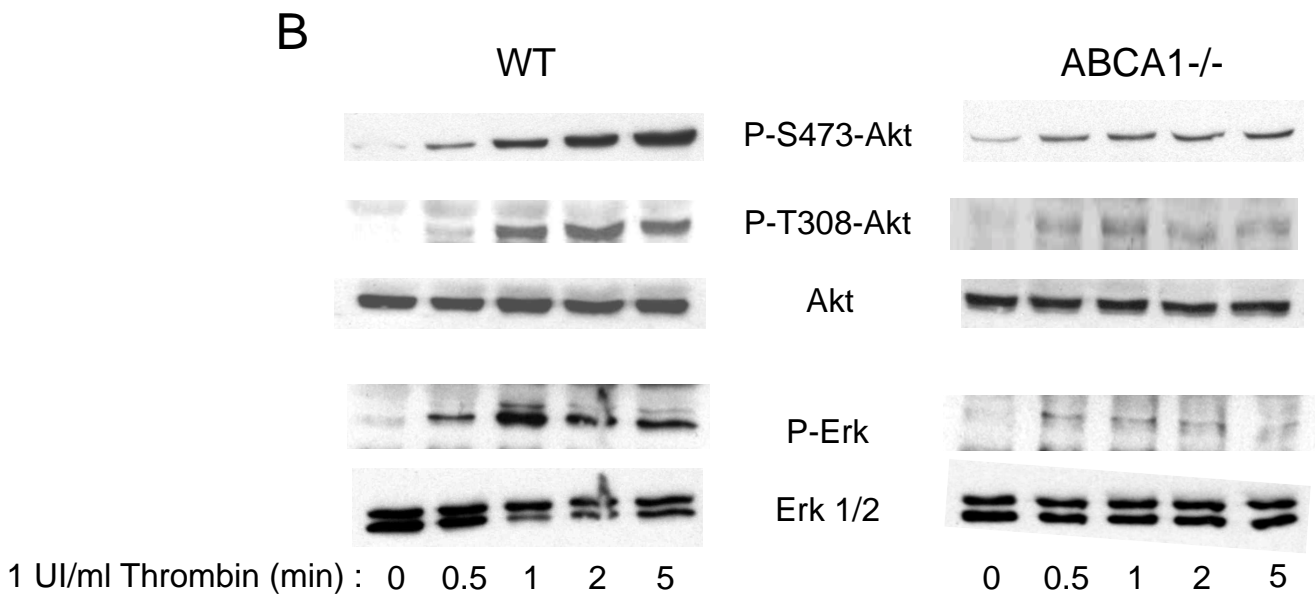
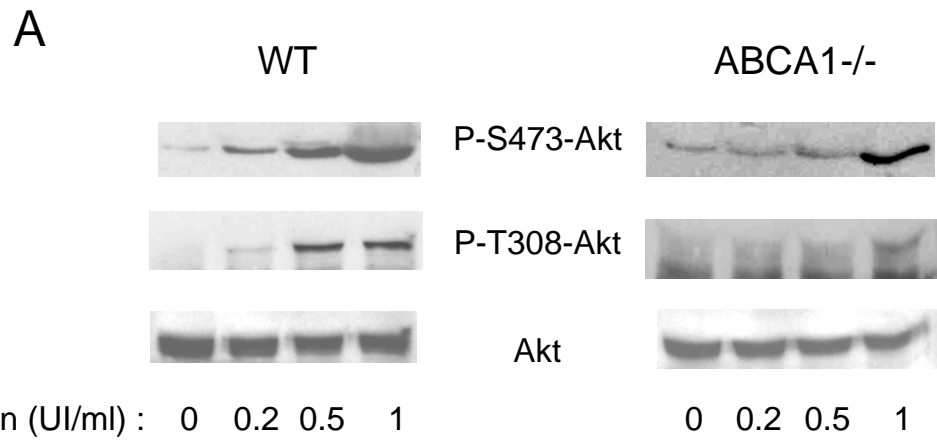
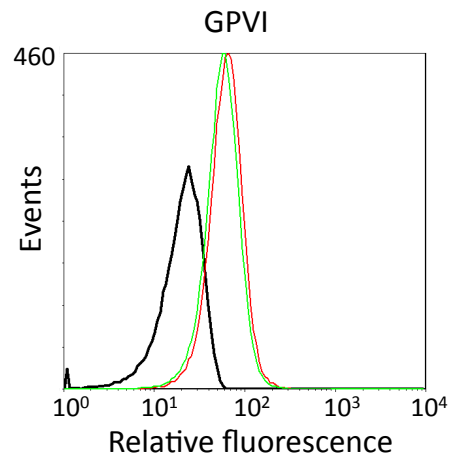
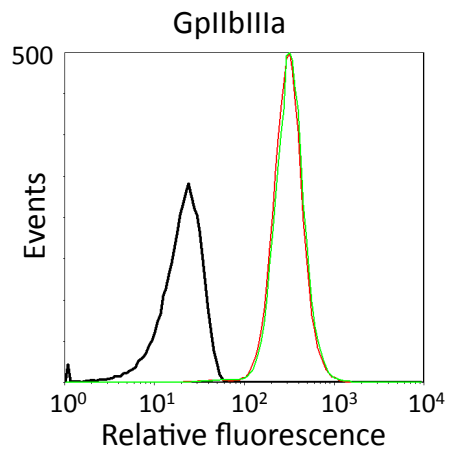


Figure 4 A-C (Lhermusier et al)

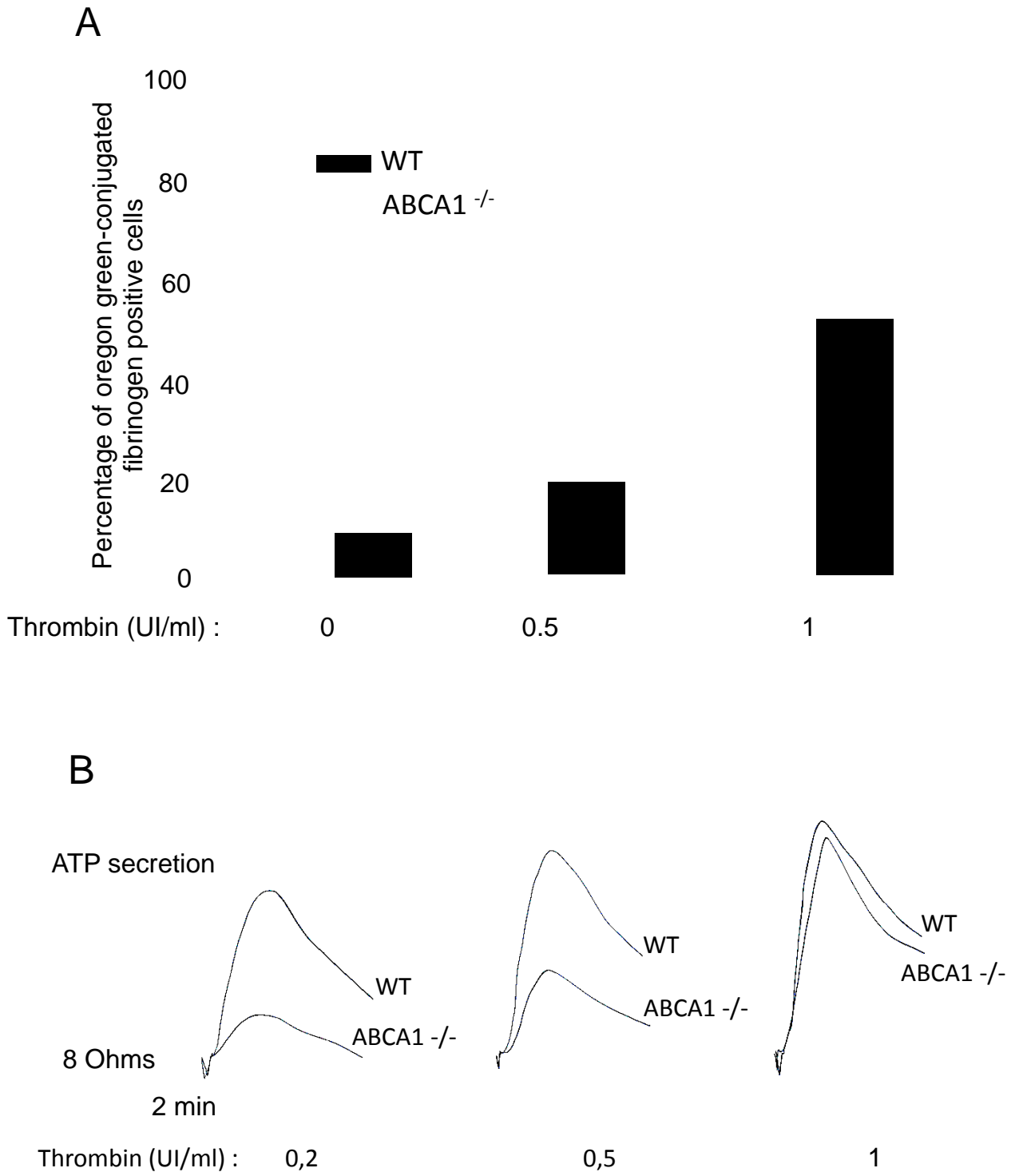




isotypic  
WT  
ABCA1<sup>-/-</sup>



Supplementary Figure 1 (Lhermusier et al.)



Supplementary Figure 2 (Lhermusier et al.)

PE	WT	WT	ABCA1 <sup>-/-</sup>	ABCA1 <sup>-/-</sup>
718,5	<b>2,32</b>	<b>2,42</b>	<b>2,53</b>	<b>2,43</b>
740,5	<b>5,23</b>	<b>6,17</b>	<b>4,92</b>	<b>5,45</b>
744	<b>2,28</b>	<b>2,51</b>	<b>2,07</b>	<b>2,23</b>
746	<b>2,45</b>	<b>2,78</b>	<b>2,61</b>	<b>2,56</b>
750	<b>5,47</b>	<b>5,83</b>	<b>5,05</b>	<b>4,73</b>
764	<b>13,42</b>	<b>14,66</b>	<b>12,67</b>	<b>11,83</b>
766	<b>6,12</b>	<b>6,71</b>	<b>5,83</b>	<b>5,70</b>
768	<b>20,28</b>	<b>19,57</b>	<b>20,32</b>	<b>20,64</b>
778	<b>6,46</b>	<b>5,63</b>	<b>6,28</b>	<b>6,75</b>
790	<b>6,33</b>	<b>6,19</b>	<b>6,20</b>	<b>6,86</b>
792,5	<b>17,92</b>	<b>16,14</b>	<b>18,24</b>	<b>18,31</b>
794	<b>8,09</b>	<b>7,97</b>	<b>8,54</b>	<b>7,92</b>
796,5	<b>2,43</b>	<b>2,34</b>	<b>3,29</b>	<b>3,20</b>
814,5	<b>1,21</b>	<b>1,08</b>	<b>1,45</b>	<b>1,40</b>
PI	WT	WT	ABCA1 <sup>-/-</sup>	ABCA1 <sup>-/-</sup>
883	<b>5,41</b>	<b>3,79</b>	<b>5,33</b>	<b>5,91</b>
885	<b>94,59</b>	<b>96,21</b>	<b>94,67</b>	<b>94,09</b>
PS	WT	WT	ABCA1 <sup>-/-</sup>	ABCA1 <sup>-/-</sup>
760,4	<b>1,87</b>	<b>1,55</b>	<b>2,03</b>	<b>1,76</b>
782,3	<b>2,14</b>	<b>2,22</b>	<b>1,71</b>	<b>2,53</b>
788,5	<b>8,41</b>	<b>8,43</b>	<b>11,12</b>	<b>9,24</b>
790	<b>1,49</b>	<b>1,60</b>	<b>2,44</b>	<b>2,13</b>
806,4	<b>3,32</b>	<b>3,99</b>	<b>2,29</b>	<b>2,20</b>
810,5	<b>44,43</b>	<b>41,66</b>	<b>43,40</b>	<b>45,21</b>
834,4	<b>38,33</b>	<b>40,55</b>	<b>37,01</b>	<b>36,92</b>

Supplementary Figure 3 (Lhermusier et al.)

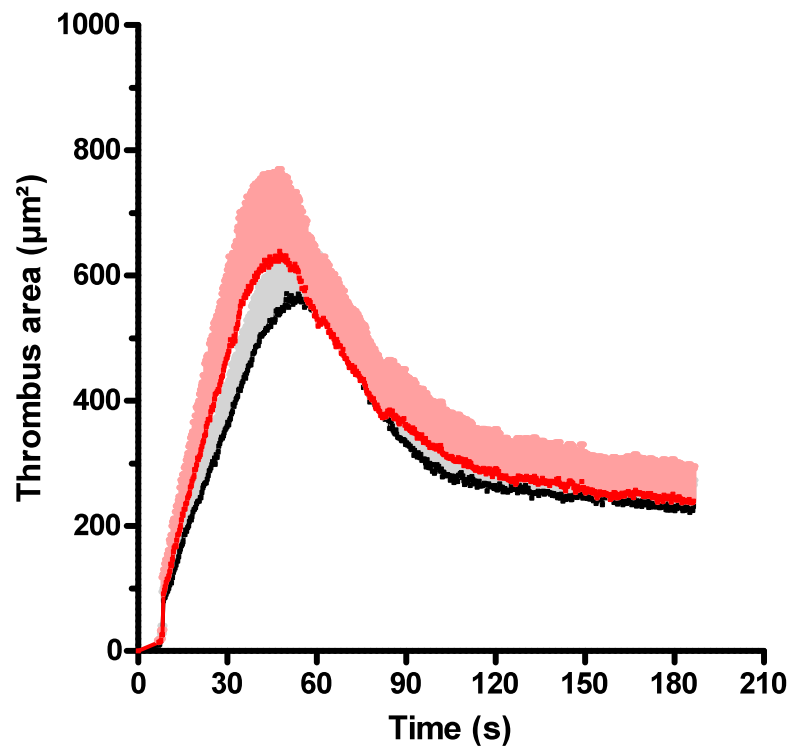
PC	WT	WT	ABCA1 <sup>-/-</sup>	ABCA1 <sup>-/-</sup>
706,6	1,76	1,88	1,58	1,60
732	1,93	1,89	2,50	2,31
734,7	17,29	20,27	13,83	14,42
746,7	3,76	3,72	4,00	3,76
758	3,31	4,02	2,78	2,63
760,7	19,02	17,58	19,11	18,97
762	7,60	7,15	7,38	7,19
768,7	3,32	3,57	3,31	3,37
780	0,17	0,17	0,23	0,18
782,7	10,20	10,04	11,76	12,22
784	4,62	4,42	5,27	5,42
786,7	4,80	4,81	4,36	4,36
788,7	3,80	3,39	3,55	3,75
794,8	2,36	2,30	3,38	3,20
806,7	2,51	2,48	2,62	2,39
808	1,62	1,61	1,83	1,84
810,8	11,93	10,69	12,51	12,42

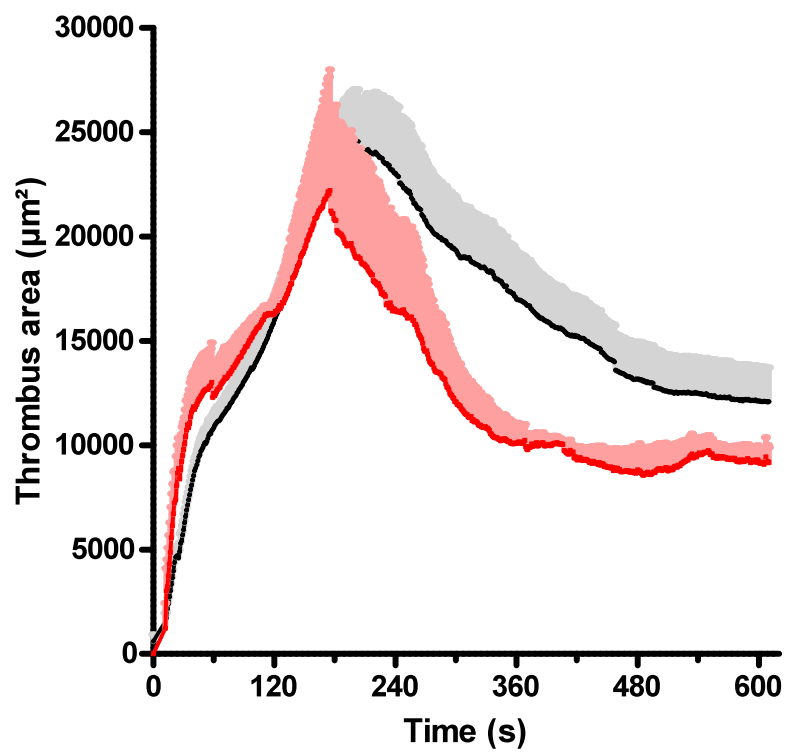
SM	WT	WT	ABCA1 <sup>-/-</sup>	ABCA1 <sup>-/-</sup>
703,7	19,40	17,44	17,52	17,68
705	6,80	6,86	6,78	6,58
731	1,57	1,82	2,04	2,11
734,7	0,00	0,00	0,00	0,00
759,7	0,56	5,57	5,60	5,13
787,8	15,85	16,87	16,37	14,45
813,8	32,75	27,38	29,41	31,21
815	16,11	14,72	15,58	16,12
817	6,96	9,33	6,70	6,71

Supplementary Figure 3 (Lhermusier et al.)

A



B



Supplementary Figure 4 (Lhermusier et al.)

## II. Discussion et perspectives

ABCA1 est un transporteur potentiellement doté de vertus athéroprotectrices à travers sa fonction dans l'homéostasie lipidique (formation du HDL cholestérol) mais probablement aussi en raison de sa capacité à inhiber la synthèse macrophagique de cytokines pro inflammatoires (Liu and Tang, 2011). Nous avons montré que son absence ne s'associait pas à une hyperréactivité plaquettaire mais bien à une hyporéactivité plaquettaire et que le mécanisme ne passe pas par une modification de la composition en lipides majeurs des membranes plaquettaires (cholestérol et phospholipides majeurs). Une étude ancienne avait révélé l'absence d'anomalies de la composition lipidique des membranes plaquettaires (cholestérol, phospholipides) chez un patient atteint de la maladie de Tangier et avait également évoqué une moindre réactivité plaquettaire à la thrombine (Harmon et al., 1986). Ce travail ne permet pas de déterminer si les modifications plaquettaires observées en l'absence du transporteur ABCA1 sont le fait direct de la perte de fonction de ce transporteur ou sont indirectement liées aux anomalies lipidiques plasmatiques associées.

Le modèle de souris déficientes en ABCA1 nous a permis de clarifier le rôle de ce transporteur dans l'hémostase et plus particulièrement l'activation plaquettaire. Nous montrons tout d'abord que l'absence de ce transporteur entraîne un défaut de taille des plaquettes sans affecter le nombre de plaquettes circulantes. Une augmentation d'environ 20% de la taille des plaquettes est observé sans perturbation majeure de leur morphologie globale ni dans le nombre ou la taille des granules. ABCA1, dont l'ARNm est augmenté lors de la différenciation du mégacaryocyte (Schmitz and Schambeck, 2006, Barlage et al., 2006), pourrait donc jouer un rôle dans la morphogénèse des plaquettes. Il serait intéressant d'étudier l'impact d'un déficit en ABCA1 dans la formation des proplaquettes et des plaquettes. Aucune anomalie du nombre de plaquette n'a été observée dans les souris déficientes en ABCA1. Cependant, une thrombopénie est souvent observée chez les patients atteints de la maladie de Tangier et des défauts dans la morphologie des granules et des lysosomes plaquettaires ont été rapportés (Nofer et al., 2004, Orso et al., 2000). Un rôle de ABCA1 dans la morphogénèse des plaquettes est donc envisageable.

Nos résultats permettent d'exclure une implication de ABCA1 dans le phénomène de « scrambling » des phospholipides et de l'exposition des PS dépendante du calcium. Grâce au modèle de plaquettes de souris déficientes en ABCA1, la réponse à cette question, débattue à plusieurs reprises dans la littérature, nous semble claire. Ce résultat est en accord avec

l'identification récente de la protéine TMEM16F comme acteur majeur de l'exposition des PS dépendante du calcium (Suzuki et al., 2010). Cette protéine, mutée chez les patients atteints du syndrome de Scott, joue sans aucun doute un rôle majeur dans la machinerie conduisant à l'exposition des PS dépendante du calcium dans les plaquettes.

L'exposition des PS est souvent associée à l'émission des microparticules et ABCA1 a été proposé comme régulateur potentiel de la production de microparticules (Combes et al., 2005). Nous avons réalisé des expériences préliminaires pour évaluer son impact dans la production des microparticules plaquettaires en réponse à une stimulation par le ionophore calcique A23187. La formation de microparticules de plaquettes de souris sauvages et déficientes pour ABCA1 a été mesurée en cytométrie de flux. Nous avons rencontré certains problèmes techniques liés au fait que les microparticules de plaquettes murines sont apparues plus difficiles à isoler que celles de plaquettes humaines. Cependant, les résultats préliminaires obtenus suggèrent que l'absence de ABCA1 n'empêche pas la formation de microparticules plaquettaires induite par le ionophore calcique A23187 (résultat non montré).

L'ensemble de nos résultats indique que ABCA1 n'intervient pas de façon majeure dans le contrôle de la composition lipidique des plaquettes et dans la réorganisation des membranes dépendante du calcium. Par contre, nous observons un défaut significatif d'activation de certaines voies de signalisation intraplaquettaire. En particulier, les voies Akt et Erk sont nettement moins efficacement activées en l'absence de ABCA1 lors d'une stimulation par la thrombine, notamment à faible dose. L'impact de ABCA1 sur les voies de signalisation n'est pas global puisque l'activation de la PLC et de la PI3K sont normales dans les plaquettes déficientes en ABCA1. Il semble donc que ABCA1 favorise spécifiquement l'activation de certains éléments de la signalisation. Une perspective importante à cette observation est de comprendre comment ce transporteur peut agir pour moduler ces voies de signalisation. Nous avons exclu un effet indirect par modulation du taux de cholestérol membranaire ce qui modifierait l'activation des voies dépendantes des rafts. Nous envisageons un rôle plus direct sur l'assemblage des complexes de signalisation. De façon intéressante, il a été proposé que ABCA1 pourrait jouer un rôle de récepteur à l'apoA1 et transmettre un signal intracellulaire par activation de la GTPase Cdc42 et de la kinase JAK2 (Nofer et al., 2006, Liu and Tang, 2011). Il existe encore peu de données concernant les mécanismes de transmission du signal par ABCA1 mais une interaction directe du transporteur avec la GTPase Cdc42 a été décrit (Nofer et al., 2006). Il serait intéressant d'étudier l'impact de ABCA1 sur l'activation de Cdc42 et Rac dans les plaquettes et de rechercher comment ABCA1 contribue à l'efficacité d'activation d'Akt et de Erk sans

modifier l'activation de régulateurs d'amont tels que PI3K et PLC. Dans ce contexte, la recherche de partenaires protéiques de ABCA1 dans des plaquettes au repos ou stimulées pourrait apporter des données importantes.

Cependant, le rôle de ABCA1 est surtout révélé lorsque les plaquettes sont stimulées par de faibles doses d'agonistes. Ainsi, ABCA1 contribue à l'efficacité d'activation de certaines voies de signalisation mais son rôle n'est pas indispensable. En effet, lorsque les plaquettes sont stimulées par de fortes doses d'agonistes, elles répondent normalement en terme de sécrétion et d'agrégation, même si l'activation d'Akt et de Erk reste plus faible que dans les plaquettes de souris sauvages.

La question de l'importance de ABCA1 dans l'activation plaquettaire en conditions physiologiques se posait donc. Nous avons d'abord réalisé des expériences de formation de thrombus *in vitro* en perfusant du sang total sur une matrice de collagène en condition de flux artériel physiologique ( $1500 \text{ s}^{-1}$ ) et en suivant la formation des thrombi en vidéo microscopie ultrarapide. Nous avons été confrontés à une grande hétérogénéité des résultats obtenus avec les souris contrôles de fond génétique DBA1/*LacJ* ce qui n'a pas permis d'exploiter les données de manière satisfaisante. Nous avons alors réalisé en collaboration avec le Dr. B. Hechler du laboratoire dirigé par le Dr C. Gachet (Inserm UMR-S949, Strasbourg) des expériences de lésion vasculaire des artérioles mésentériques à l'aide d'un laser et de suivi de la formation du thrombus plaquettaire en microscopie intravitale (Hechler et al., 2010). L'absence de ABCA1 n'a pas eu d'impact sur la formation du thrombus suite à une lésion superficielle. Lors d'une lésion profonde, mettant en jeu la coagulation et donc la production de thrombine, le thrombus formé était semblable mais sa disparition est apparue plus rapide chez les souris ABCA1<sup>-/-</sup>. Cela pourrait être dû à une moindre production de thrombine liée à la baisse de vitamine K1 et à l'allongement du temps de prothrombine observé chez ces souris et/ou à l'activation plus modérée des plaquettes qui se détacheraient plus vite du thrombus. Ces résultats montrent que malgré un allongement du temps de saignement et les défauts d'activation plaquettaires observés en plaquettes lavées *in vitro*, les souris ABCA1<sup>-/-</sup> sont capables de répondre correctement en terme de formation d'un thrombus plaquettaire suite à une agression vasculaire localisée. Ce mode d'activation plaquettaire met en jeu plusieurs récepteurs et correspond à une forte activation qui peut s'opérer en l'absence d'ABCA1. De plus, la diminution des HDL chez les souris ABCA1<sup>-/-</sup> pourrait en fait compenser le défaut d'activation plaquettaire observé en l'absence d'ABCA1. En effet, la corrélation inverse entre taux de HDL cholestérol et événements cardiovasculaires est connue de longue date (Miller and Miller, 1975) et une des explications proposées pourrait être une diminution des



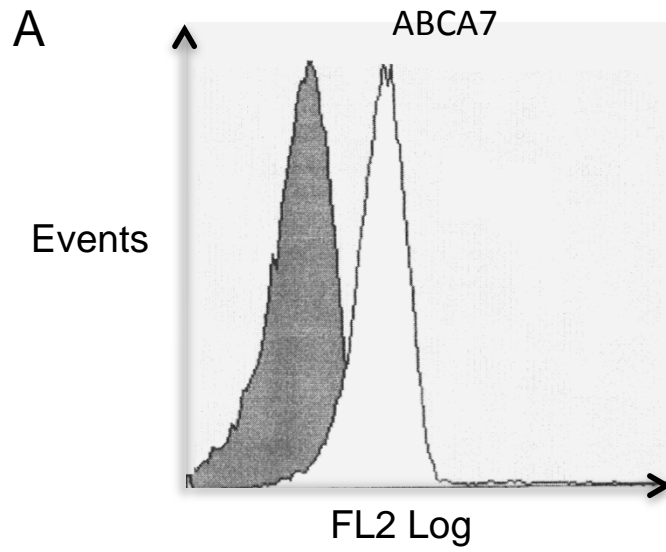
phénomènes thrombotiques chez les patients ayant des taux élevés de HDL cholestérol (Naqvi et al., 1999). Les HDL auraient une activité inhibitrice sur les plaquettes, sans que le mécanisme ne soit encore très bien connu. Il serait donc intéressant d'étudier comment les HDL modulent l'activation plaquettaire, notamment dans le contexte de l'arrivée en clinique des HDL recombinants qui semblent avoir un effet athéroprotecteur significatif (modification de la composition des plaques, restauration de la fonction endothéliale) (Shaw et al., 2008, Tardif et al., 2007). L'équipe de Jackson a récemment démontré que les HDL reconstitués entraînent chez l'homme une diminution de la réactivité plaquettaire associée à une diminution du contenu en cholestérol des membranes plaquettaires et à un défaut de formation des microdomaines lipidiques (Calkin et al., 2009). Nos résultats ne montrent pas de modification du contenu en cholestérol dans les plaquettes de souris ABCA1<sup>-/-</sup> malgré la forte diminution de HDL naturels. Grâce à une collaboration avec la société Cerenis Therapeutics SA, nous disposerons de lipoprotéines HDL au CHU de Toulouse Rangueil dans le cadre d'un essai clinique de phase III dans le courant de l'année 2012. Nous pourrons alors analyser leur impact sur les plaquettes aussi bien in vitro qu'in vivo. Ceci nous permettra de déterminer les voies de signalisation plaquettaires modulées lors de la perfusion de HDL reconstitués et de comparer ses résultats à la perte de fonction du transporteur ABCA1 mais aussi de restaurer le taux de HDL dans les souris ABCA1<sup>-/-</sup>.

Enfin, il est intéressant de noter que les effets que nous avons observés sont spécifiques de ABCA1. En effet, nous avons pu observer que l'inactivation d'un autre membre de la famille ABCA, ABCA7, qui est fortement exprimé dans les plaquettes et présente une grande homologie structurale avec ABCA1 (Sasaki et al., 2003) n'a pas d'impact sur l'hémostase primaire ni sur l'activation des plaquettes lavées (Figure annexe de l'article 1). Le rôle de ABCA7 reste mal caractérisé. In vitro, ce transporteur est capable d'interagir avec l'ApoA-I et d'assurer le transport de phospholipides vers l'apolipoprotéine de la même façon que ABCA1 (Wang et al., 2003). Cependant, les souris présentant un transporteur ABCA7 non fonctionnel n'ont pas de phénotype apparent et ne présentent aucune anomalie significative de leur profil lipidique plasmatique (Kim et al., 2005). Nous avons eu l'opportunité de réaliser quelques expériences sur les souris ABCA1<sup>-/-</sup> ABCA7<sup>-/-</sup> et nous n'avons pas observé de phénotype plus marqué que ceux observés chez les souris ABCA1<sup>-/-</sup> (résultats non montrés). Bien qu'ABCA7 ait été montré exprimé dans les plaquettes de rat et humaines il ne semble pas avoir un rôle aussi important que ABCA1 qui lui est faiblement exprimé dans les plaquettes (Sasaki et al., 2003, Niessen et al., 2010).

Au total, notre étude met en avant un rôle de ABCA1 dans l'efficacité de transmission de certains signaux intraplaquettaires et exclu son implication dans l'exposition des PS et dans la régulation de la composition plaquettaire en cholestérol et phospholipides majeurs. Cependant, les effets plaquettaires indirectement liés aux anomalies lipidiques plasmatiques associées au déficit en ABCA1 restent à étudier de manière plus précise. Il serait notamment intéressant d'évaluer le seul impact d'une absence de HDL et de transport reverse du cholestérol sur la différenciation des mégacaryocytes et sur la fonction plaquettaire in vivo. Ces effets indirects sur les plaquettes pourraient-ils contrecarrer in vivo une hyporéactivité plaquettaire comme observé en absence d'ABCA1 ? Ces travaux permettraient une meilleure compréhension des dysfonctionnements de l'hémostase associés aux dyslipoprotéïnémies.

### **Légende figure annexe de l'article 1 :**

Expression et rôle de ABCA7 dans les plaquettes murines. A : Analyse de l'expression de surface de ABCA1 dans les plaquettes de souris par cytométrie de flux. La courbe grisée correspond au signal d'un anticorps isotypique alors que la courbe blanche correspond au signal obtenu avec un anticorps anti-ABCA7 spécifique. Les résultats montrés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. B : Temps de saignement à la queue mesuré comme décrit dans l'article sur ABCA1. Aucune différence significative n'a pu être observée entre les souris sauvages et les souris déficientes en ABCA7. C : Analyse de l'agrégation des plaquettes lavées en réponse à la thrombine et au collagène. Aucune différence dans l'agrégation des plaquettes sauvages et déficientes en ABCA7 n'a pu être observée au cours de 3 expériences indépendantes.



**B**

Souris	Temps de saignement
Sauvages (n=10)	3,3 min +/- 1,8 min
ABCA7 <sup>-/-</sup> (n=8)	4,02 min +/- 2,1 min

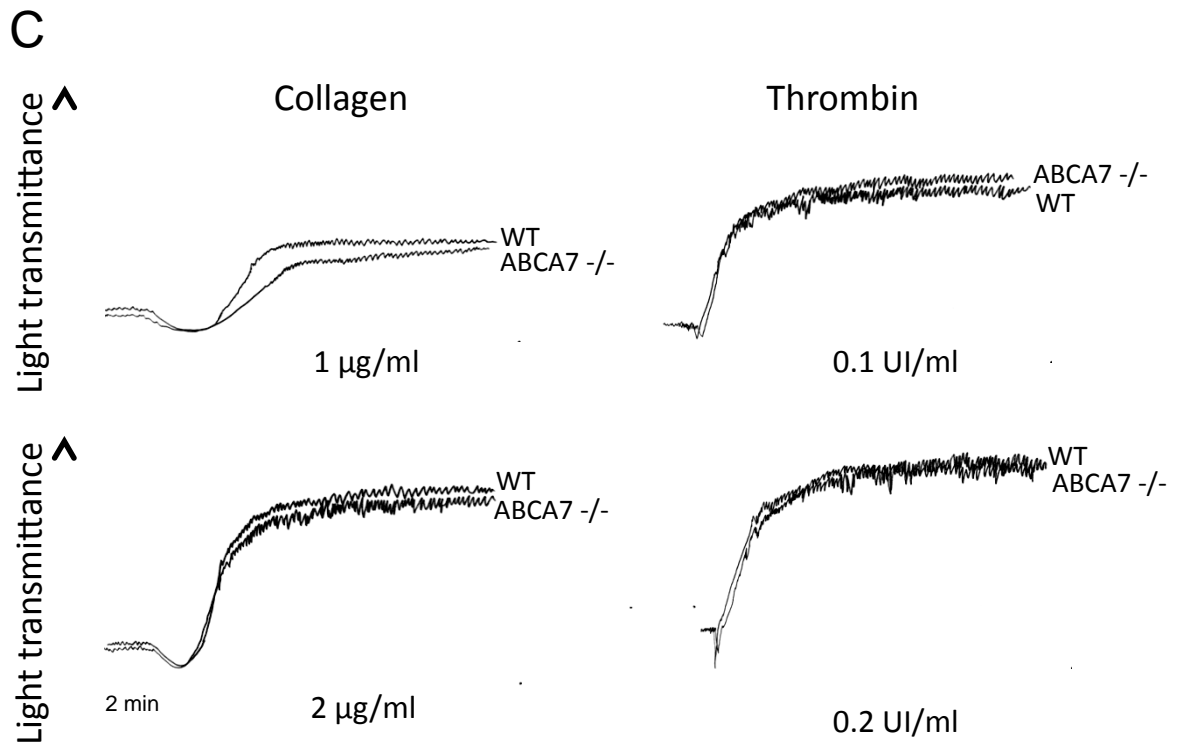


Figure annexe de l'article 1

## **ARTICLE 2**

### **The Syk-kinase inhibitor R406 impairs platelet activation and monocyte tissue factor expression triggered by heparin-PF4 complex directed antibodies**

Thibault Lhermusier, Jerome Van Rottem, Cédric Garcia , Jean Marie Xuereb, Ashraf Ragab, Valérie Martin, Marie-Pierre Gratacap, and Bernard Payrastre

J Thromb Haemost. 2011 Oct;9(10):2067-76.

## I. Introduction

Malgré l'utilisation de plus en plus large des héparines de bas poids moléculaire et l'arrivée récente de nouveaux antithrombotiques inhibiteurs de la thrombine (comme le dabigatran) ou du facteur Xa (comme le rivaroxaban ou l'apixaban), les héparines non fractionnées demeurent le traitement de référence dans un grand nombre de situations à risque de thrombose. Leur utilisation s'associe paradoxalement à un risque faible mais grave de survenue d'une TIH. Les voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire lors d'une TIH sont particulièrement dépendantes de l'activation de tyrosine kinases, laissant suggérer un impact potentiel de thérapies ciblant ces kinases.

A travers l'exemple du dasatinib (BMS-354825 ou Spryce®), inhibiteur de la tyrosine kinase BCR-ABL proposé dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique, notre équipe avait déjà mis en évidence les effets plaquettaires d'une telle thérapie ciblée. Cette molécule, capable d'inhiber certaines formes mutées de l'oncogène BCR-ABL résistantes à l'imatinib, inhibe également d'autres tyrosines kinases (PDGFR, c-Kit et les kinases de la famille Src). En ciblant les kinases Src, elle induit une inhibition des réponses plaquettaires au collagène *ex vivo* et affecte l'hémostase *in vivo* de façon réversible (Gratacap et al., 2009). On voit à travers cet exemple l'impact que peut avoir un inhibiteur ciblé sur la fonction plaquettaire, à l'origine d'effets indésirables hémorragiques. Par contre, on peut penser que les propriétés antiagrégantes de tels inhibiteurs pourraient être exploitées. En effet, il s'agit de molécules dont l'effet antiagrégant est rapide et surtout réversible. De plus, dans le cas particulier des TIH, il n'existe aucun traitement spécifique disponible. Les seuls médicaments disponibles, s'ils constituent le relais indispensable d'une héparinothérapie désormais contre-indiquée, ne permettent pas de contrôler l'hyperactivation plaquettaire induite par le phénomène immunoallergique.

Au cours des TIH, la tyrosine kinase Syk est impliquée dans l'activation des plaquettes via FcγRIIIa et on peut imaginer qu'elle joue également un rôle important dans l'activation des monocytes dont l'expression de facteur tissulaire contribue à la genèse de phénomènes thrombotiques observés au cours des TIH.

Syk est en effet une kinase majeure dans l'activation des cellules immunitaires. Elle est également fortement impliquée dans les hémopathies B. Ainsi, elle a suscité beaucoup d'intérêt de la part des industriels du médicament qui ont développé des inhibiteurs ciblant cette kinase de façon spécifique.

Nous avons voulu vérifier la capacité du R406, l'un des premiers inhibiteurs de Syk à avoir été proposé en essai thérapeutique de phase III dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, à inhiber l'activation plaquettaire comme monocyttaire survenant au cours d'une TIH.

Les objectifs spécifiques de cette étude ont été les suivants : i) déterminer la sensibilité relative des réponse plaquettaires à l'inhibition de Syk suite à une activation via Fc $\gamma$ RIIa, GPVI et PAR1/4, ii) montrer l'impact du R406 sur les voies de signalisation plaquettaires activées par regroupement du récepteur Fc $\gamma$ RIIa et par le sérum de patients atteints de TIH en présence d'héparine, iii) évaluer l'hétérogénéité interindividuelle des réponses au R406, iv) étudier l'impact du R406 sur l'expression du facteur tissulaire par les monocytes humains (ARNm et protéine) en présence de complexes immuns isolés de sérum de patients atteints de TIH et mesurer son efficacité sur l'activité procoagulante des monocytes.

## ORIGINAL ARTICLE

# The Syk-kinase inhibitor R406 impairs platelet activation and monocyte tissue factor expression triggered by heparin-PF4 complex directed antibodies

T. LHERMUSIER,\* J. VAN ROTTEM,\* C. GARCIA,† J.-M. XUEREB,\* A. RAGAB,\* V. MARTIN,\* M.-P. GRATACAP,\* P. SIÉ\*†<sup>1</sup> and B. PAYRASTRE\*†<sup>1</sup>

\*Inserm, U1048 and Université Toulouse 3, I2MC, 31432 Toulouse Cedex 04; and †CHU de Toulouse, Laboratoire d'Hématologie, 31059 Toulouse Cedex 04, France

**To cite this article:** Lhermusier T, van Rottem J, Garcia C, Xuereb JM, Ragab A, Martin V, Gratacap MP, Sié P, Payrastre B. The Syk-kinase inhibitor R406 impairs platelet activation and monocyte tissue factor expression triggered by heparin-PF4 complex directed antibodies. *J Thromb Haemost* 2011; **9**: 2067–76.

**Summary.** *Background:* Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is a rare but severe complication of heparin therapy in which immunoglobulin G (IgG) antibodies against the platelet factor 4–heparin complex activate platelets through the FcγRIIA receptor. Clustering of FcγRIIA initiates signaling cascades involving tyrosine kinases including the spleen tyrosine kinase (Syk). Moreover, besides the critical role of platelets, the expression of tissue factor (TF) by human monocytes triggered by HIT antibodies has been shown to contribute to the hypercoagulability and the thrombotic complications in HIT patients. *Objectives:* We investigated the effect of R406, a small molecule inhibitor of Syk developed as a potential treatment of autoimmune diseases, allergic disorders and B-cell related hematological malignancies, on FcγRIIA-mediated platelet activation. To further assess the potential activity of Syk inhibitors in HIT treatment, the effect of R406 was also evaluated on HIT antibodies-induced expression of TF and procoagulant activity of monocytic cells. *Results:* We show that R406 is a potent inhibitor of platelet signaling and functions initiated by FcγRIIA cross-linking by specific antibodies or by sera from HIT patients. Syk inhibition efficiently prevents FcγRIIA-induced LAT phosphorylation and activation of phosphoinositide 3-kinase, Akt, phospholipase Cγ2 and p38 MAP-kinase. As a consequence, FcγRIIA-induced platelet aggregation, granule secretion and microparticles production are strongly inhibited by R406. Moreover, the Syk inhibitor efficiently impairs the expression of TF and the procoagulant

activity of human monocytes triggered by HIT antibodies. *Conclusion:* Syk inhibitors may be of therapeutic interest in the treatment of HIT by reducing HIT antibodies-mediated platelet activation and monocyte procoagulant activity.

## Introduction

Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is an important side effect of heparin therapy with a high risk of life-threatening thrombosis [1–4]. Immunoglobulin G (IgG) antibodies against the platelet factor 4 (PF4)–heparin complex are known to activate platelets through the FcγRIIA receptor leading to their aggregation, the expression of a procoagulant surface [5] and the production of platelet microparticles [6]. Several factors influence the severity of HIT including the expression by HIT immune complex triggered monocytes of the transmembrane protein tissue factor (TF) [7–9], the initiator of the coagulation cascade and the immune stimulation of endothelial cells [10].

The importance of the platelet FcγRIIA in the pathogenesis of HIT is well established [11]. FcγRIIA is a member of the immunoglobulin gene superfamily and is composed of two extracellular Ig homology domains and a cytoplasmic tail bearing an immunotyrosine-based activation motif (ITAM) which becomes tyrosine phosphorylated by Src family kinases (SFKs) upon receptor clustering. The tyrosine phosphorylation of the ITAM of FcγRIIA by SFKs is a critical step in FcγRIIA-dependent platelet activation [12]. After phosphorylation of its ITAM, FcγRIIA activates downstream signaling cascades implicating different tyrosine kinases including the spleen tyrosine kinase (Syk) [13,14]. Syk is a non-receptor tyrosine kinase highly expressed in hematopoietic cells. It plays an important role in platelet activation via ITAM signaling [15–19]. The two SH2 domains in the N-terminal part of the kinase are known to bind to phosphorylated ITAM leading to conformational change and in turn activation of the kinase domain and autophosphorylation which sustain the activation [20]. Autophosphorylated Syk interacts with partners and substrates including adaptor molecules such as LAT and

Correspondence: Bernard Payrastre or Pierre Sié, Inserm U1048, I2MC 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 04, France.

Tel.: +33 5 62 74 45 25; fax: +33 5 62 74 45 58.

E-mails: bernard.payrastre@inserm.fr, sie.p@chu-toulouse.fr

<sup>1</sup>P.S. and B.P. contributed equally to this study.

Received 1 April 2011, accepted 10 August 2011



SLP76 and activates enzymes like the guanine nucleotide exchange factor Vav, phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) or class IA phosphoinositide 3-kinase (PI3K) [20]. Genetic and pharmacological approaches have demonstrated the important role of Syk in platelet activation by specific receptors. GPVI, a major collagen receptor associated with the ITAM containing Fc $\gamma$ -chain, signals through Syk [17,18] as well as the C-type lectin CLEC2 which has an hemITAM interacting with the SH2 domains of Syk upon dimerization [21]. Accordingly, Syk-deficient murine platelets aggregate in response to thrombin but have a strong defect in response to collagen [18]. Moreover, in human platelets,  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 integrin outside-in signaling has also been shown to implicate Syk by a mechanism that remains incompletely understood, but appears to require Fc $\gamma$ RIIA [22–24].

Besides platelet activation by Fc $\gamma$ RIIA, the expression of active TF by monocytes triggered by PF4-heparin antibodies also contributes to HIT pathophysiology [7,8]. The two members of the Syk family (Syk and its homologue ZAP70, mainly expressed in T cells and natural killer cells) associate with Fc $\gamma$ R in various immune cells and play an important role in the regulation of protein expression and in cytoskeleton/membrane rearrangement involved in phagocytosis in cells of the monocyte-macrophage lineage. Syk is also involved downstream of the B cell receptor and has in fact diverse roles in the immune system [20]. Many reports have demonstrated the central role of Syk in allergic or autoimmune disease, inflammation and B cell-related hematological malignancies [20]. In this context, several small molecule selective inhibitors of this kinase have been developed and some are under clinical trials in patients with rheumatoid arthritis, autoimmune thrombocytopenic purpura [25], B-cell lymphomas, allergic rhinitis and asthma [20,26]. Fostamatinib (R788), the prodrug of the active metabolite R406, is one of the recently developed ATP-competitive inhibitor of Syk [27].

Recently, another Syk inhibitor, PRT-060318, has been shown to prevent thrombocytopenia and thrombosis in a mouse model of HIT [28] suggesting that inhibition of this tyrosine kinase may be a potential strategy to treat human HIT. The effect of PRT-060318 was, however, not tested on platelet phosphorylation pathways nor on monocytes.

The aim of the present study was to evaluate the impact of Syk inhibition on HIT antibodies-mediated platelet activation and signaling and monocyte procoagulant activity. We found that Syk inhibition by R406, at clinically relevant doses, prevents IV.3 and HIT sera-induced human platelet signal transduction and functions, including microparticle production as well as antibody-mediated expression of functional TF in human monocytes.

## Experimental procedures

### Reagents

The mouse monoclonal anti-phosphotyrosine (clone 4G10) was from Millipore (Saint Quentin en Yvelines, France), the

anti-phospho-LAT (Y191), the anti-phospho-PLC $\gamma$ 2 (Y753), the anti-phospho-Akt (S473), the anti-phospho-p38MAPK (T180/Y182), the anti-PLC $\gamma$ 2 and the peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The anti-Fc $\gamma$ RIIA monoclonal antibody IV.3 was from Medarex (Annandale, NJ, USA) and the anti-mouse IgG F(ab')<sub>2</sub> to cross-link Fc $\gamma$ RIIA-IV.3 complexes was from Jackson ImmunoResearch Laboratories. RPMI was from Gibco (Paisley, UK), fetal bovine serum (FBS) from Invitrogen (Eugene, OR, USA), streptomycin from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany), L-Glutamine from ICN Biomedicals (Irvine, Ayrshire, Scotland) and HEPES from Eurobio (Courtaboeuf, France). Horm collagen from equine tendon was from Nycomed (Konstanz, Germany). Purified factors (F)VII and FX were purchased from Biophen (Mauguio, France), human platelet factor 4 was from Hyphen BioMed (Neuville sur Oise, France) and the FX-chromogenic substrate (CS1165) was from Biophen. All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France) unless otherwise indicated. R406 was a gift from Drs E. S. Masude and S. Yi (Rigel Pharmaceuticals, Inc.<sup>®</sup>, South San Francisco, CA, USA).

### Human blood samples

Samples were obtained from healthy donors after informed consent, or patients diagnosed at the Haematology laboratory. The institutional review board of the hospital approved the study.

### HIT sera and purified IgG fractions

HIT was identified in patients according to standard criteria (Table 1): medium or high 4Ts clinical score [29], presence of anti-PF4-heparin antibodies (Asserachrom<sup>®</sup> HPIA; Diagnostica Stago, Asnières, France) and a positive platelet aggregation test in the presence of 0.5 U mL<sup>-1</sup> heparin, but not 100 U mL<sup>-1</sup> which induces the loss of antibody binding through disruption of the optimal ratio of the antigen complex between PF4 and heparin. Sera were stored at -80 °C until use. Alternatively, the IgG fraction of two HIT patients was precipitated with ammonium sulfate and purified by batch affinity using a protein-G-sepharose 4 fast flow (Ge Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Antibody purity was assessed using SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Each IgG fraction was tested for the presence of anti-PF4/heparin antibodies and a positive aggregation test in the presence of heparin.

### Preparation and activation of human platelets

Blood was collected into ACD (acid-citrate-dextrose) and platelets were isolated as described previously [30]. Briefly, they were washed in a buffer (pH 6.5) containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM

**Table 1** Characteristics of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) patients

	Age (years)	Gender	HIPA	4Ts score*	Platelet aggregation test (heparin 0.5 U mL <sup>-1</sup> )	Platelet counts (g L <sup>-1</sup> ) <sup>†</sup>	Thrombotic events
P#1	74	M	+	4	+	70 (37)	Proximal deep vein thrombosis
P#2	84	M	+	5	+	100 (99)	Distal deep vein thrombosis
P#3	66	M	+	7	+	124 (96)	Pulmonary embolism
P#4	42	M	+	4	+	330 (25)	None
P#5	50	M	+	7	+	80 (80)	None
P#6	71	M	+	6	+	51 (51)	None

HIPA: heparin-induced platelet antibody. \*The 4Ts score was determined as described by Lo *et al.* [29]. <sup>†</sup>Platelet counts at the moment of sampling and nadir (between brackets).

HEPES, 5 mM glucose and 0.35% bovine serum albumin (BSA) (w/v). The same buffer containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> was added to the final suspension, and pH was adjusted to 7.4. Before stimulation, platelets were preincubated or not for 5 min with indicated concentrations of R406 or vehicle (dimethylsulfoxide).

Cross-linking of FcγRIIA was performed by pre-incubation of platelets for 1 min with the monoclonal antibody IV.3 (mab) (2 μg mL<sup>-1</sup>) followed by the addition of antimouse IgG F(ab')<sub>2</sub> (30 μg mL<sup>-1</sup>) at 37 °C under gentle shaking as described previously [30,31]. For activation of platelets by HIT sera, 180 μL of platelet suspension (5 × 10<sup>8</sup> platelets mL<sup>-1</sup>) was incubated with HIT sera (90 μL) for 5 min in the presence or not of R406 and heparin (0.5 U mL<sup>-1</sup>) was added to initiate the activation.

Platelet aggregation experiments were monitored under continuous stirring at 900 rev min<sup>-1</sup> at 37 °C using a turbidimetric method and ATP secretion was recorded by measuring the luminescence from the firefly luciferin–luciferase reaction using the Chrono-log<sup>®</sup> aggregometer (Kordia, Leiden, the Netherlands). Tyrosine phosphorylated proteins were detected by immunoblotting with the 4G10 anti-phosphotyrosine antibody as described [30,31].

For the analysis of α-granule secretion in platelet-rich plasma (PRP), platelets were stimulated via FcγRIIA clustering by 2 μg mL<sup>-1</sup> of mab IV.3 for 1 min followed by the addition of 30 μg mL<sup>-1</sup> goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> for 3 min under stirring at 900 rev min<sup>-1</sup>. PRP was pretreated or not with 5 μM R406 for 10 min. After centrifugation (2500 × g for 4 min), PF4 was quantified in the supernatant using a quantitative ELISA (Asserachrom<sup>®</sup> kit PF4; Stago, Asnières sur Seine, France).

Platelet microparticle production was analyzed by flow cytometry. All materials used for the preparation of microparticles were rinsed with a filtered (0.22 μm) phosphate-buffered saline (PBS) buffer containing 0.5% BSA and 1 mM EDTA. After stimulation for 45 min without stirring, washed platelets (10<sup>9</sup> platelets mL<sup>-1</sup>) were centrifuged for 2 min at 7000 × g and the supernatant was recovered. Platelet microparticles were then labeled with a CD42b antibody (Invitrogen). CD42b positive elements, whose size was between 0.5 and 1 μm, were counted as microparticles using a FC-500 cytometer (Beckman Coulter, Galway, Ireland) which settings was realized using the

megamix kit (Biocytex, Marseille, France) as described previously [32].

#### *Analysis of platelet signaling pathways by flow cytometry*

After stimulation in PRP, platelets (2.5 × 10<sup>8</sup> platelets mL<sup>-1</sup>) were fixed in 3% formaldehyde for 15 min, washed once in PBS, permeabilized by adding ice-cold methanol under gentle vortexing, to reach a final concentration of 90% methanol. After 30 min on ice, platelets were washed once in PBS and resuspended in PBS containing 3% BSA (w/v) and relevant antibodies (1 μg mL<sup>-1</sup>). After overnight incubation at 4 °C, they were washed once in PBS containing 3% BSA (w/v), resuspended in the same buffer and stained with Alexa 488 goat anti-Rabbit Fab' (0.1 μg mL<sup>-1</sup>) (Invitrogen) for 1 h at 4 °C. After two washing steps, platelets were resuspended in PBS containing 3% BSA (w/v) and analyzed by flow cytometry.

#### *Lipid extraction and analysis*

Platelets were labelled with 0.6 mCi mL<sup>-1</sup> [<sup>32</sup>P]orthophosphate during 45 min in a phosphate-free Hepes-Tyrode's buffer (pH 6.5) at 37 °C. Phosphoinositides and phosphatidic acid (PtdOH) were quantified as described previously [30,31].

#### *THP-1 cell culture and isolation of human PBMCs and monocytes*

THP-1 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 100 U mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 μg mL<sup>-1</sup> streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-pyruvate, 2 mM glutamine, 0.05 mM 2-mercaptoethanol and 10% heat-inactivated FBS.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the citrated blood of healthy donors using Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (MSL 1077; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), washed twice in PBS, and resuspended in endotoxin-free RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 μg mL<sup>-1</sup> streptomycin and 25 mM HEPES as described previously [33].

For monocytes isolation, PBMCs were submitted to a negative selection using the monocyte isolation kit II and the magnetic cell sorting system (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) according to the manufacturer's protocol. Monocytes were then resuspended ( $10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) in endotoxin-free RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM L-Glutamine, 100 U  $\text{mL}^{-1}$  penicillin and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin.

#### Detection of TF mRNA synthesis by RT-PCR

Monocytes or THP-1 cells were stimulated by the addition of purified IgG isolated from HIT sera (final concentration 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) with or without heparin (0.025 U  $\text{mL}^{-1}$  or 100 U  $\text{mL}^{-1}$ ), PF4 (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and R406 (5  $\mu\text{M}$ ) for 120 min and lysed using the Genelute mammalian total RNA kit (Sigma, St. Louis, MO, USA). Total RNA (from  $2 \times 10^6$  cells) was analyzed by RT-PCR of TF mRNA as described previously [34]. Briefly, RNA (1  $\mu\text{g}$  for TF and for G6PDH) was first reverse transcribed with the first-strand synthesis kit for RT-PCR (Roche, Meylan, France) and next amplified with the LightCycler Fast Start DNA master hybridization probes (Roche). The primers (sense AGACAGCCCCGGTAGAGTG-TATG and antisense GCTCCAACAGTGCTTCCTTTATG, covering nucleotides 780–981) and the fluorescent probes (ACCACAGCTCCAATGATGTAGAATATTTCTC-Flu and LCRed640-GAATTCCCCTTTCTCCTGGCCC, covering nucleotide 801–855), derived from the published database sequences of human TF mRNA, were from TIB-MOLBIOL (Berlin, Germany). The housekeeping gene G6PDH detection kit used for calibration was from Roche. PCR reactions were run in the LightCycler amplification and detection system. Denaturation was performed for 10 min at 95 °C, then DNA was amplified for 45 cycles of 10 s at 95 °C, 15 s at 55 °C and 5 s at 72 °C. Results are expressed as the TF/G6PDH ratio in each sample.

#### TF procoagulant activity and antigen expression

Monocytes or PBMCs were stimulated by the addition of purified IgG isolated from HIT sera (final concentration 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) during 5 h either with or without heparin (0.025 U  $\text{mL}^{-1}$  or 10 U  $\text{mL}^{-1}$ ), PF4 (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and R406 (5  $\mu\text{M}$ ). Lipopolysaccharide (LPS, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) from *Escherichia coli* serotype 0111:B4 was tested as a positive control in each experiment. In one experiment, IgG from healthy donors was tested as a negative control and had no effect on TF expression.

The TF activity expressed on the luminal surface of monocytes or PBMCs was measured as described previously [35] with some modifications. After stimulation, cells were washed twice in PBS, centrifuged, adjusted to  $5 \times 10^4$  cells per well and incubated with 50  $\mu\text{L}$  of Tris-buffered saline (50 mM Tris HCl, 120 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) containing 3 mg  $\text{mL}^{-1}$  BSA, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 nM FVII and 180 nM FX (final concentrations). After 30 min at 37 °C, 50  $\mu\text{L}$  of 1.25 mg  $\text{mL}^{-1}$  FXa chromogenic substrate (CS1165) was

added and the reaction was followed for 30 min at OD 405 nm on a DIGISCAN microplate reader (V3.0; Asys Hitech, Eugendorf, Austria) to calculate the  $V_{max}$  value. As a control, pre-incubation (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  during 30 min at 37 °C) with an anti-TF antibody (American Diagnostica, Stanford, CA, USA) was performed when indicated.

Aliquots of stimulated cells were used for measurement of TF expression by flow cytometry. Cells were fixed in 4% formaldehyde for 30 min, washed twice and incubated for 15 min at 4 °C with FBS to block the Fc binding sites. After a washing step in PBS containing 10% (w/v) FBS, fixed cells were incubated for 1 h at 4 °C with 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of a monoclonal anti-TF antibody (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). After washing, cells were stained with 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of Alexa 488 goat anti-mouse Ig (Invitrogen) for 30 min at 4 °C, washed twice, resuspended in PBS and analyzed by flow cytometry as described previously [36].

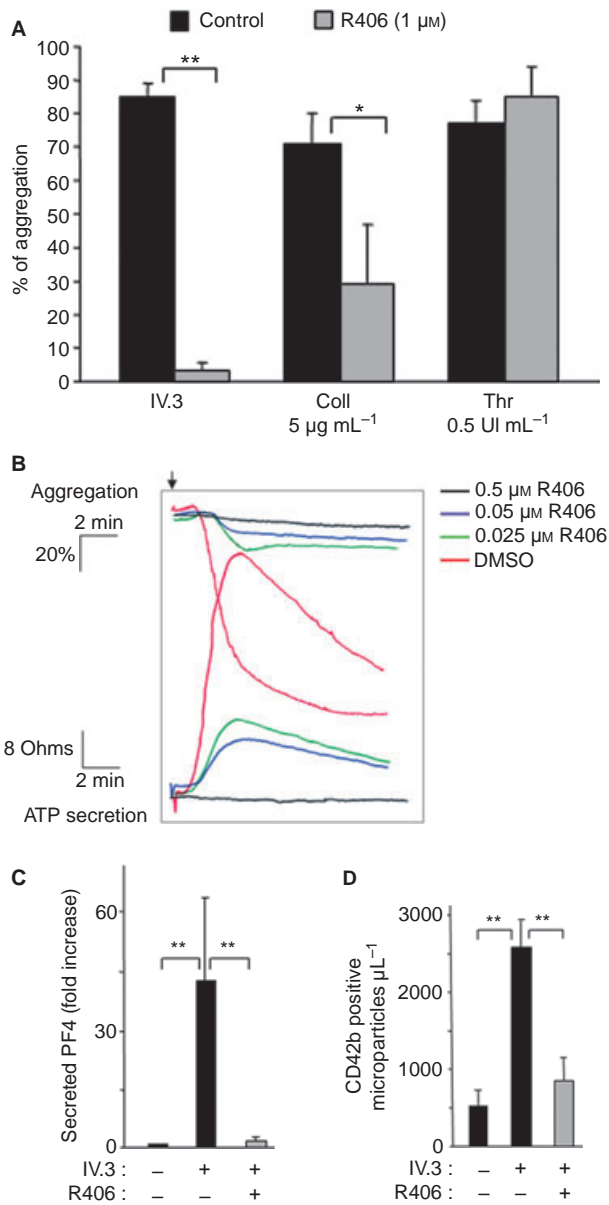
## Results

### *The Syk inhibitor R406 inhibits Fc $\gamma$ RIIA-mediated platelet aggregation, secretion and microparticle production*

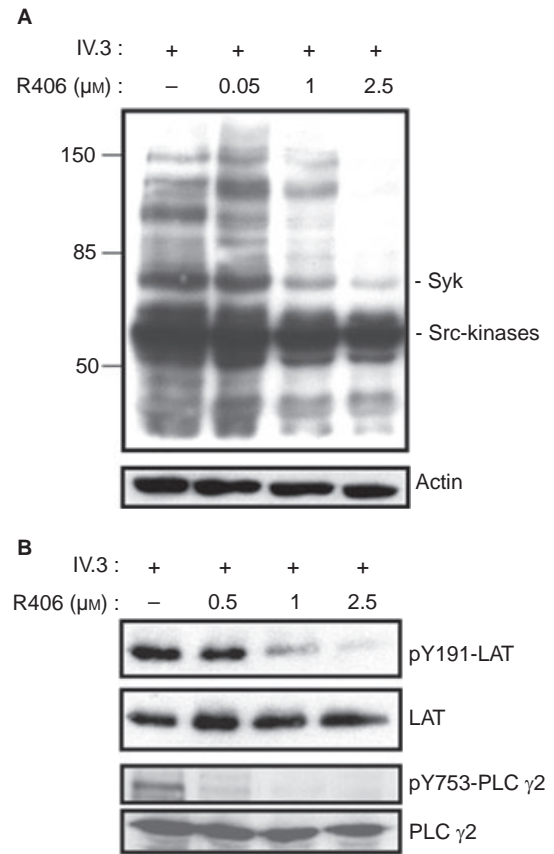
We first compared the effect of R406 on washed human platelet aggregation induced by Fc $\gamma$ RIIA clustering, collagen and thrombin. R406 (1  $\mu\text{M}$ ) significantly inhibited platelet aggregation in response to collagen, as previously reported [37], had no detectable effect in response to 0.5 IU  $\text{mL}^{-1}$  thrombin and abolished platelet aggregation induced by Fc $\gamma$ RIIA clustering with the IV.3 antibody (Fig. 1A). Among these three different pathways, platelet activation mediated by Fc $\gamma$ RIIA clustering was the most sensitive to the Syk inhibitor. As shown in Fig. 1B, platelet aggregation and ATP secretion induced by Fc $\gamma$ RIIA clustering were inhibited by R406 in a dose-dependent manner. Both were greatly reduced at 0.05  $\mu\text{M}$  and abrogated at  $\geq 0.5 \mu\text{M}$  R406. The release of PF4 by the  $\alpha$ -granules and the production of microparticles induced by Fc $\gamma$ RIIA clustering were also inhibited by the Syk inhibitor (Fig. 1C,D). It is noteworthy that the IC<sub>50</sub> of R406 on platelet aggregation induced by Fc $\gamma$ RIIA clustering with the IV.3 antibody was 0.07  $\mu\text{M}$  in washed platelets, with relatively large inter-individual variability, while its IC<sub>50</sub> in PRP was shifted to 2.40  $\mu\text{M}$ .

### *R406 inhibits the signaling mechanisms downstream of Fc $\gamma$ RIIA*

The pattern of tyrosine phosphorylation of human platelets stimulated by Fc $\gamma$ RIIA clustering was affected in a dose-dependent manner by the Syk inhibitor (Fig. 2A). The tyrosine phosphorylation of the protein matching the kinase Syk was strongly reduced by R406. Syk is known to phosphorylate the docking protein LAT, an important player in the assembly of highly efficient signaling complexes composed of proteins such as Gads, SLP76, PLC $\gamma$ 2 or PI3K downstream of GPVI or Fc $\gamma$ RIIA [12,13,17,38]. It has been shown that Syk can be

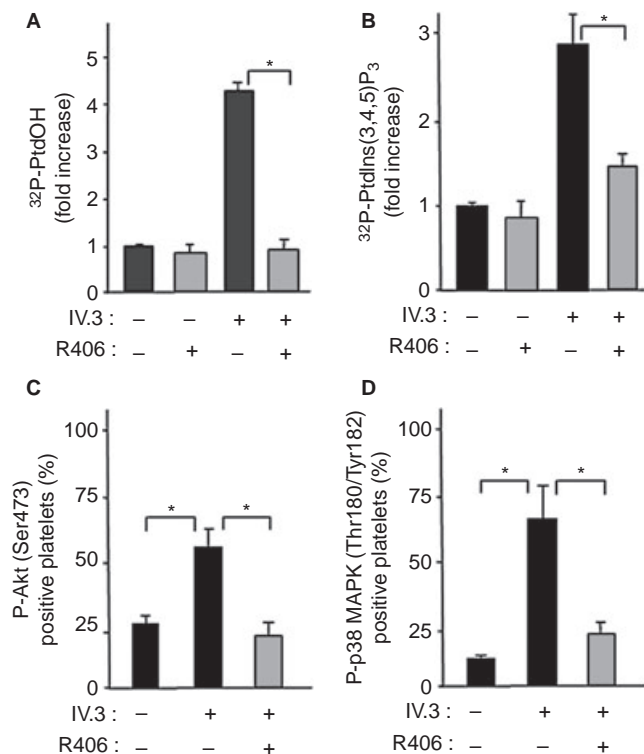


**Fig. 1.** Effect of R406 on human platelet aggregation, secretion and platelet microparticles generation in response to FcγRIIA clustering. (A) Washed human platelets were treated or not with 1 μM of R406 for 5 min and stimulated via FcγRIIA clustering by 2 μg mL<sup>-1</sup> of mab IV.3 for 1 min followed by the addition of 30 μg mL<sup>-1</sup> goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> or by the addition of collagen or thrombin under stirring at 900 rev min<sup>-1</sup>. Results are mean ± standard error of the mean (SEM) of peak aggregation (%) from four independent experiments. (B) Dose-response to R406 of washed platelets stimulated via FcγRIIA clustering as in (A). Aggregation and ATP secretion were assessed in parallel using lumi-aggregometry. Data shown are representative of a very sensitive platelet donor (IC<sub>50</sub> of R406 on washed platelet aggregation via IV.3 is 0.07 μM with relatively large interindividual variability). The arrow indicates addition of the goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub>. (C) Secretion of PF4 in platelet-rich plasma (PRP) with or without R406 (5 μM) after the addition of mab IV.3 and the goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> for 3 min. (D) Washed platelets (10<sup>9</sup> platelets mL<sup>-1</sup>) were treated or not with 5 μM of R406 and stimulated via FcγRIIA clustering as in (A) but for 45 min and without stirring. Generated CD42-positive microparticles were quantified as described in Experimental procedures. In C and D, data are mean ± SEM of three independent experiments. (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, *t*-test).



**Fig. 2.** R406 reduces FcγRIIA-induced tyrosine phosphorylations. (A) Dose response of R406 on washed human platelet tyrosine phosphorylation pattern in response to 5 min FcγRIIA clustering with the mab IV.3 and the goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> as in Fig. 1A. (B) Western blot analysis of phospho-LAT (Y191), LAT, phospho-PLCγ2 (Y753) and PLCγ2 in washed human platelets incubated with increasing doses of R406 and stimulated as in (A). The western blots shown are representative of three independent experiments.

phosphorylated by Src kinases at different tyrosine residues including the autophosphorylations sites in platelets, even in the presence of R406 [37]. Therefore, to monitor its activity we followed the phosphorylation of its substrate LAT. R406 inhibited in a dose-dependent manner the phosphorylation of the tyrosine residue 191 of LAT (Fig. 2B). Moreover, the tyrosine phosphorylation of a downstream effector, PLCγ2, was also strongly inhibited by low doses of R406 (Fig. 2B). As a consequence, PtdOH production, which reflects the combined activity of PLC and diacylglycerol kinase in platelets, was totally inhibited by 1 μM R406 (Fig. 3A). Under similar conditions, thrombin-induced PtdOH synthesis which uses the Gq/PLCβ pathway, and not PLCγ2, was not significantly affected (92% ± 10 of control, *n* = 2). Moreover, the production of the second messenger phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate [PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>] by PI3K was also inhibited by 1 μM R406 in response to FcγRIIA clustering (Fig. 3B). Finally, R406 inhibited the phosphorylation of the PI3K effector Akt (Fig. 3C) and of p38 MAP-kinase (Fig. 3D). Overall, these results indicate that the pharmacological

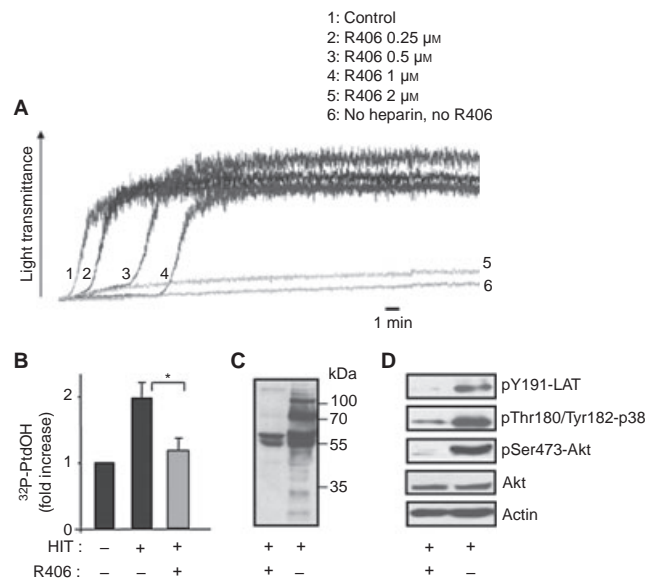


**Fig. 3.** Effect of the Syk inhibitor on PLC/DAG-kinase, PI3K, Akt and p38-MAPK activation induced by Fc $\gamma$ RIIA clustering. <sup>32</sup>P-labeled washed platelets were treated or not with 1  $\mu$ M R406 for 5 min and stimulated by mab IV.3 and anti goat antimouse F(ab')<sub>2</sub> as in Fig. 2A and the levels of <sup>32</sup>P-PtdOH (A) and <sup>32</sup>P-PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (B) were measured. Platelet-rich plasma (PRP) was pretreated with 5  $\mu$ M R406 prior to platelet stimulation by mab IV.3 and anti goat antimouse F(ab')<sub>2</sub> as in (A) but without shaking and phospho-Akt (S473) (C) and phospho-p38 MAPK (T180/Y182) (D) were analyzed by flow cytometry. Results are expressed as mean fold increase  $\pm$  SEM of three independent experiments for PtdOH and PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> production and mean percentage of positive platelets  $\pm$  SEM of three independent experiments for phospho-Akt and phospho-p38 MAPK (\**P* < 0.01, *t*-test).

inhibition of Syk efficiently inhibited platelet Fc $\gamma$ RIIA-mediated signaling pathways.

#### R406 prevents platelet activation and signaling induced by sera from HIT patients

We then analyzed the effect of R406 on HIT serum-induced platelet activation. Low doses of R406 ( $\leq$  1  $\mu$ M) delayed while a higher concentrations inhibited the aggregation of washed platelets induced by sera from HIT patients in the presence of heparin (Fig. 4A and Table 1). The effect of R406 on aggregation intensity and time to mid aggregation was further analyzed using HIT sera from four patients (Fig. S1 and Table 1). In spite of some heterogeneity in the lag phase before aggregation among the different patient's sera, 2–5  $\mu$ M R406 efficiently prevented aggregation in all cases. At 1  $\mu$ M, R406 already significantly decreased the production of PtdOH in platelets stimulated by HIT sera indicating an inhibition of PLC $\gamma$ 2 activation (Fig. 4B). At 5  $\mu$ M R406 the whole tyrosine



**Fig. 4.** R406 inhibits platelet aggregation and activation induced by sera from heparin-induced thrombocytopenia (HIT) patients. (A) Washed platelets from healthy donors were treated or not with increasing concentrations of R406 for 5 min and stimulated via Fc $\gamma$ RIIA clustering by HIT-sera and heparin (0.5 U). Platelet aggregation was assessed as in Fig. 1 and the profiles shown are representative of five independent experiments (HIT serum from P 2, 3, 5 and 6 and 4 platelet donors). (B) <sup>32</sup>P-labeled washed platelets were treated or not with 1  $\mu$ M R406 for 5 min and stimulated by HIT-sera and heparin (0.5 U). The production of [<sup>32</sup>P]-PtdOH was monitored as in Fig. 3 and results, expressed as fold increase, are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments (\**P* < 0.05, *t*-test; HIT serum from P# 1 and 3 platelet donors). (C) washed platelets were treated as in B and the platelet tyrosine phosphorylation pattern was analyzed by Western blotting. (D) platelets were treated as in B and phospho-LAT (Y191), phospho-Akt (S473) and phospho-p38 MAPK (T180/Y182) were analyzed by Western blotting. The western blots shown are representative of two independent experiments (HIT serum from P# 6 and 2 platelet donors).

phosphorylation profile induced by HIT sera was strongly reduced including the tyrosine phosphorylation of the Syk substrate LAT as well as the phosphorylation of downstream effectors such as Akt and p38 (Fig. 4C,D).

#### R406 prevents monocyte TF expression and procoagulant activity induced by HIT IgG antibodies

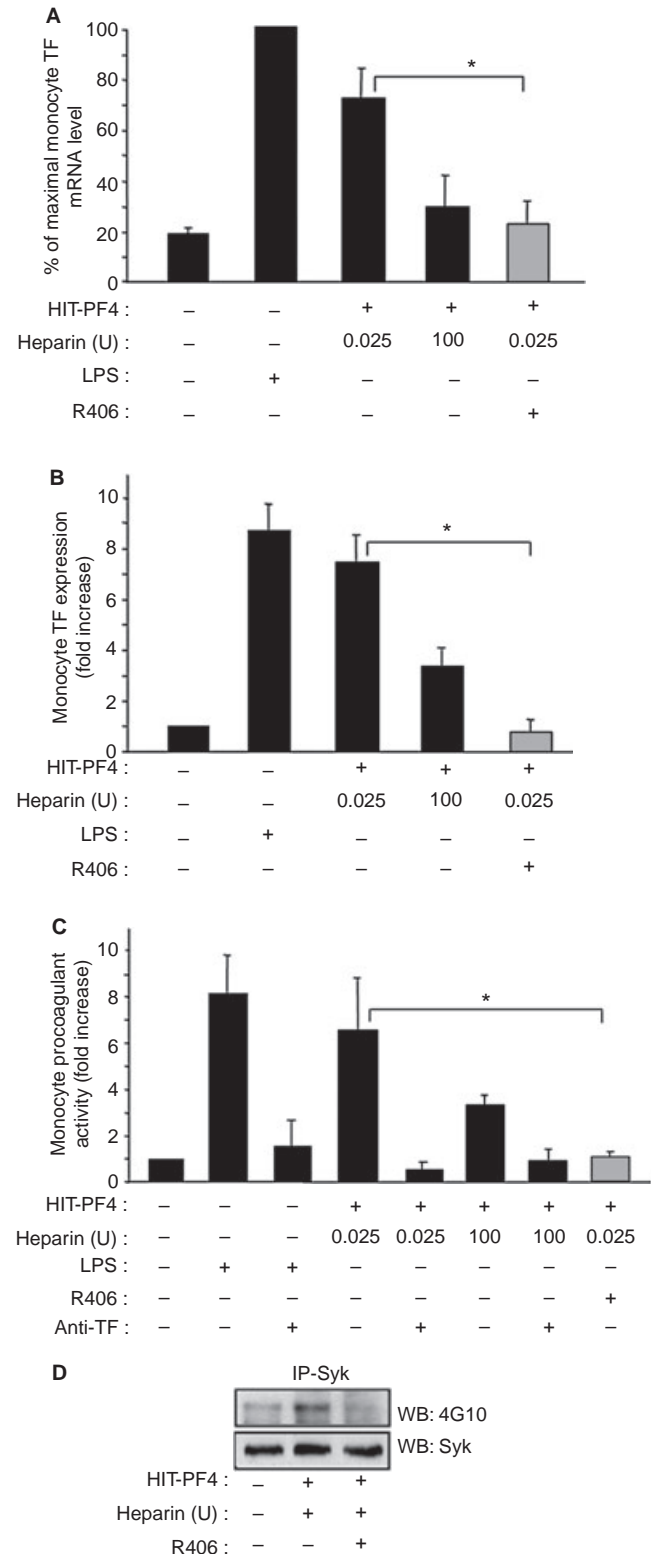
We then checked whether Syk inhibition could also impact the induction of TF synthesis by monocytes. As a first approach we used the monocytic cell line THP-1 and found that addition of purified IgG from sera of HIT patients plus PF4 resulted in heparin-dependent expression of TF mRNA (Fig. S2A). As a control of specificity, an excess of heparin, which induces the disruption of the optimal ratio of antigen complex, strongly decreased the effect of HIT antibodies on TF mRNA expression. The treatment of THP-1 cells with 5  $\mu$ M R406 inhibited HIT antibody-mediated expression of TF mRNA. We further evaluated the effect of the Syk inhibitor on TF expression using freshly isolated human PBMCs. As previously reported [7,8], HIT antibodies induced the expression of a

functional TF protein in this cell population as demonstrated by the FVII-dependent generation of FXa (Fig. S2B,C). This effect was again inhibited by 5  $\mu\text{M}$  R406. Among PBMCs, monocytes are thought to be the major source of TF [39]. Therefore, we isolated human monocytes and incubated them with purified IgG from sera of HIT patients. This resulted in heparin-dependent expression of TF mRNA (Fig. 5A) which was efficiently inhibited by 5  $\mu\text{M}$  R406. Accordingly, the level of TF protein on the surface of the human monocytes increased upon treatment with HIT antibodies (Fig. 5B) and this TF was functional as demonstrated by the FVII-dependent generation of FXa (Fig. 5C). The effect of HIT antibodies was quite similar to that of LPS, a well-known inducer of TF in these cells. R406 efficiently inhibited the membrane expression of TF and the monocyte procoagulant activity induced by HIT antibodies and heparin (Fig. 5B,C). These effects were correlated with an increase in Syk tyrosine phosphorylation in the presence of HIT antibodies plus PF4 and heparin and an inhibition of this phosphorylation by R406 (Fig. 5D).

**Discussion**

HIT is a rare but severe iatrogenic auto-immune disorder mediated by antibodies targeting PF4 released by platelets in complex with heparin [3,4,9]. *In vitro* and *in vivo* studies have implicated Fc $\gamma$ RIIA-mediated platelet activation as a crucial step in the pathophysiology of HIT [2,11,40–42]. In addition, anti-PF4/heparin antibodies-induced production of procoagulant platelet microparticles and expression of monocyte and endothelial TF, initiating the coagulation cascade [7,8,10], contribute to the hypercoagulability in HIT patients. The development of small molecule inhibitors of kinases used in cancer and inflammatory diseases therapy provides opportunities to test selective inhibitors that could block the signaling pathways downstream of Fc $\gamma$ R. Interestingly, Reilly *et al.* [28] demonstrated recently that the Syk inhibitor, PRT-060318, limits the thrombocytopenic and thrombotic effects of heparin and the HIT-like antibody KKO in a transgenic mouse model

expressing both Fc $\gamma$ RIIA and human PF4 [11,40]. Our *in vitro* data using the Syk inhibitor R406, the active metabolite of the prodrug fostamatinib, suggest that targeting Syk is in fact effective both on platelet and on monocyte activation induced by HIT antibodies.



**Fig. 5.** R406 inhibits heparin-induced thrombocytopenia (HIT) antibody-induced monocyte tissue factor (TF) expression and procoagulant activity. (A) Freshly isolated human monocytes treated or not with R406 (5  $\mu\text{M}$ ) were stimulated or not with lipopolysaccharides (LPS) or purified HIT antibodies + PF4 in the presence or absence of heparin as indicated in Experimental procedures and the TF mRNA level was quantified after 120 min of stimulation. (B) Monocytes were treated as in (A) during 5 h and the surface TF expression was quantified by flow cytometry. (C) Monocytes were treated as in (B) and their procoagulant activity was measured using a specific factor (F)Xa chromogenic assay and the  $V_{max}$  of the reaction was calculated. An anti-TF antibody was used to show the TF-dependence of the procoagulant activity. Results are expressed as fold increase and are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments ( $*P < 0.05$ , *t*-test; HIT antibodies purified from P2 and 3 and 6 monocyte donors). (D) Monocytes were stimulated as in (A) during 30 min and the phosphorylation of Syk was analyzed by immunoprecipitation of the kinase followed by Western blotting with the 4G10 antibody. Data shown are representative of two independent experiments (HIT antibodies purified from P# 3 and 2 monocyte donors).

The first set of our results establishes that R406 is a potent inhibitor of human platelet aggregation and secretion induced by Fc $\gamma$ RIIA clustering and downstream signaling. The inhibition of Fc $\gamma$ RIIA-mediated dense and  $\alpha$  granules (PF4) secretion by R406 is important in the context of HIT. Not only does it reduce platelet recruitment and thrombus growth, but it also prevents the liberation of PF4, the target of HIT antibodies when present in an appropriate molar ratio with heparin. It is expected that reducing PF4 would block the positive feedback loop which sustains and amplifies the pathophysiological process [9]. Moreover, platelet microparticles production during platelet activation by Fc $\gamma$ RIIA clustering is also inhibited by R406. Critical signaling mechanisms known to be activated downstream of Fc $\gamma$ RIIA/Syk, including LAT phosphorylation and activation of PLC $\gamma$ 2, PI3K/Akt and p38 MAP-kinase, are inhibited by R406 at concentrations in the  $\mu$ -molar range, achieved in the blood of patients treated by this compound in other clinical settings [43]. Conversely, the Syk inhibitor has no effect on platelet aggregation induced by thrombin, which signals through heterotrimeric G-proteins coupled receptors, underlying the specificity of action of R406 at the doses used in the present study.

Our second observation is that R406 efficiently prevents platelet activation induced by HIT antibodies. At low doses, R406 delays platelet aggregation, an effect which could be explained by the inhibition of PF4 release, leading to less PF4-heparin/IgG complexes at the surface of platelets. At higher doses, it blocks platelet aggregation. The inhibition of several key signal transduction mechanisms by R406 indicates that Syk plays a critical role in HIT antibody-induced platelet activation, as shown for Fc $\gamma$ RIIA clustering with the IV.3 antibody.

Our third observation is that R406 inhibits HIT antibody-mediated expression of TF mRNA in the monocytic cell line THP-1 and in isolated human monocytes. Moreover, the expression of TF protein on the surface of freshly isolated PBMCs and human monocytes induced by the addition of HIT antibodies plus PF4 and heparin was also reduced by R406 treatment. Accordingly, their procoagulant activity (i.e. generation of FXa) was inhibited in a similar manner by R406 and this correlated with Syk inhibition. This is important new information which underlines the critical role of Syk signaling in monocytes triggered by HIT antibodies. Only limited information exists on the specific mechanisms involved in inducing monocyte TF expression in the presence of heparin-PF4 and HIT sera. It is likely that Fc $\gamma$  receptors for the Fc domain of IgG are involved as human monocytes express two major classes of Fc $\gamma$  receptor, Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RII. Upon cross-linking of Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RII there is a rapid and transient tyrosine phosphorylation of multiple proteins which involve Src kinases known to phosphorylate ITAM as well as Syk [44]. Moreover, *in vivo*, platelet activation increases PF4 levels which may contribute to monocyte activation via receptors triggering the Syk pathway [45]. Signaling pathways involving p38, ERK and JNK are implicated in TF expression in response to lipopolysaccharide [46] and Syk may indeed regulate these

pathways. Syk is a central signaling molecule in monocytes [20,26,27] and our results suggest that it could be a potential target to treat HIT. Fostamatinib (R788), one of the most developed Syk inhibitors, is orally bioavailable, efficient, relatively well tolerated and has a reversible effect as its active metabolite, R406, acts as an ATP-competitive inhibitor [26,27]. Mice reconstituted with Syk-deficient platelets have a normal bleeding time [47] and mice treated with R406 at systemic exposures up to 25  $\mu$ M have no increased bleeding time [27]. This indicates that primary hemostasis is spared, probably owing to the fact that, with the exception of collagen and CLEC2 ligands, most physiological platelet agonists activate platelets by signaling pathways not involving Syk as a mandatory player. In addition, fostamatinib has been administered to severe thrombocytopenic patients without major bleeding [25]. Moreover, in many cases these treated patients reconstituted their platelet count suggesting that megakaryocytopoiesis was not impaired by Syk inhibition.

A limitation of the present study is that the efficiency of R406 to prevent thrombocytopenia and thrombosis *in vivo* has not been established. We observed that although the compound is highly active on washed platelets, the presence of plasma reduces its efficiency on platelets. However, R406 at a concentration of 5  $\mu$ M abrogates platelet PF4 secretion, and Akt or p38 MAP-kinase phosphorylation in PRP. This concentration is of the order of magnitude of those measured in the blood of patients who received fostamatinib, twice daily oral doses of 50–150 mg, for treatment of rheumatoid arthritis [43].

Overall, our data and those from Reilly *et al.* [28] suggest that Syk inhibition represents an attractive therapeutic strategy in the treatment of HIT and other immune complexes-mediated platelet disorders dependant on Fc $\gamma$ RIIA, such as eptifibatide-induced thrombocytopenia [48] with or without thrombosis [49].

#### Addendum

T. Lhermusier participated in designing and performing the research and analyzed data; J. van Rottem, C. Garcia, J.-M. Xuereb, V. Martin and A. Ragab performed the experiments, M.-P. Gratacap controlled the experimental approaches, C. Garcia and P. Sié have selected and prepared HIT sera, P. Sié and B. Payrastra controlled, analyzed data and wrote the paper. All authors checked the final version of the manuscript.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from Inserm and the Région Midi-Pyrénées. Thanks are due to G. Chicanne for his help with the HPLC analysis of phosphoinositides. T.L. was supported by a grant from CHU-Toulouse, V.M. and J.V.R. by the Fondation pour la Recherche Médicale.

#### Disclosure of Conflict of Interest

The authors state that they have no conflict of interest.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Interindividual variability of the R406 effect on platelet aggregation induced by sera from a heparin-induced thrombocytopenia (HIT) patient. (A) Washed platelets from healthy donors were treated or not with increasing concentrations of R406 for 5 min and stimulated by HIT-sera and heparin (0.5 U). Platelet aggregation was assessed as in Fig. 1 and the data are expressed as percentage of maximal aggregation and are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of five independent experiments ( $*P < 0.05$ , *t*-test; HIT serum from P# 2, 3, 5 and 6 and 3 platelet donors). (B) Table showing the time to mid aggregation (in second) obtained for each HIT-sera (NA: no aggregation, P#3 was tested on two platelet donors). **Figure S2.** R406 inhibits heparin-induced thrombocytopenia (HIT) antibody-induced monocytic cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) tissue factor (TF) expression and procoagulant activity. (A) THP-1 cells treated or not with R406 (5  $\mu$ M) were stimulated with purified HIT antibodies + PF4 as indicated in Experimental procedures and the TF mRNA level was quantified after 120 min of stimulation. In (B) and (C), PBMCs treated or not with R406 (5  $\mu$ M) were stimulated or not with lipopolysaccharides (LPS) or purified HIT antibodies during 5 h. Surface TF expression on fixed cells was quantified by flow cytometry (B). (C) PBMCs procoagulant activity was measured on fresh cells using a specific factor (F)Xa chromogenic assay and the  $V_{max}$  of the reaction was calculated. Results are expressed as fold increase and are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments ( $*P < 0.05$ , *t*-test; HIT antibodies purified from P#2 and 3 and 3 PBMC donors).

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## References

- Warkentin TE, Chong BH, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: towards consensus. *Thromb Haemost* 1998; **79**: 1–7.
- Walenga JM, Jeske WP, Prechel MM, Bakhos M. Newer insights on the mechanism of heparin-induced thrombocytopenia. *Semin Thromb Hemost* 2004; **30** (Suppl. 1): 57–67.
- Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2009; **7** (Suppl. 1): 9–12.
- Kelton JG, Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: a historical perspective. *Blood* 2008; **112**: 2607–15.
- Tardy-Poncet B, Piot M, Chapelle C, France G, Campos L, Garraud O, Decousus H, Mismetti P, Tardy B. Thrombin generation and heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 1474–81.
- Warkentin TE, Hayward CPM, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JA, Bode AP, Kelton JG. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1994; **84**: 3691–9.
- Arepally GM, Mayer IM. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia stimulate monocytic cells to express tissue factor and secrete interleukin-8. *Blood* 2001; **98**: 1252–4.
- Pouplard C, Iochmann S, Renard B, Herault O, Colombat P, Amiral J, Gruel Y. Induction of monocyte tissue factor expression by antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes developed in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2001; **97**: 3300–2.
- Rauova L, Hirsch JD, Greene TK, Zhai L, Hayes VM, Kowalska MA, Cines DB, Poncz M. Monocyte-bound PF4 in the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2010; **116**: 5021–31.
- Cines DB, Tomaski A, Tannenbaum S. Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1987; **316**: 581–9.
- Reilly MP, Taylor SM, Hartman NK, Arepally GM, Sachais BS, Cines DB, Poncz M, McKenzie S. Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through Fc $\gamma$ RIIA. *Blood* 2001; **98**: 2442–7.
- Kasirer-friede A, Kahn ML, Shattil SJ. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunol Rev* 2007; **218**: 247–64.
- Huang MM, Indik Z, Brass LF, Hoxie JA, Schreiber AD, Brugge JS. Activation of Fc $\gamma$ RII induces tyrosine phosphorylation of multiple proteins including Fc $\gamma$ RII. *J Biol Chem* 1992; **267**: 5467–73.
- Chacko GW, Duchemin AM, Coggeshall KM, Osbone JM, Brandt JT, Anderson CL. Clustering of the platelet Fc $\gamma$  receptor induces noncovalent association with the tyrosine kinase p72syk. *J Biol Chem* 1994; **269**: 32435–40.
- Falet H, Pollitt AY, Begonja AJ, Weber SE, Duerschmied D, Wagner DD, Watson SP, Hartwig JH. A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *J Exp Med* 2010; **207**: 1967–79.
- Watson SP, Gibbins J. Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunol Today* 1998; **19**: 260–4.
- Watson SP, Auger JM, McCarty OJT, Pearce AC. GPVI and integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 1752–62.
- Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL, Watson SP. The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J* 1997; **16**: 2333–41.
- Clark EA, Shattil SJ, Ginsberg MH, Bolen J, Brugge JS. Regulation of the protein tyrosine kinase pp72syk by platelet agonists and the integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3. *J Biol Chem* 1994; **269**: 28859–64.
- Mocsai A, Ruland J, Tybulewicz VLJ. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 387–402.
- Hughes CE, Pollitt AY, Mori J, Eble JA, Tomlinson MG, Hartwig JH, O'Callaghan CA, Fütterer K, Watson SP. CLEC-2 activates Syk through dimerization. *Blood* 2010; **115**: 2947–55.
- Canobbio I, Stefanini L, Gianni F, Guidetti GF, Balduini C, Torti M. A new role for Fc $\gamma$ RIIA in the potentiation of human platelet activation induced by weak stimulation. *Cell Signal* 2006; **18**: 861–70.
- Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA, Shattil SJ. Coordinate interactions of Csk, SRC, and Syk kinases with  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 2002; **157**: 265–75.
- Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, Newman PJ. Identification of Fc $\gamma$ RIIA as the ITAM-bearing receptor mediating  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood* 2008; **112**: 2780–6.
- Podolanczuk A, Lazarus AH, Crow AR, Grossbard E, Bussel JB. Of mice and men: an open-label pilot study for treatment of immune thrombocytopenic purpura by an inhibitor of Syk. *Blood* 2009; **113**: 3154–60.
- Riccaboni M, Bianchi I, Petrillo P. Spleen tyrosine kinases: biology, therapeutic targets and drugs. *Drug Discovery Today* 2010; **15**: 517–30.



- 27 Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, Qu K, Herlaar E, Lau A, Young C, Wong BR, Lowell S, Sun T, Park G, Argade A, Jurcevic S, Pine P, Singh R, Grossbard EB, Payan DG, et al. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks Fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **319**: 998–1008.
- 28 Reilly MP, Sinha U, Andre P, Taylor SM, Pak Y, DeGuzman FR, Nanda N, Pandey A, Stolla M, Bergmeier W, McKenzie SE. PRT060318, a novel Syk inhibitor, prevents heparin-induced thrombocytopenia in a transgenic mouse model. *Blood* 2010; **117**: 2241–6.
- 29 Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A. Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 759–65.
- 30 Gratacap MP, Payrastré B, Viala C, Mauco G, Plantavid M, Chap H. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C-gamma2 is an early key event in Fc-gammaRIIA-mediated activation of human platelets. *J Biol Chem* 1998; **273**: 24314–21.
- 31 Gratacap MP, Héroult JP, Viala C, Ragab A, Savi P, Herbert JM, Chap H, Plantavid M, Payrastré B. Fc-gammaRIIA requires a Gi-dependent pathway for an efficient stimulation of phosphoinositide 3-kinase, calcium mobilization and platelet aggregation. *Blood* 2000; **96**: 3439–46.
- 32 Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F on behalf of the ISTH SSC Workshop. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the international society on thrombosis and haemostasis SSC collaborative workshop. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 2571–4.
- 33 Zeller JM, Gewurz H. Enhancement of Human Peripheral Blood Monocyte Respiratory Burst Activity by Aggregated C-Reactive Protein. *J Leuk Biol* 1986; **40**: 769–83.
- 34 Essayagh S, Xuereb J-M, Terrisse A-D, Tellier-Cirioni L, Pipy B, Sié P. Microparticles from apoptotic monocytes induce transient platelet recruitment and tissue factor expression by cultured human vascular endothelial cells via a redox-sensitive mechanism. *Thromb Haemost* 2007; **98**: 831–7.
- 35 Ghrib F, Brisset AC, Dupouy D, Terrisse AD, Navarro C, Cadroy Y, Boneu B, Sié P. The expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in aortic smooth muscle cells is up-regulated in synthetic compared to contractile phenotype. *Thromb Haemost* 2002; **87**: 1051–6.
- 36 Luther T, Flössel C, Hietschhold V, Koslowski R, Müller M. Flow cytometric analysis of tissue factor (TF) expression on stimulated monocytes-comparison to procoagulant activity of mononuclear blood cells. *Blut* 1990; **61**: 375–8.
- 37 Spalton JC, Mori J, Pollitt AY, Hughes CE, Eble JA, Watson SP. The novel Syk inhibitor R406 reveals mechanistic differences in the initiation of GPVI and CLEC-2 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 1192–9.
- 38 Ragab A, Séverin S, Gratacap M-P, Aguado E, Malissen M, Jandrot-Perrus M, Malissen B, Ragab-Thomas J, Payrastré B. Roles of the C-terminal tyrosine residues of LAT in GPVI-induced platelet activation; insights in the mechanism of PLC-gamma2 activation. *Blood* 2007; **110**: 2466–74.
- 39 Shantsila E, Lip GYH. The role of monocytes in thrombotic disorders: insights from tissue factor, monocyte-platelet aggregates and novel mechanisms. *Thromb Haemost* 2009; **102**: 916–24.
- 40 McKenzie SE, Reilly MP. Heparin-induced thrombocytopenia and other immune thrombocytopenias: lessons from mouse models. *Semin Thromb Hemost* 2004; **30**: 559–68.
- 41 Reilly RF. The pathophysiology of immune-mediated heparin-induced thrombocytopenia. *Semin Dial* 2003; **16**: 54–60.
- 42 Reilly MP, McKenzie SE. Insights from mouse models of heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2002; **9**: 395–400.
- 43 Weinblatt ME, Kavanaugh A, Burgos-Vargas R, Dikranian AH, Medrano-Ramirez G, Morales-Torres J, Murphy FT, Musser TK, Straniero N, Vicente-Gonzales AV, Grossbard E. Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk inhibitor. *Arthritis Rheum* 2008; **11**: 3309–18.
- 44 Pan XQ, Darby C, Indik ZK, Schreiber AD. Activation of three classes of nonreceptor tyrosine kinases following Fc-gamma receptor crosslinking in human monocytes. *Clin Immunol* 1999; **90**: 55–64.
- 45 Kasper B, Brandt E, Brandau S, Petersen F. Platelet factor 4 (CXC chemokine ligand 4) differentially regulates respiratory burst, survival, and cytokine expression of human monocytes by using distinct signaling pathways. *J Immunol* 2007; **179**: 2584–91.
- 46 Steffel J, Luscher TF, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2006; **113**: 722–31.
- 47 Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Ministri K, Hughes PE, Forsyth J, Turner M, Shattil SJ, Ginsberg MH, Tybulewicz VL, Phillips DR. Genetic and pharmacological analyses of Syk function in alphaIIb-beta-3 signaling in platelets. *Blood* 1999; **93**: 2645–52.
- 48 Gao C, Boylan B, Bougie D, Gill JC, Birenbaum J, Newman DK, Aster R, Newman PJ. Eptifibatid-induced thrombocytopenia and thrombosis in humans require Fc-gammaRIIa and the integrin beta3 cytoplasmic domain. *J Clin Invest* 2009; **119**: 504–11.
- 49 Epelman S, Nair D, Downey R, Militello M, Askari AT. Eptifibatid-induced thrombocytopenia and thrombosis. *J Thrombosis Thrombolysis* 2006; **22**: 151–4.

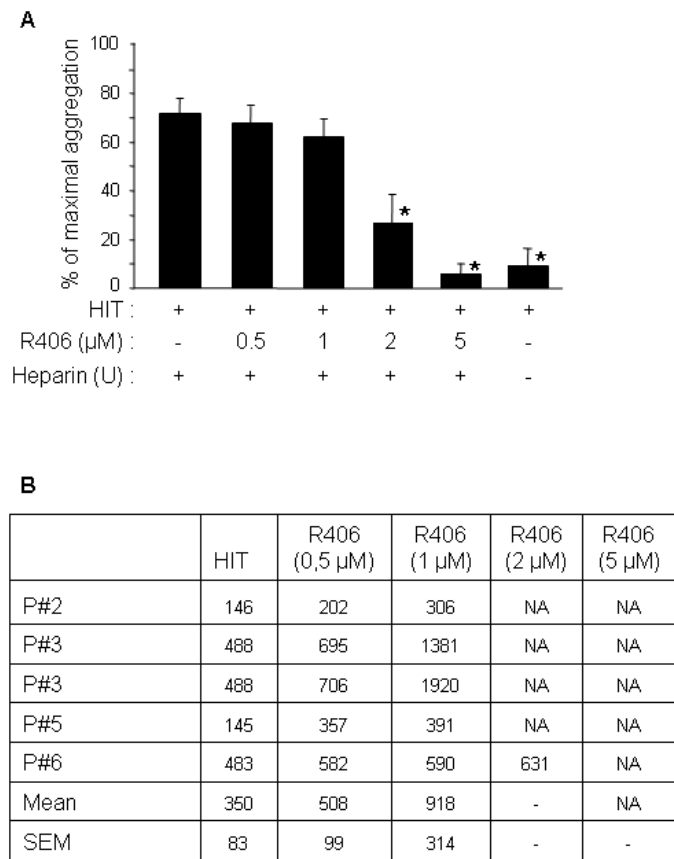


Figure S1, Lhermusier et al.

**Figure S1.** Interindividual variability of R406 effect on platelet aggregation induced by sera from HIT patient. (A) Washed platelets from healthy donors were treated or not with increasing concentrations of R406 for 5 min and stimulated by HIT-sera and heparin (0.5 U). Platelet aggregation was assessed as in Fig. 1 and the data are expressed as percentage of maximal aggregation and are mean  $\pm$  SEM of five independent experiments ( $*P < 0.05$ , *t*-test; HIT serum from P# 2, 3, 5 and 6 and 3 platelet donors). (B) Table showing the time to mid aggregation (in second) obtained for each HIT-sera (NA: no aggregation, P# 3 was tested on two platelet donors).

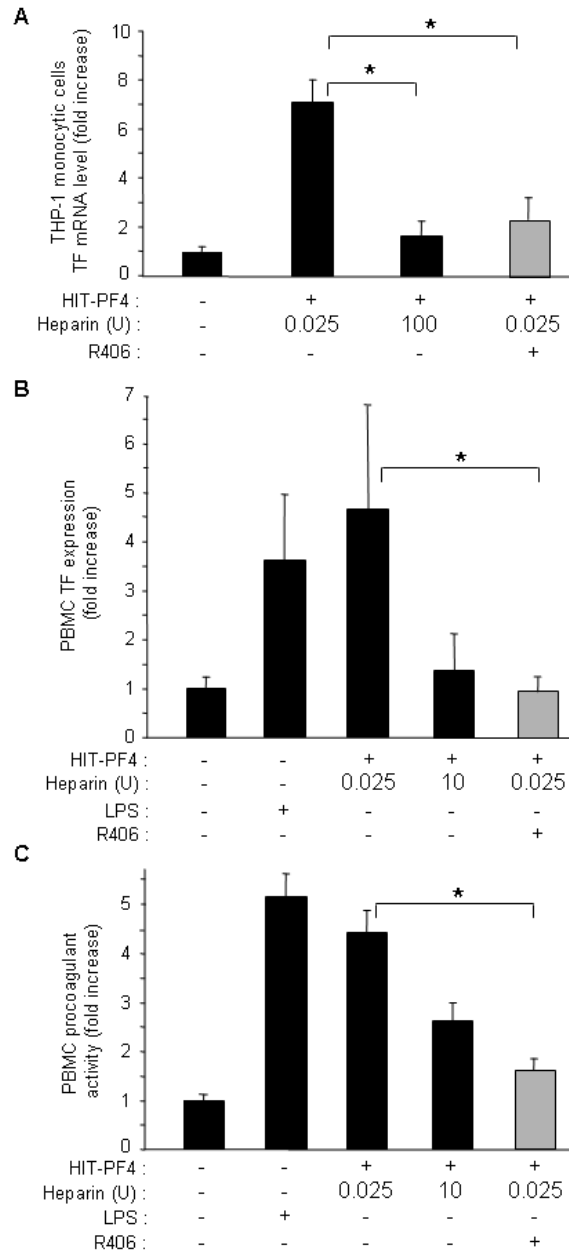


Figure S2, Lhermusier et al.

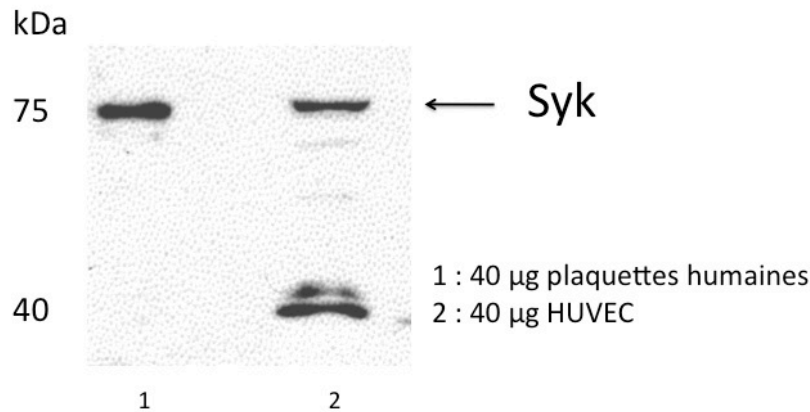
**Figure S2.** R406 inhibits HIT antibody-induced monocyte cells and PBMCs TF expression and procoagulant activity. (A) THP-1 cells treated or not with R406 (5  $\mu$ m) were stimulated with purified HIT antibodies + PF4 as indicated in Experimental procedures and the TF mRNA level was quantified after 120 min of stimulation. In B and C, PBMCs treated or not with R406 (5  $\mu$ m) were stimulated or not with LPS or purified HIT antibodies during 5 h. Surface TF expression on fixed cells was quantified by flow cytometry (B). (C) PBMCs procoagulant activity was measured on fresh cells using a specific factor Xa chromogenic assay and the  $V_{max}$  of the reaction was calculated. Results are expressed as fold increase and are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments (\* $P$ <0.05,  $t$ -test; HIT antibodies purified from P# 2 and 3 and 3 PBMC donors).

## II. Discussion et perspectives

Les résultats de cette étude montrent à quel point l'inhibition ciblée de Syk bloque efficacement l'activation des plaquettes induite par regroupement du récepteur Fc $\gamma$ RIIa et par les complexes immuns responsables de la TIH. Le R406 inhibe très efficacement la signalisation cellulaire en aval de Syk, en particulier les voies PLC $\gamma$ , PI3K/Akt et p38 avec pour conséquence le blocage de la sécrétion et de l'agrégation plaquettaire. La sécrétion de PF4, cibles des anticorps TIH, est très efficacement bloquée par le R406 ce qui est particulièrement important pour enrayer le processus de développement de la TIH. De même, la production de microparticules plaquettaires suite au regroupement du récepteur Fc $\gamma$ RIIa est fortement inhibée, or ces microparticules ont été proposées comme facteur d'amplification du phénotype thrombotique des TIH. La partie la plus novatrice de l'étude a concerné l'impact du R406 sur l'expression du facteur tissulaire à la surface des monocytes activés par les complexes immuns responsables de la TIH. Nous avons reproduit les observations précédentes montrant l'expression du facteur tissulaire par les monocytes humains mis en présence d'anticorps de patients atteints de TIH et d'héparine et montré que l'inhibition de Syk bloque de manière très efficace cette expression tant au niveau des ARNm que de la protéine. L'effet procoagulant des monocytes activés par les anticorps de patients est inhibé par le R406. Bien que nous n'ayons pas étudié en détail les voies de signalisation des monocytes dans ces conditions nous montrons que Syk est activée, vraisemblablement via les récepteurs Fc $\gamma$ R présents à la surface des monocytes. Il serait donc intéressant de pouvoir analyser en détail la voie d'activation des monocytes par les complexes immuns responsables de la TIH. L'un des enjeux est donc d'identifier le ou les récepteurs mis en jeu et les voies de signalisation dépendantes de Syk qui conduisent à l'expression du facteur tissulaire dans les monocytes.

Un aspect qui n'a pas été abordé dans l'étude concerne l'expression de Syk dans les cellules endothéliales qui peuvent être activées dans le contexte de la TIH et contribuer au phénotype thrombotique. Il y a dans la littérature un certain flou concernant l'expression de Syk dans les cellules endothéliales. Nous avons recherché par immunoempreinte la présence de cette kinase dans les cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC). Les résultats montrent clairement l'expression de Syk dans ces cellules avec notamment la protéine au poids moléculaire attendu de 75kDa et une forme de plus bas poids moléculaire (40 kDa) décrite dans certains modèles comme une forme protéolytique dont le rôle n'est pas

connu (Figure annexe de l'article 2). L'origine hématopoïétique des progéniteurs endothéliaux circulants pourrait expliquer l'expression de Syk dans les cellules endothéliales.



**Figure annexe de l'article 2 : Expression de Syk dans les cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC) analysée par immunoempreinte.**

Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de Syk dans l'activation des cellules endothéliales dans le contexte des TIH et d'analyser l'impact du R406.

Notre étude apporte des informations nouvelles permettant de proposer une stratégie thérapeutique dans le traitement des TIH. Ce travail, réalisé sur cellules primaires humaines, a cependant la faiblesse d'avoir été exclusivement réalisé *in vitro* mais il est intéressant de relier nos résultats à ceux, très complémentaires, obtenus par l'équipe de McKenzie qui a récemment montré dans un modèle murin de TIH que l'inhibiteur de Syk PRT318 pouvait prévenir la thrombopénie comme la thrombose *in vivo* observées au cours d'une TIH (Reilly et al., 2011).

Le concept de thérapie antithrombotique ciblée sur la principale voie d'activation mise en cause dans les TIH pourrait permettre de développer ou utiliser des molécules capables de bloquer les phénomènes thrombotiques en agissant à la fois sur les plaquettes et les monocytes et d'épargner les fonctions plaquettaires essentielles à une hémostase physiologique. La compréhension préalable des mécanismes impliqués dans les fonctions plaquettaires a permis de tester une nouvelle cible pharmacologique anti-thrombotique et de

proposer le R406 comme médicament candidat dans le traitement des TIH. Ses effets plaquettaires et monocytaires rapides et réversibles sont adaptés au contexte clinique de TIH. En raison de la relative rareté des TIH, le développement clinique de nouveaux médicaments dans cette indication reste complexe mais les résultats encourageants obtenus dans les études précliniques et dans le modèle de souris pourraient déboucher sur l'utilisation des inhibiteurs de Syk dans une fenêtre thérapeutique de quelques jours après l'arrêt de l'héparinothérapie dans les cas de TIH avérés.

# **Conclusion générale**

Malgré une diminution considérable de la mortalité cardiovasculaire depuis vingt ans, les maladies cardiovasculaires demeurent une des premières causes de mortalité dans les pays occidentalisés. Ces dernières années ont été marquées par l'apparition de nouvelles molécules antithrombotiques dans le domaine des inhibiteurs plaquettaires (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor, anti-GpIIbIIIa) comme celui des anticoagulants (inhibiteurs du facteur X, inhibiteurs du facteur II) et de réelles innovations pharmacologiques continueront à apparaître dans les années à venir dans ce domaine (Thrombin Receptor Antagonists, nouveaux anticoagulants).

A travers ce travail, nous nous sommes intéressés à deux pistes d'intérêt dans le développement de nouvelles molécules antithrombotiques.

La première situation correspond à un mécanisme original et rare de thrombose : la thrombopénie immuno-allergique à l'héparine. Si des substituts à l'héparine sont disponibles, aucun traitement spécifique ne permet à l'heure actuelle de faire face à cet orage thrombotique passant avant tout par une activation plaquettaire. Notre étude a permis de confirmer l'importance de la tyrosine kinase Syk dans l'activation plaquettaire et de montrer son rôle clé dans l'activation monocytaire observée au cours d'une TIH. Ces résultats et ceux très complémentaires de l'équipe de équipe de McKenzie dans un modèle murin de TIH (Reilly et al., 2011) nous conduisent à proposer un inhibiteur de Syk comme médicament candidat dans cette pathologie.

Les drogues ciblant les acteurs de signalisation dans les plaquettes ont-elles une place comme médicament antithrombotique ? Nous avons évoqué les aspects potentiellement négatifs des ces thérapies ciblées qui peuvent affecter l'activité plaquettaire et induire des saignements (Lhermusier et al., 2011, Jandrot-Perrus et al., 2010). A travers l'exemple des inhibiteurs de Syk, nous montrons que dans certaines conditions pathologiques ces nouvelles drogues ciblées pourraient avoir un intérêt thérapeutique en tant qu'inhibiteurs réversibles de l'activation des plaquettes et des monocytes. Cependant, à ce jour, il n'existe pas dans la littérature d'arguments forts pour penser que les inhibiteurs d'acteurs de signalisation puissent détrôner l'aspirine ou les antagonistes du récepteur P2Y<sub>12</sub> de l'ADP en tant que médicament antithrombotique. Les avancées de la recherche fondamentale permettront peut être de mettre en évidence des voies de signalisation spécifiques de certaines situations thrombotiques, comme proposé par l'équipe de S. Jackson avec le ciblage potentiel de la PI3K $\beta$  dans des conditions thrombotiques liées à un flux sanguin élevé et/ou perturbé (Jackson et al., 2005).



La deuxième situation, passant par l'étude du transporteur lipidique ABCA1 dont le rôle dans les fonctions plaquettaires demeurait jusqu'alors incertain, concerne les interactions entre fonction plaquettaire et métabolisme lipidique.

Nos travaux permettent d'écarter ABCA1 en tant que régulateur du taux des lipides majeurs (cholestérol et phospholipides) des membranes plaquettaires et du processus d'exposition des PS dépendant du calcium dans les plaquettes. Nous montrons que ABCA1 peut influencer l'hémostase chez la souris de différentes manières : i) en facilitant spécifiquement les mécanismes d'activation d'acteurs de signalisation plaquettaires tel que Akt et Erk et donc en favorisant l'activation plaquettaire, notamment en présence de faibles doses d'agonistes, ii) en modulant le taux de vitamine K1 qui influence l'activation de certains facteurs de coagulation. De plus, en régulant de façon majeure le taux des HDL circulants, ABCA1 pourrait aussi moduler l'hémostase, en particulier les réponses plaquettaires. Des particules reconstituées de HDL sont actuellement testées pour leur propriétés athéroprotectrices, il sera particulièrement intéressant d'analyser leur impact sur les plaquettes aussi bien in vitro qu'in vivo.

ABCA1 peut-il être une cible thérapeutique ? Des approches thérapeutiques récentes de l'athérosclérose tentent de mettre au point des traitements visant à augmenter le HDL cholestérol. Des stratégies visant à augmenter la fonction de ABCA1 pourraient être développée dans le futur (Khera and Rader, 2010, Degoma and Rader, 2011). Les effets plaquettaires de telles approches restent à déterminer. Dans ce contexte, il sera important d'analyser comment ABCA1 régule la signalisation plaquettaire ; agit-il comme un récepteur capable d'initier par lui-même des voie de signalisation comme cela est suggéré dans certains modèles ou bien est-il un facilitateur de la formation de complexes de signalisation ? Quoiqu'il en soit toute stratégie thérapeutique visant ABCA1 ne peut être envisagée sans une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'activité de ce transporteur et des voies de signalisation qu'il est capable d'initier.

## Références bibliographiques

1994. Randomized trial of ridogrel, a combined thromboxane A<sub>2</sub> synthase inhibitor and thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, versus aspirin as adjunct to thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. The Ridogrel Versus Aspirin Patency Trial (RAPT). *Circulation*, 89, 588-95.
2009. The Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome (TRA\*<sup>2</sup>CER) trial: study design and rationale. *Am Heart J*, 158, 327-334 e4.
- ABRAMS, C. S. 2005. Intracellular signaling in platelets. *Curr Opin Hematol*, 12, 401-5.
- ACHARYA, S. S. & DIMICHELE, D. M. 2008. Rare inherited disorders of fibrinogen. *Haemophilia*, 14, 1151-8.
- ALBRECHT, C., MCVEY, J. H., ELLIOTT, J. I., SARDINI, A., KASZA, I., MUMFORD, A. D., NAOUMOVA, R. P., TUDDENHAM, E. G., SZABO, K. & HIGGINS, C. F. 2005. A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood*, 106, 542-9.
- AMIRAL, J., BRIDEY, F., DREYFUS, M., VISSOC, A. M., FRESSINAUD, E., WOLF, M. & MEYER, D. 1992. Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost*, 68, 95-6.
- AMIRAL, J., LORMEAU, J. C., MARFAING-KOKA, A., VISSAC, A. M., WOLF, M., BOYER-NEUMANN, C., TARDY, B., HERBERT, J. M. & MEYER, D. 1997. Absence of cross-reactivity of SR90107A/ORG31540 pentasaccharide with antibodies to heparin-PF4 complexes developed in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 8, 114-7.
- ANDRE, P., DENIS, C. V., WARE, J., SAFFARIPOUR, S., HYNES, R. O., RUGGERI, Z. M. & WAGNER, D. D. 2000. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood*, 96, 3322-8.
- ANDREWS, R. K., GARDINER, E. E., SHEN, Y., WHISSTOCK, J. C. & BERNDT, M. C. 2003. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 1170-4.
- ANDREWS, R. K., MUNDAY, A. D., MITCHELL, C. A. & BERNDT, M. C. 2001. Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood*, 98, 681-7.
- ANDREWS, R. K., SHEN, Y., GARDINER, E. E., DONG, J. F., LOPEZ, J. A. & BERNDT, M. C. 1999. The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost*, 82, 357-64.

- ANDREWS, R. K., SUZUKI-INOUE, K., SHEN, Y., TULASNE, D., WATSON, S. P. & BERNDT, M. C. 2002. Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of platelet glycoprotein VI. *Blood*, 99, 4219-21.
- ANGIOLILLO, D. J., BERNARDO, E., SABATE, M., JIMENEZ-QUEVEDO, P., COSTA, M. A., PALAZUELOS, J., HERNANDEZ-ANTOLIN, R., MORENO, R., ESCANED, J., ALFONSO, F., BANUELOS, C., GUZMAN, L. A., BASS, T. A., MACAYA, C. & FERNANDEZ-ORTIZ, A. 2007. Impact of platelet reactivity on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 50, 1541-7.
- AREPALLY, G. M. & MAYER, I. M. 2001. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia stimulate monocytic cells to express tissue factor and secrete interleukin-8. *Blood*, 98, 1252-4.
- BARLAGE, S., BOETTCHER, D., BOETTCHER, A., DADA, A. & SCHMITZ, G. 2006. High density lipoprotein modulates platelet function. *Cytometry A*, 69, 196-9.
- BATCHELOR, W. B., TOLLESON, T. R., HUANG, Y., LARSEN, R. L., MANTELL, R. M., DILLARD, P., DAVIDIAN, M., ZHANG, D., CANTOR, W. J., SKETCH, M. H., JR., OHMAN, E. M., ZIDAR, J. P., GRETTLER, D., DIBATTISTE, P. M., TCHENG, J. E., CALIFF, R. M. & HARRINGTON, R. A. 2002. Randomized COMparison of platelet inhibition with abciximab, tiRofiban and eptifibatide during percutaneous coronary intervention in acute coronary syndromes: the COMPARE trial. Comparison Of Measurements of Platelet aggregation with Aggrastat, Reopro, and Eptifibatide. *Circulation*, 106, 1470-6.
- BEKTAS, M., SAVAS, B., CETINKAYA, H., ENSARI, A., OZTAS, E., CAN, B. & OZDEN, A. 2008. An unusual presentation of Tangier disease with gallbladder involvement. *Acta Gastroenterol Belg*, 71, 397-400.
- BENNETT, J. S., ZIGMOND, S., VILAIRE, G., CUNNINGHAM, M. E. & BEDNAR, B. 1999. The platelet cytoskeleton regulates the affinity of the integrin alpha(IIb)beta(3) for fibrinogen. *J Biol Chem*, 274, 25301-7.
- BERLANGA, O., BOBE, R., BECKER, M., MURPHY, G., LEDUC, M., BON, C., BARRY, F. A., GIBBINS, J. M., GARCIA, P., FRAMPTON, J. & WATSON, S. P. 2000. Expression of the collagen receptor glycoprotein VI during megakaryocyte differentiation. *Blood*, 96, 2740-5.
- BEST, D., SENIS, Y. A., JARVIS, G. E., EAGLETON, H. J., ROBERTS, D. J., SAITO, T., JUNG, S. M., MOROI, M., HARRISON, P., GREEN, F. R. & WATSON, S. P. 2003. GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood*, 102, 2811-8.
- BEUMER, S., HEIJNEN-SNYDER, G. J., MJ, I. J., DE GROOT, P. G. & SIXMA, J. J. 2000. Fibronectin in an extracellular matrix of cultured endothelial cells supports platelet adhesion via its ninth type III repeat : A comparison with platelet adhesion to isolated fibronectin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, E16-25.
- BEUMER, S., MJ, I. J., DE GROOT, P. G. & SIXMA, J. J. 1994. Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of

- platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood*, 84, 3724-33.
- BEVERS, E. M., COMFURIUS, P. & ZWAAL, R. F. 1983. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta*, 736, 57-66.
- BJORKMAN, D. J. 1998. The effect of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandins. *Am J Med*, 105, 8S-12S.
- BLANK, M., SHOENFELD, Y., TAVOR, S., PRAPROTNIK, S., BOFFA, M. C., WEKSLER, B., WALENGA, M. J., AMIRAL, J. & ELDOR, A. 2002. Anti-platelet factor 4/heparin antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia provoke direct activation of microvascular endothelial cells. *Int Immunol*, 14, 121-9.
- BODIN, S., GIURIATO, S., RAGAB, J., HUMBEL, B. M., VIALA, C., VIEU, C., CHAP, H. & PAYRASTRE, B. 2001. Production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidic acid in platelet rafts: evidence for a critical role of cholesterol-enriched domains in human platelet activation. *Biochemistry*, 40, 15290-9.
- BODIN, S., SOULET, C., TRONCHERE, H., SIE, P., GACHET, C., PLANTAVID, M. & PAYRASTRE, B. 2005. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. *J Cell Sci*, 118, 759-69.
- BODIN, S., TRONCHERE, H. & PAYRASTRE, B. 2003. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta*, 1610, 247-57.
- BODZIOCH, M., ORSO, E., KLUCKEN, J., LANGMANN, T., BOTTCHER, A., DIEDERICH, W., DROBNIK, W., BARLAGE, S., BUCHLER, C., PORSCH-OZCURUMEZ, M., KAMINSKI, W. E., HAHMANN, H. W., OETTE, K., ROTHE, G., ASLANIDIS, C., LACKNER, K. J. & SCHMITZ, G. 1999. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*, 22, 347-51.
- BOHM, S. K., KONG, W., BROMME, D., SMEEKENS, S. P., ANDERSON, D. C., CONNOLLY, A., KAHN, M., NELKEN, N. A., COUGHLIN, S. R., PAYAN, D. G. & BUNNETT, N. W. 1996. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J*, 314 ( Pt 3), 1009-16.
- BOUMAN, H. J., SCHOMIG, E., VAN WERKUM, J. W., VELDER, J., HACKENG, C. M., HIRSCHHAUSER, C., WALDMANN, C., SCHMALZ, H. G., TEN BERG, J. M. & TAUBERT, D. 2011. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med*, 17, 110-6.
- BOUSSER, M. G., AMARENCO, P., CHAMORRO, A., FISHER, M., FORD, I., FOX, K. M., HENNERICI, M. G., MATTLE, H. P., ROTHWELL, P. M., DE CORDOUE, A. & FRATACCI, M. D. 2011. Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events (PERFORM): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet*, 377, 2013-22.
- BRANDT, J. T., CLOSE, S. L., ITURRIA, S. J., PAYNE, C. D., FARID, N. A., ERNEST, C. S., 2ND, LACHNO, D. R., SALAZAR, D. & WINTERS, K. J. 2007. Common

- polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost*, 5, 2429-36.
- BROCCARDO, C., LUCIANI, M. & CHIMINI, G. 1999. The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1461, 395-404.
- BROOKS, M. B., CATALFAMO, J. L., ETTER, K., BRISBIN, A. & BUSTAMANTE, C. D. 2008. Exclusion of ABCA-1 as a candidate gene for canine Scott syndrome. *J Thromb Haemost*, 6, 1608-10.
- BROOKS-WILSON, A., MARCIL, M., CLEE, S. M., ZHANG, L. H., ROOMP, K., VAN DAM, M., YU, L., BREWER, C., COLLINS, J. A., MOLHUIZEN, H. O., LOUBSER, O., OUELETTE, B. F., FICHTER, K., ASHBOURNE-EXCOFFON, K. J., SENSEN, C. W., SCHERER, S., MOTT, S., DENIS, M., MARTINDALE, D., FROHLICH, J., MORGAN, K., KOOP, B., PIMSTONE, S., KASTELEIN, J. J., GENEST, J., JR. & HAYDEN, M. R. 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*, 22, 336-45.
- BURGESS, J. K., LINDEMAN, R., CHESTERMAN, C. N. & CHONG, B. H. 1995. Single amino acid mutation of Fc gamma receptor is associated with the development of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 91, 761-6.
- BURNSTOCK, G. 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, 64, 1471-83.
- CADROY, Y., LEMOZY, S., DIQUELOU, A., FERRIERES, J., DOUSTE-BLAZY, P., BONEU, B. & SAKARIASSEN, K. S. 1993. Human type II hyperlipoproteinemia enhances platelet-collagen adhesion in flowing nonanticoagulated blood. *Arterioscler Thromb*, 13, 1650-3.
- CALDERWOOD, D. A., SHATTIL, S. J. & GINSBERG, M. H. 2000. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem*, 275, 22607-10.
- CALKIN, A. C., DREW, B. G., ONO, A., DUFFY, S. J., GORDON, M. V., SCHOENWAEELDER, S. M., SVIRIDOV, D., COOPER, M. E., KINGWELL, B. A. & JACKSON, S. P. 2009. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation*, 120, 2095-104.
- CANOBBIO, I., BALDUINI, C. & TORTI, M. 2004. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal*, 16, 1329-44.
- CARLSON, J. A. & MAESNER, J. E. 1994. Fatal neutropenia and thrombocytopenia associated with ticlopidine. *Ann Pharmacother*, 28, 1236-8.
- CARLSSON, L. E., SANTOSO, S., BAURICHTER, G., KROLL, H., PAPENBERG, S., EICHLER, P., WESTERDAAL, N. A., KIEFEL, V., VAN DE WINKEL, J. G. & GREINACHER, A. 1998. Heparin-induced thrombocytopenia: new insights into the impact of the FcgammaRIIa-R-H131 polymorphism. *Blood*, 92, 1526-31.

- CARVALHO, A. C., COLMAN, R. W. & LEES, R. S. 1974. Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med*, 290, 434-8.
- CATTANEO, M. 2005. The P2 receptors and congenital platelet function defects. *Semin Thromb Hemost*, 31, 168-73.
- CATTANEO, M. 2007. Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 5, 45-55.
- CHACKO, G. W., BRANDT, J. T., COGGESHALL, K. M. & ANDERSON, C. L. 1996. Phosphoinositide 3-kinase and p72syk noncovalently associate with the low affinity Fc gamma receptor on human platelets through an immunoreceptor tyrosine-based activation motif. Reconstitution with synthetic phosphopeptides. *J Biol Chem*, 271, 10775-81.
- CHRISTIANSEN-WEBER, T. A., VOLAND, J. R., WU, Y., NGO, K., ROLAND, B. L., NGUYEN, S., PETERSON, P. A. & FUNG-LEUNG, W. P. 2000. Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency. *Am J Pathol*, 157, 1017-29.
- CIFUNI, S. M., WAGNER, D. D. & BERGMEIER, W. 2008. CalDAG-GEFI and protein kinase C represent alternative pathways leading to activation of integrin alphaIIb beta3 in platelets. *Blood*, 112, 1696-703.
- CINES, D. B., TOMASKI, A. & TANNENBAUM, S. 1987. Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 316, 581-9.
- CLEMETSON, K. J. 1995. Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost*, 74, 111-6.
- CLEMETSON, K. J. & CLEMETSON, J. M. 2001. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost*, 86, 189-97.
- COLLER, B. S. 1997. Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J Clin Invest*, 99, 1467-71.
- COMBES, V., COLTEL, N., ALIBERT, M., VAN ECK, M., RAYMOND, C., JUHAN-VAGUE, I., GRAU, G. E. & CHIMINI, G. 2005. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am J Pathol*, 166, 295-302.
- COUGHLIN, S. R. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407, 258-64.
- COUGHLIN, S. R. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*, 3, 1800-14.
- CRANMER, S. L., PIKOVSKI, I., MANGIN, P., THOMPSON, P. E., DOMAGALA, T., FRAZZETTO, M., SALEM, H. H. & JACKSON, S. P. 2005. Identification of a unique filamin A binding region within the cytoplasmic domain of glycoprotein Iba1. *Biochem J*, 387, 849-58.

- CRITTENDEN, J. R., BERGMEIER, W., ZHANG, Y., PIFFATH, C. L., LIANG, Y., WAGNER, D. D., HOUSMAN, D. E. & GRAYBIEL, A. M. 2004. CaLDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat Med*, 10, 982-6.
- CUISSET, T., FRERE, C., QUILICI, J., BARBOU, F., MORANGE, P. E., HOVASSE, T., BONNET, J. L. & ALESSI, M. C. 2006. High post-treatment platelet reactivity identified low-responders to dual antiplatelet therapy at increased risk of recurrent cardiovascular events after stenting for acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost*, 4, 542-9.
- CUISSET, T., MORANGE, P. E., QUILICI, J., BONNET, J. L., GACHET, C. & ALESSI, M. C. 2011. Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. *Nat Med*, 17, 1039; author reply 1042-4.
- DAVI, G. & PATRONO, C. 2007. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*, 357, 2482-94.
- DEGOMA, E. M. & RADER, D. J. 2011. Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies. *Nat Rev Cardiol*, 8, 266-77.
- DEKKERS, D. W., COMFURIUS, P., SCHROIT, A. J., BEVERS, E. M. & ZWAAL, R. F. 1998. Transbilayer movement of NBD-labeled phospholipids in red blood cell membranes: outward-directed transport by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Biochemistry*, 37, 14833-7.
- DJELLAS, Y., MANGANELLO, J. M., ANTONAKIS, K. & LE BRETON, G. C. 1999. Identification of Galpha13 as one of the G-proteins that couple to human platelet thromboxane A2 receptors. *J Biol Chem*, 274, 14325-30.
- DU, X. 2007. Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Curr Opin Hematol*, 14, 262-9.
- DUONG, P. T., COLLINS, H. L., NICKEL, M., LUND-KATZ, S., ROTHBLAT, G. H. & PHILLIPS, M. C. 2006. Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I. *J Lipid Res*, 47, 832-43.
- ESLIN, D. E., ZHANG, C., SAMUELS, K. J., RAUOVA, L., ZHAI, L., NIEWIAROWSKI, S., CINES, D. B., PONCZ, M. & KOWALSKA, M. A. 2004. Transgenic mice studies demonstrate a role for platelet factor 4 in thrombosis: dissociation between anticoagulant and antithrombotic effect of heparin. *Blood*, 104, 3173-80.
- EZUMI, Y., SHINDOH, K., TSUJI, M. & TAKAYAMA, H. 1998. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets. *J Exp Med*, 188, 267-76.
- FARUQI, T. R., WEISS, E. J., SHAPIRO, M. J., HUANG, W. & COUGHLIN, S. R. 2000. Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. *J Biol Chem*, 275, 19728-34.

- FENTON, J. W., 2ND 1995. Thrombin functions and antithrombotic intervention. *Thromb Haemost*, 74, 493-8.
- FITZGERALD, M. L., MENDEZ, A. J., MOORE, K. J., ANDERSSON, L. P., PANJETON, H. A. & FREEMAN, M. W. 2001. ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH<sub>2</sub>-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space. *J Biol Chem*, 276, 15137-45.
- FITZGERALD, M. L., MORRIS, A. L., RHEE, J. S., ANDERSSON, L. P., MENDEZ, A. J. & FREEMAN, M. W. 2002. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*, 277, 33178-87.
- FRANCHINI, M. 2006. Hemostasis and aging. *Crit Rev Oncol Hematol*, 60, 144-51.
- FREDRICKSON, D. S. 1964. The Inheritance of High Density Lipoprotein Deficiency (Tangier Disease). *J Clin Invest*, 43, 228-36.
- FRESSINAUD, E. & MEYER, D. 2005. [Von Willebrand disease: from diagnosis to treatment]. *Rev Prat*, 55, 2209-18.
- FURIE, B. & FURIE, B. C. 2008. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*, 359, 938-49.
- FURLONG, M. T., MAHRENHOLZ, A. M., KIM, K. H., ASHENDEL, C. L., HARRISON, M. L. & GEAHLEN, R. L. 1997. Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim Biophys Acta*, 1355, 177-90.
- GACHET, C., LEON, C. & HECHLER, B. 2006. The platelet P2 receptors in arterial thrombosis. *Blood Cells Mol Dis*, 36, 223-7.
- GAWAZ, M. 2003. Do platelets trigger atherosclerosis? *Thromb Haemost*, 90, 971-2.
- GAWAZ, M. 2006. Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Mol Dis*, 36, 206-10.
- GAWAZ, M., BRAND, K., DICKFELD, T., POGATSA-MURRAY, G., PAGE, S., BOGNER, C., KOCH, W., SCHOMIG, A. & NEUMANN, F. 2000. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*, 148, 75-85.
- GAWAZ, M., LANGER, H. & MAY, A. E. 2005. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*, 115, 3378-84.
- GIBBINS, J. M. 2004. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci*, 117, 3415-25.
- GIROLAMI, B., PRANDONI, P., STEFANI, P. M., TANDUO, C., SABBION, P., EICHLER, P., RAMON, R., BAGGIO, G., FABRIS, F. & GIROLAMI, A. 2003. The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in hospitalized medical patients



- treated with subcutaneous unfractionated heparin: a prospective cohort study. *Blood*, 101, 2955-9.
- GIURIATO, S., BODIN, S., ERNEUX, C., WOSCHOLSKI, R., PLANTAVID, M., CHAP, H. & PAYRASTRE, B. 2000. pp60c-src associates with the SH2-containing inositol-5-phosphatase SHIP1 and is involved in its tyrosine phosphorylation downstream of alphaIIb beta3 integrin in human platelets. *Biochem J*, 348 Pt 1, 107-12.
- GOTO, S., TAMURA, N., SAKAKIBARA, M., IKEDA, Y. & HANDA, S. 2001. Effects of ticlopidine on von Willebrand factor-mediated shear-induced platelet activation and aggregation. *Platelets*, 12, 406-14.
- GRATACAP, M. P., MARTIN, V., VALERA, M. C., ALLART, S., GARCIA, C., SIE, P., RECHER, C. & PAYRASTRE, B. 2009. The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo. *Blood*, 114, 1884-92.
- GRATACAP, M. P., PAYRASTRE, B., NIESWANDT, B. & OFFERMANN, S. 2001. Differential regulation of Rho and Rac through heterotrimeric G-proteins and cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, 276, 47906-13.
- GRATACAP, M. P., PAYRASTRE, B., VIALA, C., MAUCO, G., PLANTAVID, M. & CHAP, H. 1998. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C-gamma2 is an early key event in Fc gamma RIIA-mediated activation of human platelets. *J Biol Chem*, 273, 24314-21.
- GREINACHER, A., POTZSCH, B., AMIRAL, J., DUMMEL, V., EICHNER, A. & MUELLER-ECKHARDT, C. 1994. Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen. *Thromb Haemost*, 71, 247-51.
- GREINACHER, A., VOLPEL, H., JANSSENS, U., HACH-WUNDERLE, V., KEMKES-MATTHES, B., EICHLER, P., MUELLER-VELTEN, H. G. & POTZSCH, B. 1999. Recombinant hirudin (lepirudin) provides safe and effective anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study. *Circulation*, 99, 73-80.
- GUINEBAULT, C., PAYRASTRE, B., RACAUD-SULTAN, C., MAZARGUIL, H., BRETON, M., MAUCO, G., PLANTAVID, M. & CHAP, H. 1995. Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involves specific interactions of p85 alpha with actin filaments and focal adhesion kinase. *J Cell Biol*, 129, 831-42.
- HAMBERG, M., SVENSSON, J., WAKABAYASHI, T. & SAMUELSSON, B. 1974. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 345-9.
- HAMON, Y., BROCCARDO, C., CHAMBENOIT, O., LUCIANI, M. F., TOTI, F., CHASLIN, S., FREYSSINET, J. M., DEVAUX, P. F., MCNEISH, J., MARGUET, D. & CHIMINI, G. 2000. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol*, 2, 399-406.

- HARMON, J. T., TANDON, N. N., HOEG, J. M. & JAMIESON, G. A. 1986. Thrombin binding and response in platelets from patients with dyslipoproteinemias: increased stimulus-response coupling in type II hyperlipoproteinemia. *Blood*, 68, 498-505.
- HARPER, M. T. & POOLE, A. W. 2007. Isoform-specific functions of protein kinase C: the platelet paradigm. *Biochem Soc Trans*, 35, 1005-8.
- HARTWIG, J. & ITALIANO, J., JR. 2003. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost*, 1, 1580-6.
- HASS, W. K., EASTON, J. D., ADAMS, H. P., JR., PRYSE-PHILLIPS, W., MOLONY, B. A., ANDERSON, S. & KAMM, B. 1989. A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. Ticlopidine Aspirin Stroke Study Group. *N Engl J Med*, 321, 501-7.
- HATTORI, R., KODAMA, K., TAKATSU, F., YUI, Y. & KAWAI, C. 1991. Randomized trial of a selective inhibitor of thromboxane A<sub>2</sub> synthetase, (E)-7-phenyl-7-(3-pyridyl)-6-heptenoic acid (CV-4151), for prevention of restenosis after coronary angioplasty. *Jpn Circ J*, 55, 324-9.
- HECHLER, B., LEON, C., VIAL, C., VIGNE, P., FRELIN, C., CAZENAVE, J. P. & GACHET, C. 1998. The P2Y<sub>1</sub> receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood*, 92, 152-9.
- HECHLER, B., NONNE, C., ECKLY, A., MAGNENAT, S., RINCKEL, J. Y., DENIS, C. V., FREUND, M., CAZENAVE, J. P., LANZA, F. & GACHET, C. 2010. Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb Haemost*, 8, 173-84.
- HEEMSKERK, J. W., BEVERS, E. M. & LINDHOUT, T. 2002. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*, 88, 186-93.
- HEEMSKERK, J. W., FEIJGE, M. A., SIMONIS, M. A. & HORNSTRA, G. 1995. Effects of dietary fatty acids on signal transduction and membrane cholesterol content in rat platelets. *Biochim Biophys Acta*, 1255, 87-97.
- HERBERT, J. M., SAVI, P., JESKE, W. P. & WALENGA, J. M. 1998. Effect of SR121566A, a potent GP IIb-IIIa antagonist, on the HIT serum/heparin-induced platelet mediated activation of human endothelial cells. *Thromb Haemost*, 80, 326-31.
- HIGGINS, C. F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 8, 67-113.
- HIRATA, M., HAYASHI, Y., USHIKUBI, F., YOKOTA, Y., KAGEYAMA, R., NAKANISHI, S. & NARUMIYA, S. 1991. Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *Nature*, 349, 617-20.
- HOLMES, D. R., JR., KEREIAKES, D. J., GARG, S., SERRUYS, P. W., DEHMER, G. J., ELLIS, S. G., WILLIAMS, D. O., KIMURA, T. & MOLITERNO, D. J. 2010. Stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol*, 56, 1357-65.

- HOLMES, M. B., SOBEL, B. E., CANNON, C. P. & SCHNEIDER, D. J. 2000. Increased platelet reactivity in patients given orbofiban after an acute coronary syndrome: an OPUS-TIMI 16 substudy. Orbofiban in Patients with Unstable coronary syndromes. Thrombolysis In Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*, 85, 491-3, A10.
- HOLT, J. C. & NIEWIAROWSKI, S. 1985. Biochemistry of alpha granule proteins. *Semin Hematol*, 22, 151-63.
- HOOPER, A. J., ROBERTSON, K., NG, L., KATTAMPALLIL, J. S., LATCHEM, D., WILLISHER, P. C., THOM, J., BAKER, R. I. & BURNETT, J. R. 2009. A novel ABCA1 nonsense mutation, R1270X, in Tangier disease associated with an unrecognised bleeding tendency. *Clin Chim Acta*, 409, 136-9.
- HUANG, Y., VON ECKARDSTEIN, A., WU, S., LANGER, C. & ASSMANN, G. 1995. Generation of pre-beta 1-HDL and conversion into alpha-HDL. Evidence for disturbed HDL conversion in Tangier disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15, 1746-54.
- HULOT, J. S., BURA, A., VILLARD, E., AZIZI, M., REMONES, V., GOYENVALLE, C., AIACH, M., LECHAT, P. & GAUSSEM, P. 2006. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood*, 108, 2244-7.
- HUMPHRIES, M. J. 2000. Integrin structure. *Biochem Soc Trans*, 28, 311-39.
- HUO, Y. & LEY, K. F. 2004. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 14, 18-22.
- HYDE, S. C., EMSLEY, P., HARTSHORN, M. J., MIMMACK, M. M., GILEADI, U., PEARCE, S. R., GALLAGHER, M. P., GILL, D. R., HUBBARD, R. E. & HIGGINS, C. F. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 346, 362-5.
- INOUE, O., SUZUKI-INOUE, K., DEAN, W. L., FRAMPTON, J. & WATSON, S. P. 2003. Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2. *J Cell Biol*, 160, 769-80.
- JACKSON, S. P. 2007. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*, 109, 5087-95.
- JACKSON, S. P., MISTRY, N. & YUAN, Y. 2000. Platelets and the injured vessel wall--"rolling into action": focus on glycoprotein Ib/V/IX and the platelet cytoskeleton. *Trends Cardiovasc Med*, 10, 192-7.
- JACKSON, S. P., NESBITT, W. S. & KULKARNI, S. 2003. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost*, 1, 1602-12.
- JACKSON, S. P., SCHOENWAEELDER, S. M., GONCALVES, I., NESBITT, W. S., YAP, C. L., WRIGHT, C. E., KENCHE, V., ANDERSON, K. E., DOPHEIDE, S. M., YUAN, Y., STURGEON, S. A., PRABAHARAN, H., THOMPSON, P. E., SMITH, G. D., SHEPHERD, P. R., DANIELE, N., KULKARNI, S., ABBOTT, B., SAYLIK, D., JONES, C., LU, L., GIULIANO, S., HUGHAN, S. C., ANGUS, J. A., ROBERTSON, A. D. & SALEM, H. H. 2005. PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med*, 11, 507-14.

- JAFFE, E. A., HOYER, L. W. & NACHMAN, R. L. 1974. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 1906-9.
- JAKUBOWSKI, J. A., MATSUSHIMA, N., ASAI, F., NAGANUMA, H., BRANDT, J. T., HIROTA, T., FREESTONE, S. & WINTERS, K. J. 2007. A multiple dose study of prasugrel (CS-747), a novel thienopyridine P2Y<sub>12</sub> inhibitor, compared with clopidogrel in healthy humans. *Br J Clin Pharmacol*, 63, 421-30.
- JANDROT-PERRUS, M., BUSFIELD, S., LAGRUE, A. H., XIONG, X., DEBILI, N., CHICKERING, T., LE COUEDIC, J. P., GOODEARL, A., DUSSAULT, B., FRASER, C., VAINCHENKER, W. & VILLEVAL, J. L. 2000. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood*, 96, 1798-807.
- JANDROT-PERRUS, M., GRATACAP, M. P., LHERMUSIER, T., SIÉ, P. & PAYRASTRE, B. 2010. Nouvelles molécules ciblées et modulation des fonctions plaquettaires : anticiper, démontrer, gérer, utiliser. *Hématologie*, 16, 345-54.
- JANZON, L., BERGQVIST, D., BOBERG, J., BOBERG, M., ERIKSSON, I., LINDGARDE, F., PERSSON, G., ALMGREN, B., FAGHER, B., KJELLSTROM, T. & ET AL. 1990. Prevention of myocardial infarction and stroke in patients with intermittent claudication; effects of ticlopidine. Results from STIMS, the Swedish Ticlopidine Multicentre Study. *J Intern Med*, 227, 301-8.
- JUNG, S. M. & MOROI, M. 2000. Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1). *J Biol Chem*, 275, 8016-26.
- KAHN, M. L., NAKANISHI-MATSUI, M., SHAPIRO, M. J., ISHIHARA, H. & COUGHLIN, S. R. 1999. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest*, 103, 879-87.
- KAMP, D. & HAEST, C. W. 1998. Evidence for a role of the multidrug resistance protein (MRP) in the outward translocation of NBD-phospholipids in the erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1372, 91-101.
- KASHIWAGI, H., SCHWARTZ, M. A., EIGENTHALER, M., DAVIS, K. A., GINSBERG, M. H. & SHATTIL, S. J. 1997. Affinity modulation of platelet integrin alphaIIb beta3 by beta3-endonexin, a selective binding partner of the beta3 integrin cytoplasmic tail. *J Cell Biol*, 137, 1433-43.
- KELTON, J. G., SHERIDAN, D., SANTOS, A., SMITH, J., STEEVES, K., SMITH, C., BROWN, C. & MURPHY, W. G. 1988. Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies. *Blood*, 72, 925-30.
- KELTON, J. G., SMITH, J. W., SANTOS, A. V., MURPHY, W. G. & HORSEWOOD, P. 1987. Platelet IgG Fc receptor. *Am J Hematol*, 25, 299-310.
- KELTON, J. G., SMITH, J. W., WARKENTIN, T. E., HAYWARD, C. P., DENOMME, G. A. & HORSEWOOD, P. 1994. Immunoglobulin G from patients with heparin-induced thrombocytopenia binds to a complex of heparin and platelet factor 4. *Blood*, 83, 3232-9.

- KHERA, A. V. & RADER, D. J. 2010. Future therapeutic directions in reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep*, 12, 73-81.
- KIELAR, D., DIETMAIER, W., LANGMANN, T., ASLANIDIS, C., PROBST, M., NARUSZEWICZ, M. & SCHMITZ, G. 2001. Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem*, 47, 2089-97.
- KIM, W. S., FITZGERALD, M. L., KANG, K., OKUHIRA, K., BELL, S. A., MANNING, J. J., KOEHN, S. L., LU, N., MOORE, K. J. & FREEMAN, M. W. 2005. Abca7 null mice retain normal macrophage phosphatidylcholine and cholesterol efflux activity despite alterations in adipose mass and serum cholesterol levels. *J Biol Chem*, 280, 3989-95.
- KINSELLA, B. T., O'MAHONY, D. J. & FITZGERALD, G. A. 1997. The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *J Pharmacol Exp Ther*, 281, 957-64.
- KLAGES, B., BRANDT, U., SIMON, M. I., SCHULTZ, G. & OFFERMANN, S. 1999. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol*, 144, 745-54.
- KNEZEVIC, I., BORG, C. & LE BRETON, G. C. 1993. Identification of Gq as one of the G-proteins which copurify with human platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors. *J Biol Chem*, 268, 26011-7.
- KOZIAN, D., PROULLE, V., NITSCHKE, A., GALITZINE, M., MARTINEZ, M. C., SCHUMANN, B., MEYER, D., HERRMANN, M., FREYSSINET, J. M. & KERBIRIOU-NABIAS, D. 2005. Identification of genes involved in Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187-mediated apoptosis and demonstration of a high susceptibility for transcriptional repression of cell cycle genes in B lymphoblasts from a patient with Scott syndrome. *BMC Genomics*, 6, 146.
- KUNG, H. C., HOYERT, D. L., XU, J. & MURPHY, S. L. 2008. Deaths: final data for 2005. *Natl Vital Stat Rep*, 56, 1-120.
- KUNISHIMA, S., KAMIYA, T. & SAITO, H. 2002a. Genetic abnormalities of Bernard-Soulier syndrome. *Int J Hematol*, 76, 319-27.
- KUNISHIMA, S., MATSUSHITA, T., ITO, T., KAMIYA, T. & SAITO, H. 2002b. Novel nonsense mutation in the platelet glycoprotein Ibbeta gene associated with Bernard-Soulier syndrome. *Am J Hematol*, 71, 279-84.
- KUNISHIMA, S., TOMIYAMA, Y., HONDA, S., FUKUNISHI, M., HARA, J., INOUE, C., KAMIYA, T. & SAITO, H. 2000. Homozygous Pro74-->Arg mutation in the platelet glycoprotein Ibbeta gene associated with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost*, 84, 112-7.
- KUNISHIMA, S., TOMIYAMA, Y., HONDA, S., KURATA, Y., KAMIYA, T., OZAWA, K. & SAITO, H. 1999. Cys97-->Tyr mutation in the glycoprotein IX gene associated with Bernard-Soulier syndrome. *Br J Haematol*, 107, 539-45.

- KUPINSKI, J. M. & MILLER, J. L. 1985. Multimeric analysis of von Willebrand factor in megakaryocytes. *Thromb Res*, 38, 603-10.
- LAFFARGUE, M., MONNEREAU, L., TUECH, J., RAGAB, A., RAGAB-THOMAS, J., PAYRASTRE, B., RAYNAL, P. & CHAP, H. 1997. Integrin-dependent tyrosine phosphorylation and cytoskeletal translocation of Tec in thrombin-activated platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, 238, 247-51.
- LAMBERT, M. P., SACHAIS, B. S. & KOWALSKA, M. A. 2007. Chemokines and thrombogenicity. *Thromb Haemost*, 97, 722-9.
- LANE, D. A., IRELAND, H., WOLFF, S., RANASINGHE, E. & DAWES, J. 1984. Detection of enhanced in vivo platelet alpha-granule release in different patient groups--comparison of beta-thromboglobulin, platelet factor 4 and thrombospondin assays. *Thromb Haemost*, 52, 183-7.
- LAWN, R. M., WADE, D. P., COUSE, T. L. & WILCOX, J. N. 2001. Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 378-85.
- LEJEUNE, J., THIBAUT, G., CARTRON, G., OHRESSER, M. & WATIER, H. 2010. [Implications of receptors for the Fc portion of IgG (FcγRs) in mechanism of action of therapeutic antibodies]. *Bull Cancer*, 97, 511-22.
- LEON, C., HECHLER, B., FREUND, M., ECKLY, A., VIAL, C., OHLMANN, P., DIERICH, A., LEMEURE, M., CAZENAVE, J. P. & GACHET, C. 1999. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y<sub>1</sub> receptor-null mice. *J Clin Invest*, 104, 1731-7.
- LESLIE, M. 2010. Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets. *Science*, 328, 562-4.
- LEVESQUE, H. & LAFONT, O. 2000. [Aspirin throughout the ages: a historical review]. *Rev Med Interne*, 21 Suppl 1, 8s-17s.
- LEWIS, B. E., WALLIS, D. E., BERKOWITZ, S. D., MATTHAI, W. H., FAREED, J., WALENGA, J. M., BARTHOLOMEW, J., SHAM, R., LERNER, R. G., ZEIGLER, Z. R., RUSTAGI, P. K., JANG, I. K., RIFKIN, S. D., MORAN, J., HURSTING, M. J. & KELTON, J. G. 2001. Argatroban anticoagulant therapy in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation*, 103, 1838-43.
- LHERMUSIER, T., VAN ROTHEM, J., GARCIA, C., GRATACAP, M. P. & PAYRASTRE, B. 2011. Targeted drug therapy: the platelet side. *Platelets*, 22, 479-84.
- LI, Z. Q., LIU, W., PARK, K. S., SACHAIS, B. S., AREPALLY, G. M., CINES, D. B. & PONCZ, M. 2002. Defining a second epitope for heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis antibodies using KKO, a murine HIT-like monoclonal antibody. *Blood*, 99, 1230-6.
- LIU, Y. & TANG, C. 2011. Regulation of ABCA1 functions by signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*.

- LO, G. K., JUHL, D., WARKENTIN, T. E., SIGOUIN, C. S., EICHLER, P. & GREINACHER, A. 2006. Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost*, 4, 759-65.
- LOVA, P., PAGANINI, S., HIRSCH, E., BARBERIS, L., WYMANN, M., SINIGAGLIA, F., BALDUINI, C. & TORTI, M. 2003. A selective role for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in the Gi-dependent activation of platelet Rap1B. *J Biol Chem*, 278, 131-8.
- LOVA, P., PAGANINI, S., SINIGAGLIA, F., BALDUINI, C. & TORTI, M. 2002. A Gi-dependent pathway is required for activation of the small GTPase Rap1B in human platelets. *J Biol Chem*, 277, 12009-15.
- LUCIANI, M. F., DENIZOT, F., SAVARY, S., MATTEI, M. G. & CHIMINI, G. 1994. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics*, 21, 150-9.
- MA, X. Y., LIU, J. P. & SONG, Z. Y. 2011. Associations of the ATP-binding cassette transporter A1 R219K polymorphism with HDL-C level and coronary artery disease risk: a meta-analysis. *Atherosclerosis*, 215, 428-34.
- MA, Y., ASHRAF, M. Z. & PODREZ, E. A. 2010. Scavenger receptor BI modulates platelet reactivity and thrombosis in dyslipidemia. *Blood*, 116, 1932-41.
- MANKA, D., FORLOW, S. B., SANDERS, J. M., HURWITZ, D., BENNETT, D. K., GREEN, S. A., LEY, K. & SAREMBOCK, I. J. 2004. Critical role of platelet P-selectin in the response to arterial injury in apolipoprotein-E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1124-9.
- MARTEL, N., LEE, J. & WELLS, P. S. 2005. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. *Blood*, 106, 2710-5.
- MARTIN, V., GUILLERMET-GUIBERT, J., CHICANNE, G., CABOU, C., JANDROT-PERRUS, M., PLANTAVID, M., VANHAESEBROECK, B., PAYRASTRE, B. & GRATACAP, M. P. 2010. Deletion of the p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase in platelets reveals its central role in Akt activation and thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood*, 115, 2008-13.
- MASSBERG, S., BRAND, K., GRUNER, S., PAGE, S., MULLER, E., MULLER, I., BERGMEIER, W., RICHTER, T., LORENZ, M., KONRAD, I., NIESWANDT, B. & GAWAZ, M. 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*, 196, 887-96.
- MASSBERG, S., GAWAZ, M., GRUNER, S., SCHULTE, V., KONRAD, I., ZOHLNHOFER, D., HEINZMANN, U. & NIESWANDT, B. 2003. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med*, 197, 41-9.
- MATETZKY, S., SHENKMAN, B., GUETTA, V., SHECHTER, M., BIENART, R., GOLDENBERG, I., NOVIKOV, I., PRES, H., SAVION, N., VARON, D. & HOD, H.

2004. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 109, 3171-5.
- MATSUMOTO, Y., TAKIZAWA, H., NAKAMA, K., GONG, X., YAMADA, Y., TANDON, N. N. & KAMBAYASHI, J. 2006. Ex vivo evaluation of anti-GPVI antibody in cynomolgus monkeys: dissociation between anti-platelet aggregatory effect and bleeding time. *Thromb Haemost*, 96, 167-75.
- MCNEISH, J., AIELLO, R. J., GUYOT, D., TURI, T., GABEL, C., ALDINGER, C., HOPPE, K. L., ROACH, M. L., ROYER, L. J., DE WET, J., BROCCARDO, C., CHIMINI, G. & FRANCONI, O. L. 2000. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4245-50.
- MEGA, J. L., CLOSE, S. L., WIVIOTT, S. D., SHEN, L., HOCKETT, R. D., BRANDT, J. T., WALKER, J. R., ANTMAN, E. M., MACIAS, W., BRAUNWALD, E. & SABATINE, M. S. 2009. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med*, 360, 354-62.
- MENDOLICCHIO, G. L. & RUGGERI, Z. M. 2005. New perspectives on von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol*, 42, 5-14.
- MILLER, G. J. & MILLER, N. E. 1975. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet*, 1, 16-9.
- MIRANTI, C. K., LENG, L., MASCHBERGER, P., BRUGGE, J. S. & SHATTIL, S. J. 1998. Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol*, 8, 1289-99.
- MIURA, Y., TAKAHASHI, T., JUNG, S. M. & MOROI, M. 2002. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J Biol Chem*, 277, 46197-204.
- MOROI, M. & JUNG, S. M. 2004. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res*, 114, 221-33.
- MOROI, M., ONITSUKA, I., IMAIZUMI, T. & JUNG, S. M. 2000. Involvement of activated integrin alpha2beta1 in the firm adhesion of platelets onto a surface of immobilized collagen under flow conditions. *Thromb Haemost*, 83, 769-76.
- MULLER, I., BESTA, F., SCHULZ, C., MASSBERG, S., SCHONIG, A. & GAWAZ, M. 2003. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost*, 89, 783-7.
- MURUGAPPA, S. & KUNAPULI, S. P. 2006. The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci*, 11, 1977-86.
- NAKANISHI-MATSUI, M., ZHENG, Y. W., SULCINER, D. J., WEISS, E. J., LUDEMAN, M. J. & COUGHLIN, S. R. 2000. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*, 404, 609-13.



- NAQVI, T. Z., SHAH, P. K., IVEY, P. A., MOLLOY, M. D., THOMAS, A. M., PANICKER, S., AHMED, A., CERCEK, B. & KAUL, S. 1999. Evidence that high-density lipoprotein cholesterol is an independent predictor of acute platelet-dependent thrombus formation. *Am J Cardiol*, 84, 1011-7.
- NEERMAN-ARBEZ, M. 2006. Molecular basis of fibrinogen deficiency. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 35, 187-98.
- NEWMAN, P. M. & CHONG, B. H. 1999. Further characterization of antibody and antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 107, 303-9.
- NIESSEN, J., JEDLITSCHKY, G., GRUBE, M., KAWAKAMI, H., KAMIIE, J., OHTSUKI, S., SCHWERTZ, H., BIEN, S., STARKE, K., RITTER, C., STROBEL, U., GREINACHER, A., TERASAKI, T. & KROEMER, H. K. 2010. Expression of ABC-type transport proteins in human platelets. *Pharmacogenet Genomics*, 20, 396-400.
- NIESWANDT, B., AKTAS, B., MOERS, A. & SACHS, U. J. 2005. Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models. *J Thromb Haemost*, 3, 1725-36.
- NIESWANDT, B. & WATSON, S. P. 2003. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, 102, 449-61.
- NOFER, J. R., FEUERBORN, R., LEVKAU, B., SOKOLL, A., SEEDORF, U. & ASSMANN, G. 2003. Involvement of Cdc42 signaling in apoA-I-induced cholesterol efflux. *J Biol Chem*, 278, 53055-62.
- NOFER, J. R., HERMINGHAUS, G., BRODDE, M., MORGENSTERN, E., RUST, S., ENGEL, T., SEEDORF, U., ASSMANN, G., BLUETHMANN, H. & KEHREL, B. E. 2004. Impaired platelet activation in familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *J Biol Chem*, 279, 34032-7.
- NOFER, J. R., REMALEY, A. T., FEUERBORN, R., WOLINNSKA, I., ENGEL, T., VON ECKARDSTEIN, A. & ASSMANN, G. 2006. Apolipoprotein A-I activates Cdc42 signaling through the ABCA1 transporter. *J Lipid Res*, 47, 794-803.
- NURDEN, A. T. 2007. Interesting variations on how a disease is defined: comparisons of von Willebrand disease and Glanzmann thrombasthenia. *J Thromb Haemost*, 5, 647-9; author reply 649-51.
- NURDEN, P., HUMBERT, M., PIOTROWICZ, R. S., BIHOUR, C., POUJOL, C., NURDEN, A. T. & KUNICKI, T. J. 1996. Distribution of ligand-occupied alpha IIb beta 3 in resting and activated human platelets determined by expression of a novel class of ligand-induced binding site recognized by monoclonal antibody AP6. *Blood*, 88, 887-99.
- OFFERMANN, S. 2006. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*, 99, 1293-304.
- OFFERMANN, S., LAUGWITZ, K. L., SPICHER, K. & SCHULTZ, G. 1994. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 504-8.

- OFOSU, F. A. 2003. Protease activated receptors 1 and 4 govern the responses of human platelets to thrombin. *Transfus Apher Sci*, 28, 265-8.
- OLIVEIRA, G. B., CRESPO, E. M., BECKER, R. C., HONEYCUTT, E. F., ABRAMS, C. S., ANSTROM, K. J., BERGER, P. B., DAVIDSON-RAY, L. D., EISENSTEIN, E. L., KLEIMAN, N. S., MOLITERNO, D. J., MOLL, S., RICE, L., RODGERS, J. E., STEINHUBL, S. R., TAPSON, V. F., OHMAN, E. M. & GRANGER, C. B. 2008. Incidence and prognostic significance of thrombocytopenia in patients treated with prolonged heparin therapy. *Arch Intern Med*, 168, 94-102.
- ORAM, J. F. 2000. Tangier disease and ABCA1. *Biochim Biophys Acta*, 1529, 321-30.
- ORAM, J. F. & HEINECKE, J. W. 2005. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev*, 85, 1343-72.
- ORAM, J. F., LAWN, R. M., GARVIN, M. R. & WADE, D. P. 2000. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem*, 275, 34508-11.
- ORSO, E., BROCCARDO, C., KAMINSKI, W. E., BOTTCHER, A., LIEBISCH, G., DROBNIK, W., GOTZ, A., CHAMBENOIT, O., DIEDERICH, W., LANGMANN, T., SPRUSS, T., LUCIANI, M. F., ROTHE, G., LACKNER, K. J., CHIMINI, G. & SCHMITZ, G. 2000. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet*, 24, 192-6.
- OZAKI, Y., ASAZUMA, N., SUZUKI-INOUE, K. & BERNDT, M. C. 2005. Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling. *J Thromb Haemost*, 3, 1745-51.
- PASQUET, J. M., BOBE, R., GROSS, B., GRATACAP, M. P., TOMLINSON, M. G., PAYRASTRE, B. & WATSON, S. P. 1999. A collagen-related peptide regulates phospholipase Cgamma2 via phosphatidylinositol 3-kinase in human platelets. *Biochem J*, 342 ( Pt 1), 171-7.
- PODREZ, E. A., BYZOVA, T. V., FEBBRAIO, M., SALOMON, R. G., MA, Y., VALIYAVEETIL, M., POLIAKOV, E., SUN, M., FINTON, P. J., CURTIS, B. R., CHEN, J., ZHANG, R., SILVERSTEIN, R. L. & HAZEN, S. L. 2007. Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med*, 13, 1086-95.
- POUPLARD, C., IOCHMANN, S., RENARD, B., HERAULT, O., COLOMBAT, P., AMIRAL, J. & GRUEL, Y. 2001. Induction of monocyte tissue factor expression by antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes developed in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 97, 3300-2.
- POUPLARD, C., MAY, M. A., IOCHMANN, S., AMIRAL, J., VISSAC, A. M., MARCHAND, M. & GRUEL, Y. 1999. Antibodies to platelet factor 4-heparin after cardiopulmonary bypass in patients anticoagulated with unfractionated heparin or a low-molecular-weight heparin : clinical implications for heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation*, 99, 2530-6.

- RANDALL, M. J., PARRY, M. J., HAWKESWOOD, E., CROSS, P. E. & DICKINSON, R. P. 1981. UK-37, 248, a novel, selective thromboxane synthetase inhibitor with platelet anti-aggregatory and anti-thrombotic activity. *Thromb Res*, 23, 145-62.
- REILLY, M. P., SINHA, U., ANDRE, P., TAYLOR, S. M., PAK, Y., DEGUZMAN, F. R., NANDA, N., PANDEY, A., STOLLA, M., BERGMEIER, W. & MCKENZIE, S. E. 2011. PRT-060318, a novel Syk inhibitor, prevents heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis in a transgenic mouse model. *Blood*, 117, 2241-6.
- REILLY, M. P., TAYLOR, S. M., HARTMAN, N. K., AREPALLY, G. M., SACHAIS, B. S., CINES, D. B., PONCZ, M. & MCKENZIE, S. E. 2001. Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγRIIA. *Blood*, 98, 2442-7.
- REINDERS, J. H., DE GROOT, P. G., SIXMA, J. J. & VAN MOURIK, J. A. 1988. Storage and secretion of von Willebrand factor by endothelial cells. *Haemostasis*, 18, 246-61.
- REMALEY, A. T., STONIK, J. A., DEMOSKY, S. J., NEUFELD, E. B., BOCHAROV, A. V., VISHNYAKOVA, T. G., EGGERMAN, T. L., PATTERSON, A. P., DUVERGER, N. J., SANTAMARINA-FOJO, S. & BREWER, H. B., JR. 2001. Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 280, 818-23.
- REMALEY, A. T., THOMAS, F., STONIK, J. A., DEMOSKY, S. J., BARK, S. E., NEUFELD, E. B., BOCHAROV, A. V., VISHNYAKOVA, T. G., PATTERSON, A. P., EGGERMAN, T. L., SANTAMARINA-FOJO, S. & BREWER, H. B. 2003. Synthetic amphipathic helical peptides promote lipid efflux from cells by an ABCA1-dependent and an ABCA1-independent pathway. *J Lipid Res*, 44, 828-36.
- REMIJN, J. A., WU, Y. P., JENINGA, E. H., MJ, I. J., VAN WILLIGEN, G., DE GROOT, P. G., SIXMA, J. J., NURDEN, A. T. & NURDEN, P. 2002. Role of ADP receptor P2Y(12) in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 686-91.
- RENDU, F. & BROHARD-BOHN, B. 2001. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12, 261-73.
- ROBINSON, A., GIBBINS, J., RODRIGUEZ-LINARES, B., FINAN, P. M., WILSON, L., KELLIE, S., FINDELL, P. & WATSON, S. P. 1996. Characterization of Grb2-binding proteins in human platelets activated by Fc γRIIA cross-linking. *Blood*, 88, 522-30.
- ROSENFELD, S. I., LOONEY, R. J., LEDDY, J. P., PHIPPS, D. C., ABRAHAM, G. N. & ANDERSON, C. L. 1985. Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes. *J Clin Invest*, 76, 2317-22.
- ROSS, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340, 115-26.
- RUGGERI, Z. M., DENT, J. A. & SALDIVAR, E. 1999. Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood*, 94, 172-8.

- RUST, S., ROSIER, M., FUNKE, H., REAL, J., AMOURA, Z., PIETTE, J. C., DELEUZE, J. F., BREWER, H. B., DUVERGER, N., DENEFLÉ, P. & ASSMANN, G. 1999. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*, 22, 352-5.
- SAELMAN, E. U., NIEUWENHUIS, H. K., HESE, K. M., DE GROOT, P. G., HEIJNEN, H. F., SAGE, E. H., WILLIAMS, S., MCKEOWN, L., GRALNICK, H. R. & SIXMA, J. J. 1994. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood*, 83, 1244-50.
- SANTORO, S. A., WALSH, J. J., STAATZ, W. D. & BARANSKI, K. J. 1991. Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation. *Cell Regul*, 2, 905-13.
- SASAKI, M., SHOJI, A., KUBO, Y., NADA, S. & YAMAGUCHI, A. 2003. Cloning of rat ABCA7 and its preferential expression in platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, 304, 777-82.
- SAVAGE, B., SALDIVAR, E. & RUGGERI, Z. M. 1996. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*, 84, 289-97.
- SAVI, P., BEAUVERGER, P., LABOURET, C., DELFAUD, M., SALEL, V., KAGHAD, M. & HERBERT, J. M. 1998. Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS Lett*, 422, 291-5.
- SAVI, P. & HERBERT, J. M. 2005. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 31, 174-83.
- SCHMITZ, G. & SCHAMBECK, C. M. 2006. Molecular defects in the ABCA1 pathway affect platelet function. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 35, 166-74.
- SCHMUGGE, M., RAND, M. L. & FREEDMAN, J. 2003. Platelets and von Willebrand factor. *Transfus Apher Sci*, 28, 269-77.
- SEE, R. H., CADAY-MALCOLM, R. A., SINGARAJA, R. R., ZHOU, S., SILVERSTON, A., HUBER, M. T., MORAN, J., JAMES, E. R., JANOO, R., SAVILL, J. M., RIGOT, V., ZHANG, L. H., WANG, M., CHIMINI, G., WELLINGTON, C. L., TAFURI, S. R. & HAYDEN, M. R. 2002. Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux. *J Biol Chem*, 277, 41835-42.
- SEGREST, J. P., JONES, M. K., DE LOOF, H., BROUILLETTE, C. G., VENKATACHALAPATHI, Y. V. & ANANTHARAMAIAH, G. M. 1992. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res*, 33, 141-66.
- SEIGNEURET, M. & DEVAUX, P. F. 1984. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 3751-5.

- SERFATY-LACROSNIERE, C., CIVEIRA, F., LANZBERG, A., ISAIA, P., BERG, J., JANUS, E. D., SMITH, M. P., JR., PRITCHARD, P. H., FROHLICH, J., LEES, R. S. & ET AL. 1994. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 107, 85-98.
- SHASTRI, K. M., CARVALHO, A. C. & LEES, R. S. 1980. Platelet function and platelet lipid composition in the dyslipoproteinemias. *J Lipid Res*, 21, 467-72.
- SHATTIL, S. J., ANAYA-GALINDO, R., BENNETT, J., COLMAN, R. W. & COOPER, R. A. 1975. Platelet hypersensitivity induced by cholesterol incorporation. *J Clin Invest*, 55, 636-43.
- SHATTIL, S. J., KASHIWAGI, H. & PAMPORI, N. 1998. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood*, 91, 2645-57.
- SHATTIL, S. J. & NEWMAN, P. J. 2004. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood*, 104, 1606-15.
- SHAW, J. A., BOBIK, A., MURPHY, A., KANELLAKIS, P., BLOMBERG, P., MUKHAMEDOVA, N., WOOLLARD, K., LYON, S., SVIRIDOV, D. & DART, A. M. 2008. Infusion of reconstituted high-density lipoprotein leads to acute changes in human atherosclerotic plaque. *Circ Res*, 103, 1084-91.
- SILJANDER, P. R., MUNNIX, I. C., SMETHURST, P. A., DECKMYN, H., LINDHOUT, T., OUWEHAND, W. H., FARNDAL, R. W. & HEEMSKERK, J. W. 2004. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood*, 103, 1333-41.
- SIMON, T., STEG, P. G., BECQUEMONT, L., VERSTUYFT, C., KOTTI, S., SCHIELE, F., FERRARI, E., DROUET, E., GROLLIER, G. & DANCHIN, N. 2011. Effect of paraoxonase-1 polymorphism on clinical outcomes in patients treated with clopidogrel after an acute myocardial infarction. *Clin Pharmacol Ther*, 90, 561-7.
- SINGARAJA, R. R., BRUNHAM, L. R., VISSCHER, H., KASTELEIN, J. J. & HAYDEN, M. R. 2003. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1322-32.
- SIRAGANIAN, R. P., ZHANG, J., SUZUKI, K. & SADA, K. 2002. Protein tyrosine kinase Syk in mast cell signaling. *Mol Immunol*, 38, 1229-33.
- SMITH, J. B. & WILLIS, A. L. 1971. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol*, 231, 235-7.
- SPALTON, J. C., MORI, J., POLLITT, A. Y., HUGHES, C. E., EBLE, J. A. & WATSON, S. P. 2009. The novel Syk inhibitor R406 reveals mechanistic differences in the initiation of GPVI and CLEC-2 signaling in platelets. *J Thromb Haemost*, 7, 1192-9.
- STEFANINI, L. & BERGMEIER, W. 2010. CalDAG-GEFI and platelet activation. *Platelets*, 21, 239-43.
- STEFANINI, L., RODEN, R. C. & BERGMEIER, W. 2009. CalDAG-GEFI is at the nexus of calcium-dependent platelet activation. *Blood*, 114, 2506-14.

- STEINHUBL, S. R., TALLEY, J. D., BRADEN, G. A., TCHENG, J. E., CASTERELLA, P. J., MOLITERNO, D. J., NAVETTA, F. I., BERGER, P. B., POPMA, J. J., DANGAS, G., GALLO, R., SANE, D. C., SAUCEDO, J. F., JIA, G., LINCOFF, A. M., THEROUX, P., HOLMES, D. R., TEIRSTEIN, P. S. & KEREIAKES, D. J. 2001. Point-of-care measured platelet inhibition correlates with a reduced risk of an adverse cardiac event after percutaneous coronary intervention: results of the GOLD (AU-Assessing Ultegra) multicenter study. *Circulation*, 103, 2572-8.
- STINCHCOMBE, J. C. & GRIFFITHS, G. M. 2001. Normal and abnormal secretion by haemopoietic cells. *Immunology*, 103, 10-6.
- STUART, M. J., GERRARD, J. M. & WHITE, J. G. 1980. Effect of cholesterol on production of thromboxane b2 by platelets in vitro. *N Engl J Med*, 302, 6-10.
- SUGIDACHI, A., ASAI, F., OGAWA, T., INOUE, T. & KOIKE, H. 2000. The in vivo pharmacological profile of CS-747, a novel antiplatelet agent with platelet ADP receptor antagonist properties. *Br J Pharmacol*, 129, 1439-46.
- SUH, J. S., MALIK, M. I., ASTER, R. H. & VISENTIN, G. P. 1997. Characterization of the humoral immune response in heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Hematol*, 54, 196-201.
- SUZUKI, J., UMEDA, M., SIMS, P. J. & NAGATA, S. 2010. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, 468, 834-8.
- TANG, C., LIU, Y., KESSLER, P. S., VAUGHAN, A. M. & ORAM, J. F. 2009. The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *J Biol Chem*, 284, 32336-43.
- TANG, C. & ORAM, J. F. 2009. The cell cholesterol exporter ABCA1 as a protector from cardiovascular disease and diabetes. *Biochim Biophys Acta*, 1791, 563-72.
- TANG, C., VAUGHAN, A. M., ANANTHARAMAIAH, G. M. & ORAM, J. F. 2006. Janus kinase 2 modulates the lipid-removing but not protein-stabilizing interactions of amphipathic helices with ABCA1. *J Lipid Res*, 47, 107-14.
- TANG, X., HALLECK, M. S., SCHLEGEL, R. A. & WILLIAMSON, P. 1996. A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science*, 272, 1495-7.
- TARDIF, J. C., GREGOIRE, J., L'ALLIER, P. L., IBRAHIM, R., LESPERANCE, J., HEINONEN, T. M., KOUZ, S., BERRY, C., BASSER, R., LAVOIE, M. A., GUERTIN, M. C. & RODES-CABAU, J. 2007. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*, 297, 1675-82.
- TERASHITA, Z., IMURA, Y., KAWAMURA, M., KATO, K. & NISHIKAWA, K. 1995. Effects of thromboxane A2 synthase inhibitors (CV-4151 and ozagrel), aspirin, and ticlopidine on the thrombosis caused by endothelial cell injury. *Thromb Res*, 77, 411-21.

- TOPOL, E. J., BYZOVA, T. V. & PLOW, E. F. 1999. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet*, 353, 227-31.
- TSUJI, M., EZUMI, Y., ARAI, M. & TAKAYAMA, H. 1997. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem*, 272, 23528-31.
- TUCKWELL, D., CALDERWOOD, D. A., GREEN, L. J. & HUMPHRIES, M. J. 1995. Integrin alpha 2 I-domain is a binding site for collagens. *J Cell Sci*, 108 ( Pt 4), 1629-37.
- UNTCH, B., AHMAD, S., JESKE, W. P., MESSMORE, H. L., HOPPENSTEADT, D. A., WALENGA, J. M., LIETZ, H. & FAREED, J. 2002. Prevalence, isotype, and functionality of antiheparin-platelet factor 4 antibodies in patients treated with heparin and clinically suspected for heparin-induced thrombocytopenia. The pathogenic role of IgG. *Thromb Res*, 105, 117-23.
- VALIYAVEETIL, M. & PODREZ, E. A. 2009. Platelet hyperreactivity, scavenger receptors and atherothrombosis. *J Thromb Haemost*, 7 Suppl 1, 218-21.
- VAN DE WINKEL, J. G. & CAPEL, P. J. 1993. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today*, 14, 215-21.
- VANDENDRIES, E. R., HAMILTON, J. R., COUGHLIN, S. R., FURIE, B. & FURIE, B. C. 2007. Par4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 288-92.
- VANE, J. R. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231, 232-5.
- VEDHACHALAM, C., DUONG, P. T., NICKEL, M., NGUYEN, D., DHANASEKARAN, P., SAITO, H., ROTHBLAT, G. H., LUND-KATZ, S. & PHILLIPS, M. C. 2007a. Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem*, 282, 25123-30.
- VEDHACHALAM, C., GHERING, A. B., DAVIDSON, W. S., LUND-KATZ, S., ROTHBLAT, G. H. & PHILLIPS, M. C. 2007b. ABCA1-induced cell surface binding sites for ApoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 1603-9.
- VISENTIN, G. P., FORD, S. E., SCOTT, J. P. & ASTER, R. H. 1994. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest*, 93, 81-8.
- VISENTIN, G. P., MOGHADDAM, M., BEERY, S. E., MCFARLAND, J. G. & ASTER, R. H. 2001. Heparin is not required for detection of antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis. *J Lab Clin Med*, 138, 22-31.
- VOSS, B., MCLAUGHLIN, J. N., HOLINSTAT, M., ZENT, R. & HAMM, H. E. 2007. PAR1, but not PAR4, activates human platelets through a Gi/o/phosphoinositide-3 kinase signaling axis. *Mol Pharmacol*, 71, 1399-406.

- VU, T. K., HUNG, D. T., WHEATON, V. I. & COUGHLIN, S. R. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64, 1057-68.
- VUN, C. M., EVANS, S. & CHONG, B. H. 1996. Cross-reactivity study of low molecular weight heparins and heparinoid in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res*, 81, 525-32.
- WAGNER, C. L., MASCELLI, M. A., NEBLOCK, D. S., WEISMAN, H. F., COLLER, B. S. & JORDAN, R. E. 1996. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*, 88, 907-14.
- WALKER, J. E., SARASTE, M., RUNSWICK, M. J. & GAY, N. J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, 1, 945-51.
- WALLENTIN, L., BECKER, R. C., BUDAJ, A., CANNON, C. P., EMANUELSSON, H., HELD, C., HORROW, J., HUSTED, S., JAMES, S., KATUS, H., MAHAFFEY, K. W., SCIRICA, B. M., SKENE, A., STEG, P. G., STOREY, R. F., HARRINGTON, R. A., FREIJ, A. & THORSEN, M. 2009. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 361, 1045-57.
- WANG, N., LAN, D., GERBOD-GIANNONE, M., LINSEL-NITSCHKE, P., JEHL, A. W., CHEN, W., MARTINEZ, L. O. & TALL, A. R. 2003. ATP-binding cassette transporter A7 (ABCA7) binds apolipoprotein A-I and mediates cellular phospholipid but not cholesterol efflux. *J Biol Chem*, 278, 42906-12.
- WARKENTIN, T. E. 2001. Venous limb gangrene during warfarin treatment of cancer-associated deep venous thrombosis. *Ann Intern Med*, 135, 589-93.
- WARKENTIN, T. E. 2005. New approaches to the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Chest*, 127, 35S-45S.
- WARKENTIN, T. E. & HEDDLE, N. M. 2003. Laboratory diagnosis of immune heparin-induced thrombocytopenia. *Curr Hematol Rep*, 2, 148-57.
- WARKENTIN, T. E. & KELTON, J. G. 2001. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 344, 1286-92.
- WARKENTIN, T. E., LEVINE, M. N., HIRSH, J., HORSEWOOD, P., ROBERTS, R. S., GENT, M. & KELTON, J. G. 1995. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med*, 332, 1330-5.
- WARKENTIN, T. E., SHEPPARD, J. A., HORSEWOOD, P., SIMPSON, P. J., MOORE, J. C. & KELTON, J. G. 2000. Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 96, 1703-8.
- WATSON, S. P. 1999. Collagen receptor signaling in platelets and megakaryocytes. *Thromb Haemost*, 82, 365-76.



- WATSON, S. P., AUGER, J. M., MCCARTY, O. J. & PEARCE, A. C. 2005. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost*, 3, 1752-62.
- WATSON, S. P., HERBERT, J. M. & POLLITT, A. Y. 2010. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost*, 8, 1456-67.
- WEBER, C. 2005. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res*, 96, 612-6.
- WENAWESER, P. & HESS, O. 2005. Stent thrombosis is associated with an impaired response to antiplatelet therapy. *J Am Coll Cardiol*, 46, CS5-6.
- WOULFE, D., JIANG, H., MORTENSEN, R., YANG, J. & BRASS, L. F. 2002. Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets. *J Biol Chem*, 277, 23382-90.
- WU, Y. P., DE GROOT, P. G. & SIXMA, J. J. 1997. Shear-stress-induced detachment of blood platelets from various surfaces. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 3202-7.
- YANAGI, S., INATOME, R., TAKANO, T. & YAMAMURA, H. 2001. Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 288, 495-8.
- ZIPOREN, L., LI, Z. Q., PARK, K. S., SABNEKAR, P., LIU, W. Y., AREPALLY, G., SHOENFELD, Y., KIEBER-EMMONS, T., CINES, D. B. & PONCZ, M. 1998. Defining an antigenic epitope on platelet factor 4 associated with heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 92, 3250-9.

**Auteur :** Thibault LHERMUSIER

**Titre :** Régulation plaquettaire : Ciblage de la protéine kinase Syk dans les HIT et rôle du transporteur lipidique ABCA1 dans les fonctions plaquettaires.

**Directeur de thèse :** Pr Bernard Payrastre

## **Résumé**

Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité vasculaire. Outre leur rôle physiologique conduisant à la formation du clou hémostatique en cas de brèche vasculaire, elles sont impliquées dans des pathologies thrombotiques comme l'athérombose ou les thrombopénies induites par l'héparine (TIH), ce qui en fait des cibles pharmacologiques de choix dans ces situations. Nous avons étudié les mécanismes mis en jeu par les plaquettes dans deux situations pathologiques ; les TIH avec la tyrosine kinase Syk comme acteur majeur et la maladie de Tangier résultant d'une mutation perte de fonction du transporteur de lipide ABCA1. Les TIH sont des complications rares mais graves des traitements à l'héparine dues au développement d'anticorps dirigés contre le complexe héparine-facteur 4 plaquettaire (PF4). Ces anticorps induisent la clairance des plaquettes (thrombopénie) et activent les récepteurs Fc à la surface des plaquettes (FcγRIIA) et des monocytes (FcγRI et FcγRII) conduisant à l'agrégation plaquettaire et l'expression du facteur tissulaire par les monocytes responsable des complications thrombotiques. Nous montrons que Syk est une kinase essentielle à l'activation des plaquettes (signalisation, sécrétion, agrégation, microparticules) par les anticorps dirigés contre le complexe héparine-PF4 présents dans le sérum de patients atteints de TIH. Parallèlement, l'inhibition de Syk bloque fortement l'expression du facteur tissulaire et l'activité procoagulante des monocytes induites par les anticorps TIH. Les inhibiteurs de Syk, en développement clinique avancé en immunothérapie, apparaissent donc prometteurs dans le traitement des TIH. ABCA1 est impliqué dans le transport réverse du cholestérol et de phospholipides vers les lipoprotéines de haute densité. Son déficit est associé à de profondes anomalies du bilan lipidique mais aussi à un phénotype hémorragique. Grâce à un modèle de souris déficientes en ABCA1, nous avons caractérisé son rôle dans l'activation plaquettaire. Contrairement à ce que l'on aurait pu penser, ABCA1 n'est pas impliqué dans l'exposition des phosphatidylsérines et l'activité procoagulante des plaquettes activées, et ne régule pas le contenu en cholestérol des membranes plaquettaires. Par contre, un défaut de taille des plaquettes et de leurs réponses fonctionnelles sont observés en son absence. ABCA1 apparaît comme un régulateur des mécanismes de signalisation pouvant expliquer le phénotype hémorragique rapporté dans la maladie de Tangier. L'ensemble de ces travaux a permis de caractériser des acteurs moléculaires de l'activation plaquettaire dans des situations pathologiques et de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## **Abstract**

Platelet activation at sites of vascular injury is essential for haemostasis. Next to this critical role in bleeding arrest, platelets are involved in thrombotic diseases such atherothrombosis or heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Therefore, they are targets of antithrombotic therapies. We have studied the mechanisms of platelet activation in two pathological situations; HIT with the tyrosine kinase Syk as a key player and Tangier disease resulting of a loss of function of the ABCA1 lipid transporter. HIT is a prothrombotic and potentially devastating complication of heparin therapy due to formation of platelet-activating antibodies directed against complexes of platelet factor 4 (PF4) and heparin. These antibodies contribute to clear platelet from the circulation and activate, by their Fc fragment, FcγRIIA receptors on platelet surface or FcγRI and FcγRII receptors on monocyte, leading to platelet aggregation and tissue factor expression by monocytes. We have shown that Syk activation is crucial for platelet activation (signalization, secretion, aggregation, microparticle generation) initiated by anti-PF4/heparin antibodies from sera of patients suffering from HIT. Interestingly, Syk inhibition also prevented tissue factor expression and procoagulant activity of monocyte cells induced by these antibodies. We propose that Syk inhibitors, initially developed as a potential treatment of autoimmune disease, may be of therapeutic interest in the treatment of HIT.

ABCA1 has been demonstrated to be crucial in the reverse cholesterol transport pathway by loading cholesterol and phospholipids into ApoA-I to generate high density lipoproteins. Its defect is associated to circulating lipid disturbance but also to hemorrhagic diathesis. Surprisingly, using ABCA1 knock-out mice, we have demonstrated that this transporter is neither implicated in phosphatidylserine exposure, a mechanism leading to the procoagulant activity of activated platelets, nor in the control of platelet membranes cholesterol content. However, mouse platelets deficient for ABCA1 have an increased size and a defect in response to low doses of agonists such as thrombin and collagen. Our data indicate that ABCA1 is involved in the efficiency of platelet signal transduction, particularly in the activation of Akt. These studies have characterized key players of platelet activation and suggest new strategies in the development of antithrombotic therapies.

**Mots-clés :** Syk, thrombopénie induite à l'héparine, ABCA1, activation plaquettaire

**Discipline :** Physiopathologie

**Intitulé et adresse du laboratoire :** INSERM UMR 1048 - I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires 1 avenue Jean Poulhès BP 84225 31432 Toulouse Cedex 4