



"L'AMPK α 1 régule la polymérisation de l'actine,
la formation des lamellipodes et la rétraction du
clou plaquettaire en réponse à la thrombine"

Onselaer, Marie-Blanche

Abstract

Platelet activation requires sweeping morphological changes, supported by contraction and remodelling of platelet actin cytoskeleton. In epithelial and endothelial cells, AMP-activated protein kinase (AMPK) controls actin cytoskeleton organization through the phosphorylation of cytoskeletal targets, namely myosin regulatory light chains (MLC), cofilin and the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), extending the role of AMPK beyond metabolism. In this thesis, we hypothesized that AMPK was activated in thrombin-stimulated platelets and played a role in platelet secretion, aggregation and clot retraction, by regulating polymerization and/or organization of actin cytoskeleton through the phosphorylation of MLC, cofilin and VASP. We show that human platelets expressed exclusively the AMPK α 1 isoform. In human purified platelets, thrombin led to a transient activation of AMPK α 1 and to phosphorylation of its substrate acetyl coA carboxylase (ACC). Platelets isolated from mice lackin...

Document type : *Thèse (Dissertation)*

Référence bibliographique

Onselaer, Marie-Blanche. *L'AMPK α 1 régule la polymérisation de l'actine, la formation des lamellipodes et la rétraction du clou plaquettaire en réponse à la thrombine*. Prom. : Horman, Sandrine ; Beauloye, Christophe



Université catholique de Louvain



Institut de Recherche Expérimentale et Clinique
Pôle de recherche cardiovasculaire

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en
Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques.

L'AMPK α 1 régule la polymérisation de l'actine, la formation des lamellipodes et la rétraction du clou plaquettaire en réponse à la thrombine

Marie-Blanche Onselaer

Novembre 2014

Promoteur : Professeur Sandrine Horman
Co-promoteur : Professeur Christophe Beauloye

RESUME

L'AMP-activated protein kinase (AMPK) est un senseur énergétique. Un de ses substrats majeurs est l'acétyl-coA-carboxylase (ACC), impliquée dans la synthèse et l'oxydation des acides gras. Cette protéine est présente dans les plaquettes. Par contre, son rôle, et plus globalement le rôle du métabolisme des lipides, dans le contrôle de la fonction plaquettaire ont été très peu étudiés. De façon intéressante, le rôle de l'AMPK s'étend au-delà de l'homéostasie métabolique. Dans certains modèles cellulaires, elle est impliquée dans la contraction, le remodelage et la polymérisation du cytosquelette d'actine, via l'augmentation de la phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC) et de protéines telles que la cofiline et la phosphoprotéine stimulée par les vasodilatateurs (VASP). Or, la régulation du cytosquelette d'actine est un élément clé qui contribue à l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaires.

Les résultats acquis au cours de ce travail de thèse montrent que la thrombine, un puissant agoniste des plaquettes, conduit à l'activation de l'AMPK dans les plaquettes humaines et aussi à la phosphorylation de ses cibles (ACC, MLC, cofiline et VASP). L'inhibition de l'AMPK par une approche pharmacologique (plaquettes humaines) ou génétique (plaquettes murines) affecte la phosphorylation des cibles ainsi que la polymérisation de l'actine et son organisation en lamellipodes. Ces défauts sont associés à une altération des fonctions plaquettaires telles que la sécrétion, l'agrégation et la rétraction du clou.

Conclusion : Ces données soutiennent l'hypothèse d'une contribution cruciale de la signalisation AMPK dans le contrôle de la fonction plaquettaire. L'ACC est d'ailleurs phosphorylée au cours de circonstances cliniques où on assiste à une activation importante de la cascade de coagulation comme en situation post-opératoire d'une chirurgie majeure.

ABSTRACT

Platelet activation requires sweeping morphological changes, supported by contraction and remodelling of platelet actin cytoskeleton. In epithelial and endothelial cells, AMP-activated protein kinase (AMPK) controls actin cytoskeleton organization through the phosphorylation of cytoskeletal targets, namely myosin regulatory light chains (MLC), cofilin and the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), extending the role of AMPK beyond metabolism.

In this thesis, we hypothesized that AMPK was activated in thrombin-stimulated platelets and played a role in platelet secretion, aggregation and clot retraction, by regulating polymerization and/or organization of actin cytoskeleton through the phosphorylation of MLC, cofilin and VASP.

We show that human platelets expressed exclusively the AMPK α 1 isoform. In human purified platelets, thrombin led to a transient activation of AMPK α 1 and to phosphorylation of its substrate acetyl coA carboxylase (ACC). Platelets isolated from mice lacking AMPK α 1 exhibited reduced aggregation and secretion in response to thrombin, associated with a defect in ACC, MLC, cofilin and VASP phosphorylation. These changes were associated with an abrogation of thrombin-dependent F-actin formation. Moreover, the percentage of platelets able to form lamellipodia after immobilization on fibrinogen-coated coverslips and stimulation by thrombin, was significantly reduced in the absence of AMPK α 1, indicating an altered cytoskeleton reorganization during spreading. More importantly, clot retraction was slower and less effective in KO platelets.

Conclusion: AMPK α 1 plays a critical role in platelet function in response to thrombin through the phosphorylation of cytoskeletal targets and the subsequent regulation of cytoskeleton organization -dependent processes.

This conclusion is supported by clinical data showing that AMPK is also activated *in vivo*, in platelets of patients undergoing cardiac surgery and therefore submitted to a thrombotic process designed to counter bleeding.

Membres du jury

Président du jury :

Prof. Anabelle Decottignies

Université catholique de Louvain, Institut de Duve, Laboratoire d'Altérations Génétiques et Epigénétiques du Génome, Bruxelles, Belgique.

Promoteur :

Prof. Sandrine Horman

Université catholique de Louvain, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Pôle de Recherche Cardiovasculaire, Bruxelles, Belgique.

Co-Promoteur :

Prof. Christophe Beauloye

Université catholique de Louvain, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Pôle de Recherche Cardiovasculaire. Cliniques universitaires Saint-Luc, Département des Maladies Cardiovasculaires, Division de Cardiologie, Service des Soins Intensifs, Bruxelles, Belgique.

Membres UCL du jury :

Prof. Stefan Constantinescu

Université catholique de Louvain, Institut Ludwig pour la Recherche contre le Cancer, Institut de Duve, Bruxelles, Belgique.

Prof. Cédric Hermans

Université catholique de Louvain, Institut de Recherche Santé et Société. Cliniques universitaires Saint-Luc, Unité de Thrombose et Hémostase, Division Hématologie, Bruxelles, Belgique.

Prof. Mark Rider

Université catholique de Louvain, Institut de Duve, Laboratoire de Phosphorylation des Protéines, Bruxelles, Belgique.

Prof. Jean-Louis Vanoverschelde

Université catholique de Louvain, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Pôle de Recherche Cardiovasculaire.

Cliniques universitaires Saint-Luc, Département des Maladies Cardiovasculaires, Division de Cardiologie, Bruxelles, Belgique.

Membres extérieurs du jury :

Prof. Christilla Bachelot-Loza

Université Paris-Descartes, Faculté de Pharmacie, INSERM (UMR-S U765), Sorbonne Paris Cité, France.

Prof. Cécile Oury

Université de Liège, GIGA, Laboratoire de Thrombose et Hémostase, Liège, Belgique.

Remerciements

S'il est indéniable que sans mes parents je n'en serais pas là aujourd'hui, il en est de même pour toutes les personnes qui ont croisé mon chemin au cours de cette folle aventure qu'est la thèse de doctorat.

Je ne remercierai jamais assez mon promoteur, le Professeur Sandrine Horman, qui m'a accordé sa confiance pour gérer l'un de ses projets, dans son équipe naissante. Mais au-delà de son encadrement en tant que responsable, elle a joué un rôle primordial tout au long de ce cheminement en m'apportant une évolution aussi bien dans la réflexion scientifique que personnelle.

L'accomplissement de ce travail n'aurait pas été possible sans l'apport de mon co-promoteur, le Professeur Christophe Beauloye. Grâce à sa vision de clinicien, il a ouvert ce projet de recherche fondamentale vers d'autres applicabilités et perspectives.

Je suis très reconnaissant envers le Professeur Jean-Louis Vanoverschelde d'avoir permis la concrétisation de ce projet et de m'avoir soutenue au cours de ces années.

Je n'oublie pas non plus le Professeur Luc Bertrand et le Professeur Louis Hue dont la contribution m'a été d'une grande aide.

Mais il faut revenir aux balbutiements de cette aventure, lorsqu'aucun équipement spécifique à l'étude des plaquettes sanguines n'était encore disponible au laboratoire. C'est à ce moment que le professeur Stéphane Eeckhoudt et le professeur Cécile Oury, m'ont accueillie au sein de leur laboratoire afin de débiter les premières expériences. Leur expertise scientifique et leur aide ont fortement contribué à l'aboutissement de cette thèse et je les en remercie.

S'il est vrai qu'un encadrement scientifique et une structure technique sont indispensables à l'accomplissement d'une thèse de doctorat, il en est de même pour les relations humaines. Je remercie donc sincèrement l'équipe du Pôle de Recherche Cardiovasculaire auprès de laquelle j'ai pu évoluer et qui a permis de

favoriser l'avancement de cette thèse. Merci à Nicolas Barile, Patricia Buchlin, Sophie Leprore et Nicolas Marquet pour leur importante contribution dans ce travail. Merci aussi à Julien Auquier, Magali Balteau, Cécile Dufeys, Roselle Gélinas, Audrey Ginion, Florence Mailleux, GT Noppe, Michel Notteghem, Edith Renguet, Delphine Thibou, Aurélie Timmermans et Anne Van Steenbergem pour leur conseil ou leur simple amitié.

Je tiens à remercier les anesthésistes et le personnel des soins intensifs des Cliniques universitaires Saint-Luc ; tout particulièrement Florence Sinnaeve, Paule Denisty et le Professeur Luc Jacquet sans qui une grande partie de ce travail n'aurait pas été possible.

J'exprime ma gratitude au Professeur Anabelle Decottignies d'avoir présidé le jury. Il en va de même pour le Professeur Stefan Constantinescu, le Professeur Cédric Hermans et le Professeur Mark Rider d'avoir accepté de faire partie du jury et pour leurs commentaires et conseils à chaque comité.

Je remercie chaleureusement le Professeur Christilla Bachelot-Loza d'avoir accepté d'être membre du jury et pour son apport scientifique à cette thèse.

Ce travail de recherche a pu être réalisé grâce à l'octroi de Fonds spéciaux de Recherche et de la Bourse du patrimoine de l'Université catholique de Louvain. Je remercie également la Fondation Salus sanguinis qui m'a accordé son soutien financier.

Enfin, je remercie de tout coeur mon compagnon, ma famille et mes amis pour leur intérêt et le soutien dont ils ont fait preuve durant ce parcours professionnel et personnel.

Mille mercis à vous tous.

A Bon papa,

SOMMAIRE

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	1
<u>I.1 Le rôle physiologique et pathologique des plaquettes sanguines</u>	3
I.1.1 Généralités	3
I.1.2 L'hémostase	3
I.1.2.1 L'hémostase primaire	4
I.1.2.2 La coagulation	5
I.1.2.3 La fibrinolyse	8
I.1.3 Les thromboses	9
I.1.3.1 Les thromboses artérielles	9
I.1.3.2 Les thromboses veineuses	10
<u>I.2 L'origine et la structure des plaquettes sanguines</u>	11
I.2.1 L'origine des plaquettes	11
I.2.2 La structure plaquettaire	12
I.2.2.1 Le système membranaire	13
<i>I.2.2.1.1 Le glycocalyx</i>	13
<i>I.2.2.1.2 Le système canaliculaire ouvert</i>	13
<i>I.2.2.1.3 Le système tubulaire dense</i>	13
I.2.2.2 Les organites	13
<i>I.2.2.2.1 Les granules α</i>	14
<i>I.2.2.2.2 Les granules denses</i>	14
I.2.2.3 Le cytosquelette de la plaquette au repos	15
<i>I.2.2.3.1 L'anneau de microtubules</i>	16
<i>I.2.2.3.2 Le cytosquelette d'actine</i>	17
a) Le squelette membranaire	18
b) Le squelette d'actine cytoplasmique	19

<u>I.3 Les mécanismes moléculaires impliqués dans la biologie des plaquettes</u>	20
I.3.1 Les récepteurs de l'adhésion	21
I.3.1.1 Le complexe GPIb-V-IX	22
I.3.1.2 Le récepteur GPVI	23
I.3.2 Les récepteurs aux agonistes solubles	25
I.3.2.1 Les récepteurs à la thrombine : PAR-1 et PAR-4	26
I.3.2.2 Les récepteurs à l'ADP : P2Y1 et P2Y12	27
I.3.2.2 Les récepteurs au thromboxane : TP	28
I.3.3 L'augmentation de calcium plaquettaire	30
I.3.3.1 Le système SOCE	30
I.3.3.2 Le système ROCE	31
I.3.4 La sécrétion du contenu des granules	34
I.3.5 Le récepteur au fibrinogène : GPIIb/IIIa	34
I.3.5.1 L'activation du récepteur au fibrinogène : Signalisation « <i>Inside-out</i> »	34
I.3.5.1.1 <i>Rap1-GTPase</i>	35
I.3.5.1.2 <i>La taline</i>	36
I.3.5.1.3 <i>Les kindlines</i>	36
I.3.5.2 La rétraction du clou plaquettaire : Signalisation « <i>Outside-in</i> »	37
<u>I.4 Le remodelage du squelette d'actine au cours de l'activation plaquettaire</u>	39
I.4.1 Le désassemblage du squelette membranaire de spectrine	40
I.4.2 La formation de nouveaux sites d'amorces et de polymérisation	41
I.4.2.1 La gelsoline	41
I.4.2.2 La cofiline	41
I.4.3 La génération de filopodes et/ou de lamellipodes	43
I.4.3.1 Les lamellipodes : Arp2/3 - WASP	43
I.4.3.2 Les filopodes : ENA/VASP	44

I.4.4 La contraction du squelette cytoplasmique	48
<u>I.5 L'AMP-activated protein Kinase : un nouveau régulateur du cytosquelette plaquettaire ?</u>	50
I.5.1 La structure de l'AMPK	50
I.5.1.1 La sous-unité α	50
I.5.1.2 La sous-unité β	51
I.5.1.3 La sous-unité γ	51
I.5.2 La stimulation allostérique par l'AMP	53
I.5.3 L'activation par phosphorylation : les AMPK kinases	54
I.5.3.1 LKB1	54
I.5.3.2 La CaMKK β	55
I.5.4 Les fonctions : le métabolisme et au delà...	55
I.5.4.1 Rôle de l'AMPK dans le métabolisme	56
I.5.4.2 Rôle de l'AMPK dans l'organisation du cytosquelette d'actine	58
II. BUT DU TRAVAIL	61
III. MATERIEL ET METHODES	65
<u>III.1. Matériel</u>	67
III.1.1 Produits	67
III.1.2 Supports	68
<u>III.2. Méthodes</u>	68
III.2.1 Comité d'éthique	68
III.2.2 Isolement de plaquettes	68
III.2.2.1 Isolement de plaquettes humaines	68
III.2.2.2 Isolement de plaquettes de souris	69
III.2.3 Analyses protéiques	69
III.2.3.1 Tests enzymatiques	69
<i>III.2.3.1.1 AMPK</i>	69
<i>III.2.3.1.2 LKB1</i>	70

III.2.3.2 Western Blotting	70
III.2.3.3 Immunoprécipitation	71
III.2.4 Etudes plaquettaires	71
III.2.4.1 Comptage des plaquettes	71
III.2.4.2 Mesure de l'entrée de calcium intracellulaire	71
<i>III.2.4.2.1 Spectrofluorimétrie</i>	71
<i>III.2.4.2.2 Cytométrie de flux</i>	71
III.2.4.3 Dosage du thromboxane	72
III.2.4.4 Mesure de la polymérisation de l'actine	72
<i>III.2.4.4.1 Centrifugation</i>	72
<i>III.2.4.4.2 Cytométrie de flux</i>	72
III.2.4.5 Adhésion statique	73
III.2.5 Fonctions plaquettaires	73
III.2.5.1 Sécrétion des granules α	73
III.2.5.2 Sécrétion des granules denses	74
III.2.5.3 Agrégation	74
III.2.5.4 Activation du récepteur au fibrinogène	74
III.2.5.5 Rétraction du clou plaquettaire	74
III.2.6 Etude clinique	75
III.2.7 Analyses cliniques	75
III.2.7.1 Multiplate	75
III.2.7.2 ROTEM	75
III.2.7.3 Génération de thrombine endogène	76
III.2.7.4 Analyses de coagulation	76
a) Temps de Prothrombine (PT)	76
b) Temps de Thrombine (TT)	77
c) INR (« International Normalized Ratio »)	77

d) aPTT (« activated Partial Thromboplastin Time)	77
e) ACT (« Activated whole blood Clotting Time »)	77
f) Dosage des D-dimères	78
III.3. Analyses statistiques	78
IV. RESULTATS	79
Partie 1: La signalisation CaMKKβ/AMPKα1 régule le cytosquelette d'actine dans les plaquettes stimulées par la thrombine	81
<u>IV.1 Expression et activation de l'AMPK dans les plaquettes</u>	81
IV.1.1 Identification des isoformes catalytiques de l'AMPK	82
IV.1.2 Activation de l'AMPK α 1 en réponse aux différents agonistes plaquettaires	83
IV.1.3 Rôle des AMPK kinases LKB1 and CaMKK β dans la signalisation induite par la thrombine	88
<u>IV.2 Implication de l'AMPK dans la regulation du cytosquelette d'actine de la plaquette activée par la thrombine</u>	90
IV.2.1 Etude de la phosphorylation de la MLC, de la cofiline et de VASP dans les plaquettes humaines	91
IV.2.2 Polymérisation des filaments d'actine dans les plaquettes humaines	93
IV.2.3 Phosphorylation de la MLC, de la cofiline et de VASP dans les plaquettes de souris	94
IV.2.4 Polymérisation des filaments d'actine dans les plaquettes de souris et organisation du cytosquelette en filopodes et lamellipodes	95
<u>IV.3 Implication de l'AMPKα1 dans la régulation des processus plaquettaires dépendant du cytosquelette d'actine: la sécrétion, l'agrégation et la rétraction du clou plaquettaire.</u>	97
IV.3.1 L'agrégation et la sécrétion dans les plaquettes humaines	97
IV.3.2 L'agrégation et la sécrétion dans les plaquettes de souris	102
IV.3.3 La rétraction du clou plaquettaire	106

IV.4 Partie 1 : Conclusion	107
Partie 2: La phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes humaines peut être le reflet de l'activité de la thrombine <i>in vivo</i> : "PROOF OF CONCEPT"	109
IV.5 Etude de faisabilité sur 6 patients	109
IV.6 Etude Clinique sur 29 patients	112
IV.7 Partie 2 : Conclusion	115
V. DISCUSSION	117
VI. REFERENCES	129
VII. ANNEXES	145

Liste des figures

Figure 1. L'hémostase	4
Figure 2. La cascade de coagulation	6
Figure 3. Le modèle cellulaire de coagulation	7
Figure 4. L'athérosclérose	10
Figure 5. La formation des plaquettes sanguines	12
Figure 6. La structure d'une plaquette	15
Figure 7. L'anneau membranaire de microtubules	17
Figure 8. Le squelette membranaire d'actine	19
Figure 9. Les voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire	20
Figure 10. Les principaux récepteurs d'adhésion	24
Figure 11. Les principaux récepteurs aux agonistes solubles	29
Figure 12. Les mécanismes impliqués dans l'augmentation de calcium intracellulaire	33
Figure 13. Le signal "Inside-out"	37
Figure 14. Le signal "Outside-in"	38
Figure 15. Le changement de morphologie et la réorganisation du cytosquelette plaquettaire	40
Figure 16. La formation des lamellipodes	44
Figure 17. La formation des filopodes	45
Figure 18. La structure de la protéine VASP	47
Figure 19. La régulation des chaînes légères de la myosine IIa	49
Figure 20. La structure des différentes sous-unités de l'AMPK	52
Figure 21. Les cibles de l'AMPK impliquées dans l'homéostasie métabolique	56
<hr/>	
Figure 22. Evaluation de la présence des sous-unités catalytiques de l'AMPK dans les plaquettes humaines et murines	82
Figure 23. L'AMPK α 1 est activée par la thrombine	83
Figure 24. Effet des peptides activateurs de PAR-1 et PAR-4 sur la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes humaines	84
Figure 25. Effets des agonistes plaquettaires sur la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes humaines	85
Figure 26. Effets des agonistes plaquettaires sur la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes murines	86

Figure 27. Effets des agonistes plaquettaires sur la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes de souris AMPK α 1 et AMPK α 2 knockout	87
Figure 28. AMPK kinases	88
Figure 29. Effet de la thrombine sur l'activation de LKB1	88
Figure 30. Evaluation de l'implication de la CaMKK β dans l'activation de l'AMPK induite par la thrombine	89
Figure 31. Effet du STO-609 sur l'activation de l'AMPK induite par le composé A-769662	90
Figure 32. Effet du STO-609 sur la phosphorylation des MLC, de la cofiline et de VASP dans les plaquettes humaines traitées par la thrombine.	92
Figure 33. Polymérisation des filaments d'actine dans les plaquettes humaines	93
Figure 34. Phosphorylation des MLC, de la cofiline et de VASP dans les plaquettes de souris AMPK α 1 knockout traitées par la thrombine	94
Figure 35. Polymérisation des filaments d'actine dans les plaquettes de souris stimulées par la thrombine	95
Figure 36. Remodelage du cytosquelette d'actine dans des plaquettes de souris WT et KO au cours de l'adhésion	96
Figure 37. Effet du STO-609 sur l'agrégation des plaquettes humaines	97
Figure 38. Effet du STO-609 sur l'activation du récepteur au fibrinogène (GPIIb/IIIa) dans les plaquettes humaines	98
Figure 39. Effet du STO-609 sur la dégranulation des plaquettes humaines	99
Figure 40. Effet du STO-609 sur la mobilisation du calcium en réponse aux différents agonistes dans les plaquettes humaines	100
Figure 41. Effet du STO-609 sur l'agrégation et la sécrétion des granules denses induites par le composé U46619, le collagène et l'ADP	101
Figure 42. Effet du STO-609 sur la production de TXB2 par les plaquettes humaines stimulées avec de la thrombine	102
Figure 43. Agrégation et sécrétion des plaquettes de souris WT et KO en réponse à la thrombine	103
Figure 44. Agrégation et sécrétion d'ATP des plaquettes de souris WT et KO en réponse aux agonistes plaquettaires	104
Figure 45. Agrégation et sécrétion des plaquettes de souris WT et KO en réponse aux agonistes plaquettaires	105
Figure 46. Rétraction du clou plaquettaire	106
Figure 47. Mode opératoire de l'étude clinique	110
Figure 48. Phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes des 6 patients	111

Figure 49. Corrélation entre l'augmentation de la phosphorylation de l'ACC et le saignement post-opératoire	111
Figure 50. Phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes des 29 patients	113
Figure 51. Incrément de phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes de patients ayant conservé une capacité à générer de la thrombine	114
Figure 52. Synthèse de l'utilisation de la pACC comme un marqueur de l'activation plaquettaire et de la coagulation <i>in vivo</i> chez le patient	115
<hr/>	
Figure 53. Effet du STO-609 sur l'activation de la GTPase RhoA induite par la thrombine	123
Figure 54. Effet du STO-609 sur l'activation de la GTPase Rac1 induite par la thrombine	123
Figure 55. Effet du STO-609 sur la phosphorylation de la Ser20 de PAK2	124
Figure 56. Analyse du nombre de plaquettes dans le sang des souris AMPK α 1 et AMPK α 2 knockout et des souris contrôles correspondantes	126
Figure 57. Etat de phosphorylation de l'ACC des patients coronariens	128

Liste des abréviations

Abréviations	Nom
A-23187	Ionophore de calcium
AA	Acide Arachidonique
ACC	Acétyl-CoA-Carboxylase
ADF	Actin Depolymerizing Factor
AICAr	5-Aminolimidazole-4-Carboxamide riboside
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
Arf	ADP Ribosylation Factor (GTPase)
Arp2/3	Actin-Related Proteins
AS160	Akt Substrat of 160 kDa (Rab GTPase)
CaIDAG-GEF1	Calcium/Diacylglycerol - GEF1
CaM	Calmoduline
CaMKK β	Calcium/Calmoduline dependent protein kinase kinase β
CEC	Circulation Extracorporelle
CD62P	P-selectine
Cdc42	Cell division cycle 42 (GTPase)
Clec-2	C-type lectin-like receptor 2
DAG	Diacylglycerol
DMS	Membranes de démarcation
DTS	Système tubulaire dense
eEF2K	eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase
Fak	Focal adhesion kinase
Fg	Fibrinogène
FT	Facteur Tissulaire
Fyn	Tyrosine-protein kinase Fyn
GAP	GTPase activating proteins
GBF1	Golgi Brefelin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GPIb-V-IX	Complexe glycoprotéique Ib-V-IX (récepteur au vWF)
GPIIbIIIa	Récepteur glycoprotéique IIb IIIa (récepteur au Fg)
GPVI	Récepteur glycoprotéique VI (récepteur au collagène)
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
IP	récepteur aux prostaglandines
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphate
IP3R	récepteur à l'IP3
LIMK	Lin-11 Isl-1 Mec-3 kinases
LKB1	Liver kinase B1
Lyn	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Lyn
MARCKS	Myristoylated alanin-rich protein kinase C substrate
M20	petite sous-unité de la MLCP de 20kDa
MLC	Myosin Light Chain
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
MLCP	Myosin Light Chain Phosphatase
MO25	Mouse protein 25
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MYPT	Myosin Phosphatase Targeting protein
NO	Nitroxic Oxide
OCS	Système canaliculaire ouvert
PAK	p-21 activated protein kinase
PAR	Protease-Activated Receptor (récepteur de la thrombine)
PDI	Protéine disulfide isomérase
PECAM-1	Platelet/endothelium cell adhesion molecule-1

Abbreviations	Nom
PG	Prostaglandines
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PLA2	Phospholipase A2
PLC β	Phospholipase C β
PLC γ 2	Phospholipase C γ 2
PPP1c δ	Protein Phosphatase 1c δ
PPP1R12C	Protein Phosphatase 1 Regulatory 12c
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
ROCK	Rho-associated protein Kinase
S6K1	p70-S6 kinase-1
SFK	Src Family Kinase
STO-609	Inhibiteur de CaMKK
STRAD	Ste-20-Related Adaptor
Syk	Spleen tyrosine kinase
TIAM-1	T-cell lymphoma Invasion and Metastasis 1 (Rac GEF)
TP	Thromboxane Prostanoid receptor (récepteur au TXA2)
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
TXA2	Thromboxane A2
TXB2	Thromboxane B2 (métabolite stable du TXA2)
U-46619	Analogue stable du TXA2
VASP	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein
VCAM	Vascular cell adhesion molecule-1
vWF	Facteur de von Willebrand
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE	protéine de la famille WASP

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

I. 1. Le rôle physiologique et pathologique des plaquettes sanguines

I. 1.1. Généralités

Les plaquettes sanguines, aussi appelées thrombocytes, ont été découvertes à la fin du XIX^{ème} siècle par Giulio Bizzozero, un des pionniers de l'histologie [1]. Cent ans plus tard, la recherche sur la biologie plaquettaire reste un champ d'intérêt majeur pour les scientifiques. En effet, les plaquettes jouent un rôle essentiel dans les processus hémostatiques et thrombotiques. Alors que l'hémostase est un processus physiologique permettant de maintenir l'intégrité des vaisseaux sanguins, les thromboses contribuent à la morbidité et la mortalité de pathologies cliniques comme l'infarctus du myocarde, la thrombose veineuse profonde, l'embolie pulmonaire ou même dans certains cas de cancer [2]. Depuis que ces maladies sont devenues les principales causes de mortalité dans les pays industrialisés, la thrombose est devenue un enjeu de santé publique et économique capital [3].

Depuis plusieurs dizaines d'années, des avancées majeures ont été réalisées, tant au niveau de la recherche fondamentale visant à élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle des fonctions plaquettaires, qu'au niveau de la recherche clinique examinant l'efficacité chez le patient des nouveaux anti-plaquettaires ou anti-coagulants. La plupart de ces médicaments entraînent cependant des effets indésirables, comme des saignements sévères. Le challenge actuel reste donc de parvenir à traiter les pathologies thrombotiques tout en limitant un défaut d'hémostase.

I. 1.2 L'hémostase

Un vaisseau sanguin est tapissé intérieurement d'une monocouche de cellules endothéliales directement en contact avec le sang. Les cellules endothéliales synthétisent à la fois des substances anti-thrombotiques et pro-thrombotiques. A l'état physiologique, la régulation de ce système est en faveur d'une situation anti-thrombotique. Par contre, lorsque la paroi endothéliale perd son intégrité, suite à une lésion, l'équilibre s'inverse et déclenche un mécanisme de réparation, appelé l'hémostase [4]. Ce processus finement régulé peut être

divisé en trois phases étroitement intriquées : l'hémostase primaire, la coagulation sanguine et la fibrinolyse (figure 1).

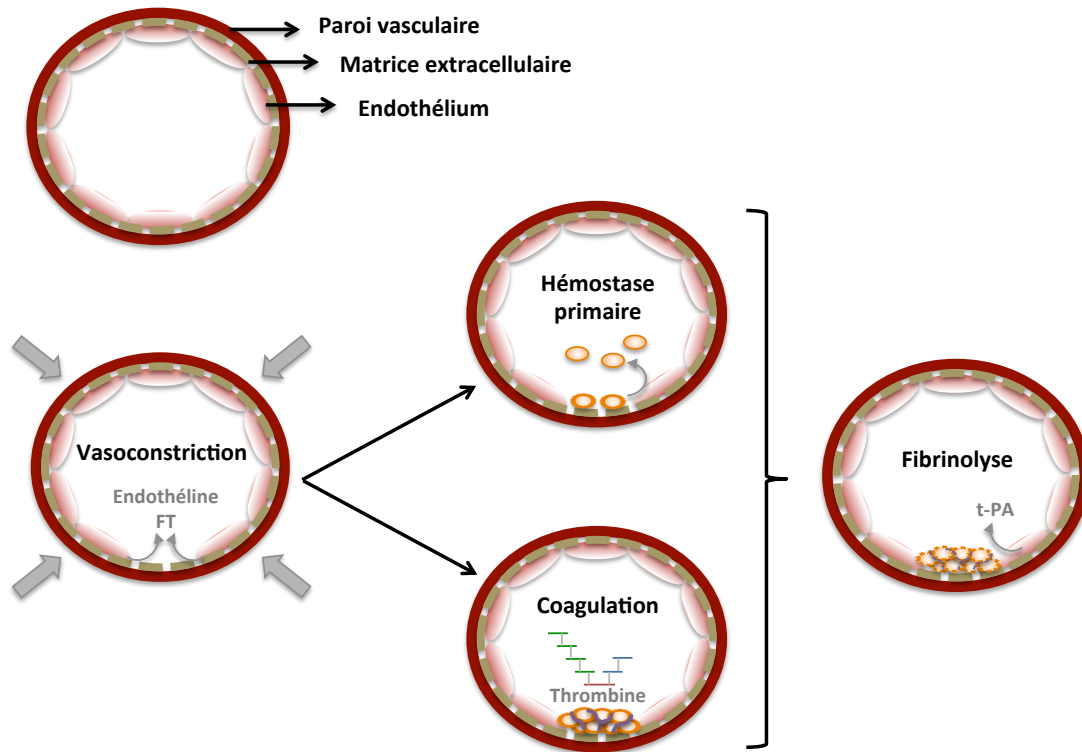


Figure 1. L'hémostase

Un vaisseau sanguin comporte plusieurs strates. De l'intérieur vers l'extérieur, on rencontre une monocouche endothéliale ancrée sur une matrice extracellulaire, le tout gainé par une paroi musculaire. L'hémostase se déclenche après une lésion de l'endothélium et peut se résumer en quatre étapes. 1) La vasoconstriction permet de ralentir les plaquettes sanguines circulantes. 2) L'hémostase primaire consiste en l'adhésion et l'activation des plaquettes. 3) La coagulation conduit à la production de thrombine nécessaire à la formation d'un caillot insoluble. 4) La fibrinolyse permet de résorber le caillot après la cicatrisation.

I.1.2.1. L'hémostase primaire

A l'endroit d'une brèche vasculaire, la matrice extracellulaire contenant des molécules thrombogéniques, est exposée aux éléments sanguins. On y retrouve notamment des protéines adhésives comme les fibres de collagène et des multimères de facteur de von Willebrand (vWF). De plus, l'endothélium lésé sécrète du facteur tissulaire (FT, aussi appelé thromboplastine ou FIII) et de l'endothéline, un puissant vasoconstricteur (figure 1). Les cellules musculaires insérées dans la paroi vasculaire se contractent (vasoconstriction), ce

qui diminue le flux sanguin de la zone à colmater. Tous ces éléments permettent la mise en place d'un terrain favorable à l'accumulation des plaquettes sanguines. Une fois que les plaquettes sont fixées à la matrice extracellulaire, elles vont s'activer et recruter d'autres plaquettes circulantes (figure 1). Ces différentes étapes conduisent à la formation du « clou plaquettaire » (ou thrombus blanc) de l'hémostase primaire. Elles permettent de limiter l'extrasation sanguine [4, 5].

1.1.2.2. La coagulation

Le processus de coagulation a été longtemps présenté comme une cascade de réactions enzymatiques en chaîne menant à la production de thrombine active (figure 2), constituée d'une voie dite intrinsèque, puisque tous les éléments nécessaires sont présents dans la circulation sanguine, et d'une voie extrinsèque qui fait intervenir le FT. En effet, ce dernier est constitutivement synthétisé par de nombreuses cellules extravasculaires qui ne sont pas en contact avec le sang, comme les cellules du muscle lisse, les péricytes ou les fibroblastes. De nombreuses évidences montrent que le FT se retrouve aussi dans le milieu intravasculaire puisqu'il est exprimé à la surface de leukocytes et de microparticules (MP) circulantes produites par différents types cellulaires [6]. Cependant, ce FT est sous une forme non-coagulante, ou encryptée, maintenue par un environnement de phospholipides membranaires neutres. Son activation complète nécessite l'action de la protéine disulfide isomérase (PDI), qui est sécrétée par une variété de cellules telles que les monocytes, les cellules endothéliales et les plaquettes, et l'exposition de phospholipides chargés négativement tels que les phosphatidylsérines [7].

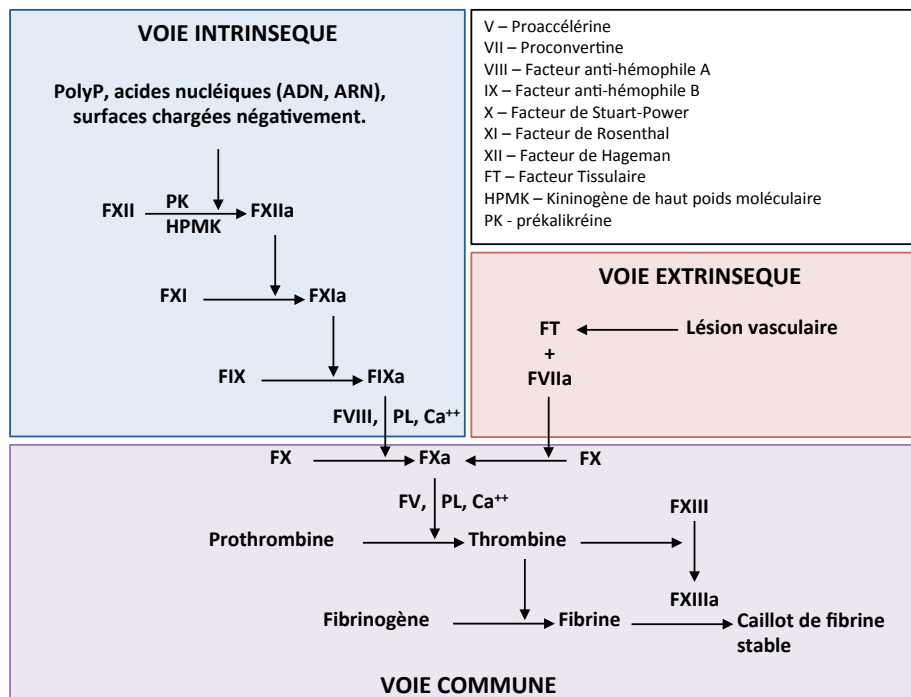


Figure 2. La cascade de coagulation

Le modèle classique du mécanisme de la coagulation comporte deux voies d'activation : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Le nom de la voie intrinsèque est dû à la présence de tous les éléments qui la composent dans la circulation sanguine. Aussi appelée voie de contact car elle peut être déclenchée par le contact du sang avec une surface chargée négativement comme les structures sous-endothéliales, des acides nucléiques, des polyphosphates ou la paroi d'un tube de collection. La fixation du facteur XII (FXII) sur cette surface électro-négative entraîne son auto-activation lente permettant la transformation de la prékallicréine (PK) en kallicréine en présence de kininogène de haut poids moléculaire (HPMK). La kallicréine poursuit l'activation du FXII par protéolyse (boucle d'amplification), ce qui déclenche la cascade de réactions enzymatiques. Les facteurs de coagulation sont des pro-enzymes ou zymogènes et certains nécessitent le concours du calcium et de phospholipides. La voie extrinsèque dépend de la présence du facteur tissulaire (FT) exposé à la circulation sanguine suite à une lésion cellulaire de la paroi vasculaire. Celui-ci fixe le FVIIa présent en très faible quantité dans le sang, et facilite son activation dans une réaction d'auto-activation. Les deux voies partagent une partie commune qui aboutit à l'activation du facteur X. Ce dernier peut dès lors former un complexe avec le facteur V, le complexe prothrombinase, permettant la conversion de la prothrombine en thrombine. Cette dernière transforme le fibrinogène soluble en monomère de fibrine. La thrombine permet l'activation des co-facteurs VIII et V afin de rendre les complexes ténase (IXa-VIIIa) et prothrombinase (Xa-Va) pleinement actifs. Elle clive aussi les facteurs FXI et FXIII impliqués dans la polymérisation de la fibrine nécessaire à la stabilité du thrombus.

Ce modèle de la cascade de coagulation a été adapté pour aboutir à un modèle cellulaire décrivant un réseau interactionnel d'une variété d'éléments de coagulation. Ce mécanisme comprend une phase d'initiation et de propagation dans laquelle les plaquettes jouent un rôle prépondérant (figure 3). La phase d'initiation débute par l'activation de la voie extrinsèque suite à une lésion vasculaire. Le FT exprimé à la surface de différents types cellulaires se lie avec le facteur VII présent en faible concentration dans la circulation

sanguine sous une forme active (FVIIa, +/-1%). Le complexe convertit le zymogène inactif FX circulant en enzyme active FXa qui pourra générer de petites quantités de thrombine (0,1-1 nM). Cette concentration en thrombine est suffisante pour induire la phase d'amplification, via l'activation du facteur XI (FXIa) et des cofacteurs V (FVa) et VIII (FVIIIa). La thrombine permet l'activation des plaquettes qui se traduit par l'exposition de phosphatidylsérines et la sécrétion des granules contenant entre autres du FT, du FV et du FIX, mais aussi des polyphosphates qui peuvent affecter plusieurs étapes de la cascade de coagulation comme l'activation du facteur XII (FXIIa), favorisant celle du facteur V (FVa) ou la stabilité structurelle du caillot de fibrine [8-10]. Les complexes ténase (IXa-VIIIa) et prothrombinases (Xa-Va) sont dès lors pleinement actifs et produisent de la thrombine localement de façon optimale. Celle-ci stabilise le caillot de fibrine par le clivage du fibrinogène soluble en monomères de fibrine, et par l'activation du facteur XIII (FXIIIa) qui est impliqué dans la formation de polymères insolubles de fibrine en créant des liaisons croisées, ce qui [8].

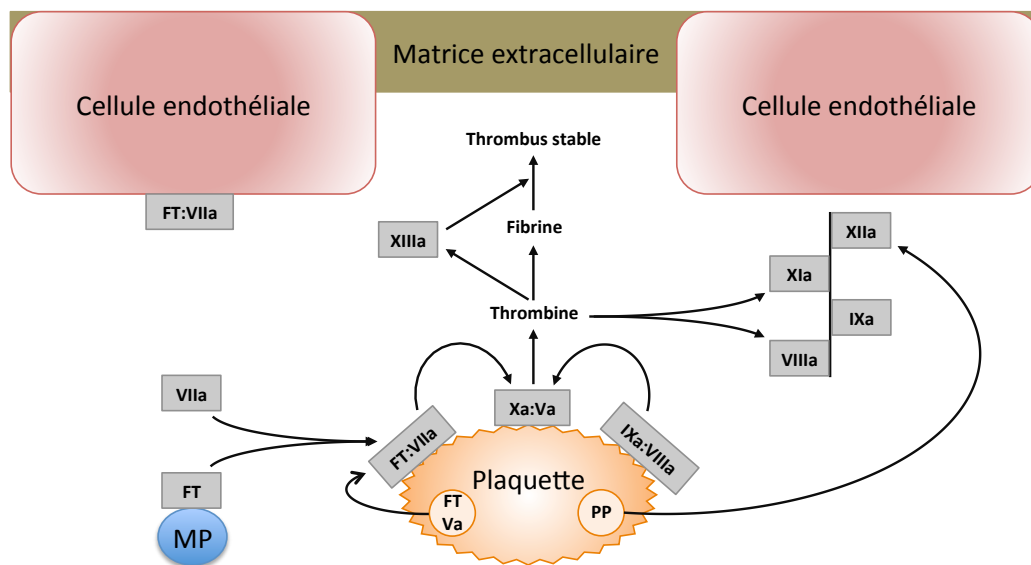


Figure 3. Le modèle cellulaire de coagulation

Le modèle comprend deux phases : (1) une phase d'initiation et (2) une phase de propagation. L'initiation débute lorsque le FT rentre en contact avec les éléments de la circulation sanguine. Un complexe se forme entre le FT et le FVIIa présent en petite quantité à la surface des plaquettes ou des cellules endothéliales activées, ce qui mène à une faible concentration de thrombine. Cette dernière induit la phase de propagation qui mène à l'activation de différents facteurs impliqués dans les voies intrinsèques ou extrinsèques. Ce modèle présente le lien étroit entre l'hémostase primaire, avec l'importance des plaquettes, et la coagulation aussi appelée hémostase secondaire. MP (Microparticule).

Chez l'homme, on constate un problème hémostatique plus ou moins marqué selon le facteur de coagulation impliqué. Une déficience sévère du FVII (moins de 1% par rapport à la valeur normale) provoque d'importantes hémorragies comparables à celles des patients hémophiles de type A ou B qui sont déficients en facteurs VIII ou IX, respectivement. Par contre, une déficience du FXI résulte en une faible augmentation de saignements (hémophilie de type C). Les patients déficients en facteur XII ne présentent pas d'anomalie de saignement. Cependant, des souris dépourvues du FXII sont résistantes aux thromboses artérielles et veineuses [11, 12]. Et très récemment, chez des primates, l'utilisation d'anticorps dirigés contre le FXII a montré une réduction de la formation du thrombus associé à un allongement de l'aPTT (« activated partial thromboplastin time ») avec une diminution de génération de thrombine et de formation de fibrine [13].

I.1.2.3. La fibrinolyse

La formation du caillot sanguin est limitée dans le temps et dans l'espace. En effet, une autre composante essentielle de l'hémostase est la dissolution du réseau de fibrine : la fibrinolyse. La fibrinolyse est déclenchée par différents stimuli qui aboutissent à la sécrétion du t-PA (« tissue plasminogen activator ») par les cellules endothéliales. Dès sa sécrétion, une partie du t-PA est neutralisée par son inhibiteur, le PAI (« plasminogen activator inhibitor »). Le t-PA non séquestré se fixe sur la fibrine. Son substrat, le plasminogène synthétisé par le foie, a également une forte affinité pour la fibrine et se fixe sur un site géographiquement proche de celui du t-PA. Le t-PA active le plasminogène fixé et assure ainsi une formation de plasmine strictement localisée au niveau du thrombus. La plasmine formée exerce son activité protéolytique sur la fibrine. Les produits de dégradation générés par la fibrinolyse sont mobilisés dans la circulation sanguine avant d'être épurés par le foie. La réaction reste limitée localement grâce à l'alpha2-anti-plasmine qui neutralise la plasmine dans la circulation [14].

Une seconde voie impliquant la pro-urokinase, synthétisée entre autres par les cellules endothéliales et les monocytes, permet l'activation de la fibrinolyse, principalement dans le compartiment extravasculaire. La pro-urokinase a une faible affinité pour la fibrine mais se fixe au plasminogène. Elle devient active après sa transformation en urokinase (u-PA) sous l'action de la kallikréine et de la plasmine, ce qui suggère que cette seconde voie est une amplification de la fibrinolyse. Le facteur XII (Facteur de Hagman) interviendrait aussi dans l'activation de la fibrinolyse mais son rôle est encore mal connu [4].

I.1.3. Les thromboses

Traditionnellement, les thromboses sont classées en deux grandes catégories selon leur physiopathologie, épidémiologie et la stratégie de traitements utilisée : les thromboses artérielles ou veineuses. Cependant, elles ne sont pas complètement isolées l'une de l'autre puisque des patients hospitalisés pour un infarctus du myocarde présentent un haut risque de développer un thrombose veineuse par la suite et inversement [15].

I.1.3.1 Les thromboses artérielles

Les thromboses artérielles se développent, entre autre, suite à la rupture d'une plaque d'athérome, situation dans laquelle le débit sanguin est élevé, particulièrement dans une coronaire. Une plaque d'athérome se crée par une accumulation de lipoprotéines (LDL, « Low Density Lipoprotein ») et de macrophages chargés en cholestérol (les cellules spumeuses) au niveau du sous-endothélium vasculaire (figure 4). A long terme, cette plaque grandit ce qui réduit la lumière du vaisseau et perturbe l'intégrité de l'endothélium déjà dysfonctionnel. Un fois la paroi fissurée, on voit apparaître un caillot riche en plaquettes et en fibrine, appelé thrombus blanc. Lorsque celui-ci aboutit à l'obstruction complète du vaisseau, cela entraîne des conséquences particulièrement dramatiques comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral (AVC). Vu l'importance du rôle joué par les plaquettes dans ce phénomène, les traitements sont principalement anti-plaquettaires (l'aspirine, le clopidogrel) et/ou hypocholestérolémiants (les statines) [16].

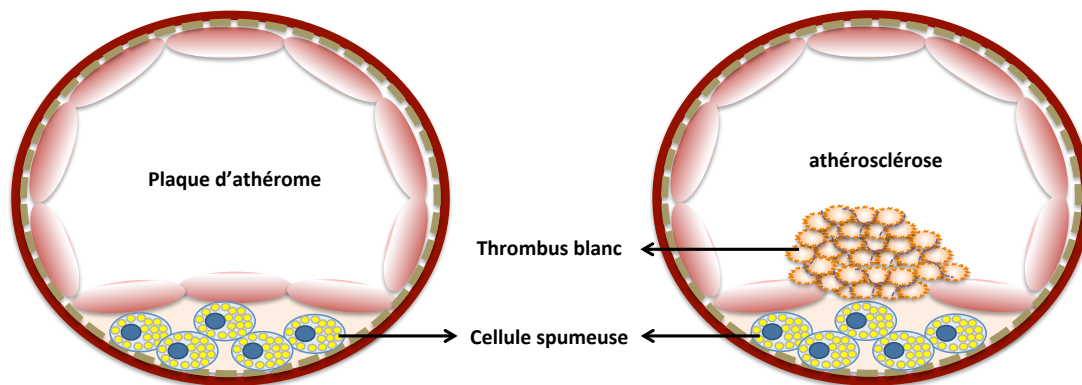


Figure 4. L'athérosclérose

L'athérosclérose se caractérise par le dépôt d'une plaque essentiellement composée de lipides (plaque d'athérome) dans la paroi interne d'une artère. A terme, cette plaque peut entraîner la lésion de la paroi (sclérose) et mener à l'obstruction du vaisseau (thrombose) ou s'en détacher avec des conséquences dramatiques (embolies).

I.1.3.2 Les thromboses veineuses

Contrairement aux thromboses artérielles, les thromboses veineuses apparaissent plutôt dans les vaisseaux à faible débit et sans nécessairement de lésion vasculaire au préalable. C'est la pathologie vasculaire la plus fréquente après un infarctus du myocarde ou un AVC. Elle comprend les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires. Un caillot qui survient dans une veine profonde des membres inférieurs fait souvent suite à une immobilisation et un déséquilibre des facteurs de coagulation après une intervention chirurgicale. Il contient principalement des globules rouges et de la fibrine (thrombus rouge). La cascade de coagulation joue un rôle prédominant dans ce phénomène. De ce fait, ce sont surtout des anti-coagulants qui seront utilisés en guise de traitement (anti-vitamines K, des inhibiteurs des facteurs FII ou FX).

Lorsque le caillot se détache en totalité ou en partie, il peut migrer et causer une embolie. Si le caillot migre jusqu'aux poumons et obstrue une ou plusieurs artères pulmonaires, cela entraîne des troubles respiratoires plus ou moins sévères avec des conséquences possibles sur la fonction cardiaque [15].

I. 2. L'origine et la structure des plaquettes sanguines

I.2.1. L'origine des plaquettes

Le nombre de plaquettes chez l'homme adulte est d'environ $150 \text{ à } 400 \times 10^3/\mu\text{l}$ de sang (le sang de la souris en contient environ $10^6/\mu\text{l}$). A peu près 10^9 nouvelles plaquettes sont produites chaque jour à partir des mégacaryocytes. Ce sont des fragments cellulaires dépourvus de noyau dont la durée de vie est de 8 à 10 jours [17].

Les mégacaryocytes sont issus des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes et se situent dans une niche ostéoblastique de la moëlle osseuse le temps de leur maturation. Celle-ci consiste en une série de réplifications de l'ADN sans division cellulaire (jusqu'à 64 fois), un phénomène appelé endomitose. Parallèlement, une maturation cytoplasmique s'organise pour former les granules ainsi qu'un système de membranes de démarcation (DMS). Ce système est en continuité avec la membrane plasmique du mégacaryocyte et se définit comme une réserve de membranes indispensable à la formation des proplaquettes [18]. Une fois mures, les mégacaryocytes migrent dans une région proche des capillaires sinusoides, une niche vasculaire dans laquelle ils peuvent émettre de longs prolongements cytoplasmiques desquels seront issue les proplaquettes. Un seul mégacaryocyte peut engendrer la production de 3000 plaquettes [19, 20].

La production des proplaquettes commence avec l'érosion d'un pôle du mégacaryocyte. Ce processus implique une réorganisation complexe du cytosquelette, composé principalement de tubuline et d'actine. L'absence de microtubules, constitués de dimères de tubuline α et β 1, est d'ailleurs associée à une thrombocytopenie, ce qui démontre leur importance dans la formation des proplaquettes et leur libération [21]. Le rôle des filaments d'actine dans ce phénomène est moins connu. Si l'utilisation de la cytochalasine B (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine) n'empêche pas la formation des pseudopodes, elle inhibe la formation de ramifications, processus permettant de multiplier le nombre de proplaquettes libérées [20].

Le modèle de production de plaquettes le plus généralement admis est celui proposé par l'équipe de JE Italiano [20, 22, 23] selon lequel les mégacaryocytes génèreraient des structures proplaquettaires hétérogènes, impliquant que la morphogenèse des plaquettes se

poursuivrait dans la circulation périphérique. Une succession d'allongements et de fissions aboutirait finalement à la formation des plaquettes individuelles (figure 5).

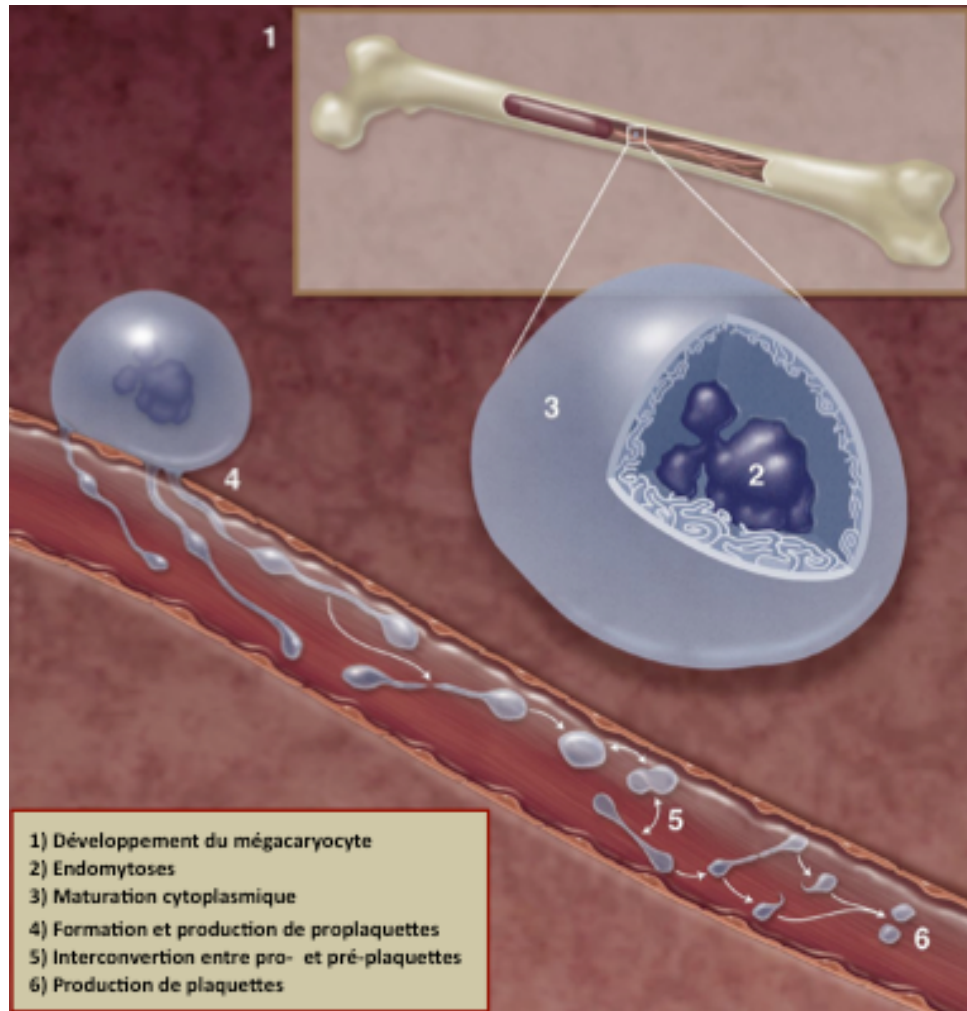


Figure 5. La formation des plaquettes sanguines

La maturation d'un mégacaryocyte se fait par endomytose dans la moelle osseuse, devenant une énorme cellule à plusieurs noyaux. Le mégacaryocyte produit des prolongements cytoplasmiques dans les capillaires où se forment d'abord des proplaquettes qui deviendront des plaquettes suite à une succession d'allongements et de fissions. (Adaptaté de Machlus & Italiano, JCB 2013)

1.2.2. La structure plaquettaire

Les plaquettes sanguines sont les plus petits éléments circulant dans le sang avec un diamètre de 2 à 4 μm chez l'homme (0.5 μm chez la souris).

Elles contiennent des éléments structurels qui leur sont propres (figure 6).

1.2.2. Le système membranaire

1.1.2.2.1. Le glycocalyx

La membrane plaquettaire est composée d'une couche externe, le glycocalyx, plus épaisse que celle des autres cellules, et d'une bicouche lipidique. Le glycocalyx n'est pas simplement une barrière qui permet de séparer l'intérieur de l'extérieur de la plaquette, c'est aussi une structure dynamique qui sert de site de premier contact percevant les changements dans le compartiment vasculaire qui nécessite une réponse hémostatique. Le glycocalyx est couvert de récepteurs (des glycoprotéines entre autres) impliqués dans l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire. La bicouche lipidique sur laquelle repose le glycocalyx est une membrane unitaire typique. Cette surface joue un rôle important pour la formation du caillot car, une fois activée, la plaquette expose des phospholipides anioniques, les phosphatidylsérines, sur lesquels les facteurs de coagulation vont pouvoir interagir pour former les complexes pro-thrombinase et ténase [17].

1.1.2.2.2. Le système canaliculaire ouvert

Un réseau d'invaginations de la membrane plasmique forme le système canaliculaire ouvert (OCS). Celui-ci a plusieurs fonctions majeures. Il favorise l'endocytose ou la sécrétion du contenu des granules plaquettaires. Il constitue également une réserve membranaire indispensable pour soutenir le changement de forme drastique associé à l'activation plaquettaire [17].

1.1.2.2.3. Le système tubulaire dense

Le système tubulaire dense (DTS) est issu du réticulum endoplasmique résiduel du mégacaryocyte et sert de réserve de calcium comme les sarcotubules des cellules musculaires [17].

1.1.2.3. Les organites

Trois types d'organites sécrétoires sont présents dans le cytoplasme plaquettaire: des lysosomes, des granules α et des granules denses (aussi nommé granules δ) [17, 19].

1.1.2.3.1. Les granules α

Les granules α sont les granules les plus abondants (40 à 80/plaquettes). Ils ont un diamètre de 200 à 500 nm. Leur contenu est élaboré soit à partir de protéines endogènes, soit à partir de protéines plasmatiques exogènes capturées par endocytose ou par pinocytose. Les granules α contiennent des facteurs hémostatiques (FV et vWF), du fibrinogène, des facteurs de croissances (PDGF, « Platelet Derived Growth Factor » ; bFGF, « Fibroblast Growth Factor »), des métalloprotéases (MMP2 et MMP9), des cytokines (TNF α , « Tumor Necrosis Factor » ;...), mais aussi des facteurs pro-angiogéniques (angiogénine ; VEGF, « Vascular Endothelial Growth Factor ») et anti-angiogéniques (angiostatine ; PF4, « Platelet Factor 4 ») [24, 25]. Ces médiateurs sont logés dans des populations distinctes et spécifiques de granules α [26]. Il a été montré que l'activation sélective du récepteur thrombinique PAR-1 (« Protease-Activated Receptor 1 ») induit la sécrétion de la population de granules contenant les facteurs pro-angiogéniques, tandis celle du récepteur PAR-4 entraîne la sécrétion des facteurs anti-angiogéniques [26].

Plusieurs protéines membranaires essentielles aux fonctions plaquettaires se situent à la surface des granules α , notamment le récepteur au fibrinogène (GPIIb/IIIa) et la P-sélectine (CD62P) [27].

1.1.2.3.2. Les granules denses

Les granules denses ont une taille de 250nm environ et ne sont que 3 à 6 par plaquette [28]. En plus des ions calcium et magnésium, ils contiennent des catécholamines, de la sérotonine et des nucléotides comme l'ADP ($\pm 650\text{mM}$) et l'ATP ($\pm 430\text{mM}$) qui sont des agonistes secondaires solubles participant à l'activation plaquettaire. La sécrétion des granules denses impliquerait des mécanismes moléculaires dépendant du cytosquelette d'actine mais différents de ceux conduisant à la sécrétion des granules α [28, 29].

Le cytoplasme contient aussi des mitochondries fonctionnelles et des grains de glycogène qui témoignent de l'activité métabolique de la plaquette [30].

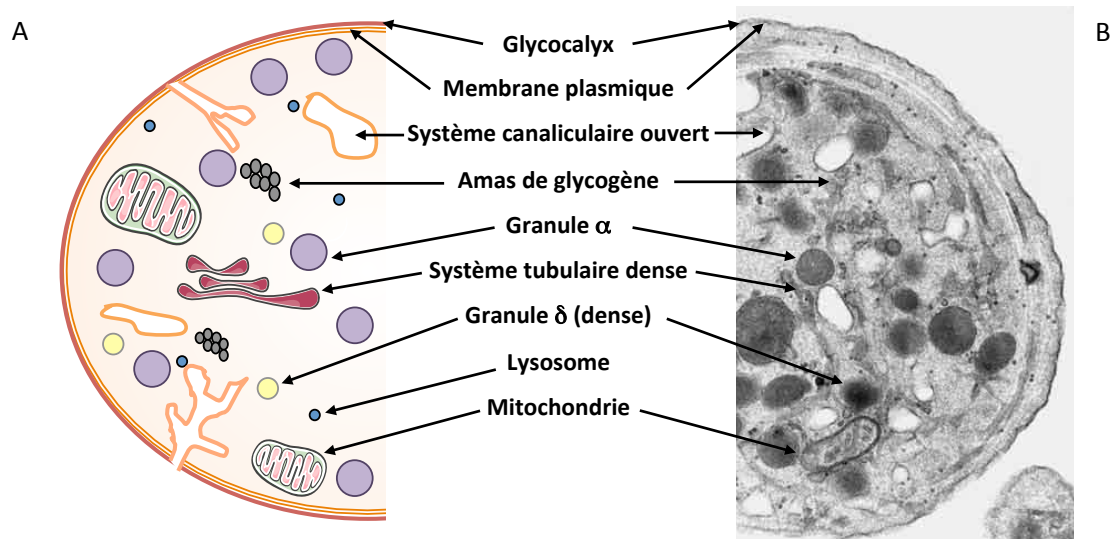


Figure 6. La structure d'une plaquette

(A) Schéma reprenant les différents éléments qui composent la plaquette sanguine. (B) Image en microscopie électronique à transmission issue du laboratoire : Platelet Research Laboratory, Barcelone, Espagne.

1.1.2.4. Le cytosquelette de la plaquette au repos

Il est composé de trois éléments majeurs : un anneau de microtubules périphériques, un squelette membranaire à base de spectrine et de filaments d'actine connectés à la face cytoplasmique de la membrane plasmique, et un réseau rigide de filaments d'actine interconnectés qui remplit l'espace cytoplasmique de la cellule. Des protéines de filaments

intermédiaires telles que la vimentine ou la desmine ont également été mises en évidence. Elles participent au maintien de l'intégrité mécanique des plaquettes en se liant aux microtubules et aux microfilaments d'actine au niveau de la membrane plasmique [31].

1.1.2.4.1. L'anneau de microtubules

Le réseau sous membranaire de microtubules est responsable de la forme discoïde des plaquettes au repos. Il est formé par l'assemblage de 8 à 12 tours de filament de microtubules constitués d'hétérodimères d' α - β tubuline (figure 7). Les plaquettes expriment quatre isoformes de la β -tubuline (β 1, β 2, β 4 et β 5) avec une prédominance de β 1 dans les plaquettes humaines et murines [32]. Les microtubules sont des structures polarisées : la polymérisation a lieu à l'extrémité positive et la dépolymérisation, à l'extrémité négative. Dans la plaquette sanguine, la concentration en tubuline est de 70 μ M et 40% de la protéine est présente sous forme polymérisée. A côté de ce rôle de structure, les microtubules régulent plusieurs aspects de la motilité cytoplasmique, comme la formation de proplaquettes dans le mégacaryocyte ou le transport des vésicules plaquettaires [18, 33, 34]. Ces fonctions sont assurées par la liaison de deux protéines « moteurs », la dynéine et la kinésine [34].

Les plaquettes de souris déficientes en tubuline β 1 ont un contenu en tubuline drastiquement diminué. Elles présentent un anneau discontinu de microtubules et une altération de leur forme discoïde au repos. Des études réalisées dans les mégacaryocytes de ces souris démontrent que la tubuline β 1 est en effet essentielle à la formation des proplaquettes et à la production de plaquettes discoïdes dans la circulation [32].

En 2005, une substitution Q43P dans la séquence de la tubuline β 1 a été mise en évidence chez l'humain. Les porteurs hétérozygotes du variant Q43P sont caractérisés par une expression réduite de la protéine associée à l'apparition d'une population de plaquettes plus larges et sphéroïdes [35]. Au contraire des souris déficientes en tubuline β 1 qui présentent des anomalies plaquettaires mineures, la substitution Q43P chez l'humain entraîne un défaut d'adhésion, de sécrétion et d'agrégation plaquettaires, suggérant que les patients porteurs de cette mutation pourraient être protégés des risques thrombotiques associés aux maladies cardiovasculaires [35].

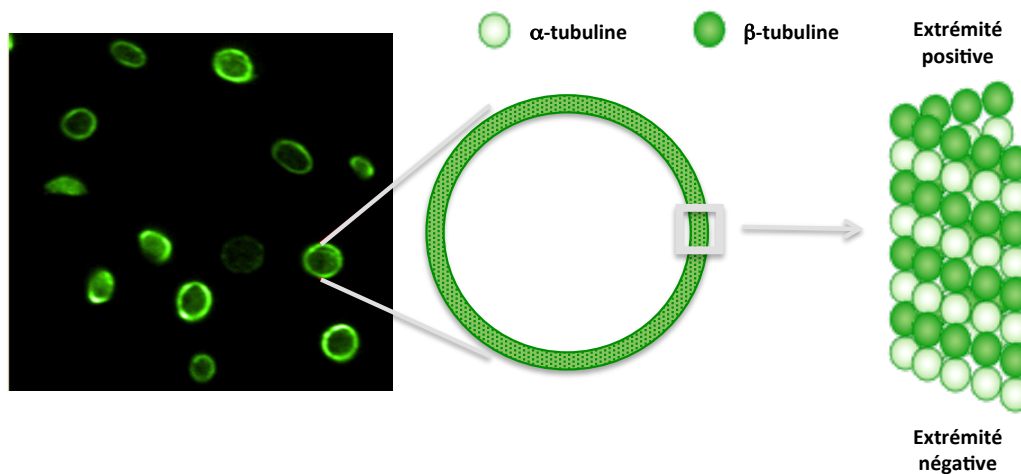


Figure 7. L'anneau membranaire de microtubules.

A gauche, une image en microscopie à fluorescence d'un anneau de microtubules dans les plaquettes au repos marqué par un anticorps, couplé à fluorochrome (GFP), dirigé contre la tubuline. A droite, une représentation schématique de la composition d'un anneau de microtubules. Il comporte des filaments constitués d'hétérodimères d' α - β tubuline. (Adapté de Ravid K., Blood 2008)

1.1.2.4.2. Le cytosquelette d'actine

L'actine est la protéine plaquettaire la plus abondante (550 μ M) [36]. Le génome humain contient quatre gènes codant pour des isoformes musculaires impliquées dans la machinerie contractile (muscle squelettique : α -actine1 ; muscle cardiaque : α -actine cardiaque ; muscle lisse : α -actine2 et γ -actine2) et deux gènes codant pour des isoformes présentes dans les cellules non musculaires (β -actine et γ -actine1). Les filaments d'actine (ou F-actine) sont polarisés avec une extrémité positive de polymérisation, appelée l'extrémité barbue, et une extrémité négative de dépolymérisation, appelée l'extrémité pointue. Dans les plaquettes au repos, 40% de l'actine forme 2000 à 5000 filaments [37]. Le reste de l'actine monomérique (G-actine) forme un complexe avec la β 4-thymosine dans le cytoplasme.

Le réseau d'actine d'une plaquette est distribué à la membrane et dans l'espace cytoplasmique. Il joue plusieurs rôles clés : (1) il contribue au maintien de la forme discoïde des plaquettes au repos, (2) il régule le changement de forme de la plaquette activée et (3) l'assemblage des filopodes et des lamellipodes, (4) il participe à l'activation du récepteur GPIIb/IIIa (5) ainsi qu'au mouvement des composants cellulaires durant l'adhésion et l'activation plaquettaires [36].

a) Le squelette membranaire

Le squelette membranaire est un assemblage en deux dimensions de brins de spectrine qui s'interconnectent en liant de petits filaments d'actine. La spectrine est également connectée aux filaments radiaires du cytosquelette cytoplasmique (figure 8). Son affinité pour l'actine est augmentée par la liaison de l'adducine à l'extrémité pointue des filaments d'actine [37]. Dans sa partie C-terminale, l'adducine contient un domaine de 22 acides aminés présentant une homologie importante avec les protéines de la famille MARCKS (« Microtubule-Affinity-Regulating-Kinase »). Ce domaine est essentiel à la fonction de l'adducine et à la régulation du squelette membranaire. Sa phosphorylation par la PKC (« Protein Kinase C ») et sa liaison au complexe calcium/calmoduline sont deux événements qui inhibent le recrutement de la spectrine et la liaison à l'actine.

A côté de la spectrine, la filamine joue également un rôle central dans l'organisation du squelette membranaire. Deux isoformes sont présentes dans la plaquette (filamine A et B) et s'assemblent en homodimères qui lient l'actine via un domaine de liaison N-terminal. La filamine A/B possède également deux sites de liaison pour la queue cytoplasmique de la glycoprotéine Ib α du récepteur au vWF, le complexe GPIb-IX-V, ce qui permet de connecter le cytosquelette d'actine aux récepteurs membranaires (figure 8). Ce pontage est essentiel à l'ancrage du récepteur à la membrane plasmique [38], au maintien de la forme et de la taille des plaquettes [39], à la production de proplaquettes et la formation des plaquettes [40] et au processus d'adhésion [41]. Il contribue aussi au recrutement de molécules de signalisation composant le « signalosome » du récepteur GPIb-IX-V. Les plaquettes de souris déficientes pour la filamine A sont moins nombreuses, plus larges et plus fragiles [42]. Un phénotype similaire est observé dans les plaquettes de souris déficientes pour la sous-unité GPIb α , ou dans les plaquettes de patients souffrant du syndrome de Bernard-Soulier, la pathologie humaine correspondant à la délétion de GPIb α .

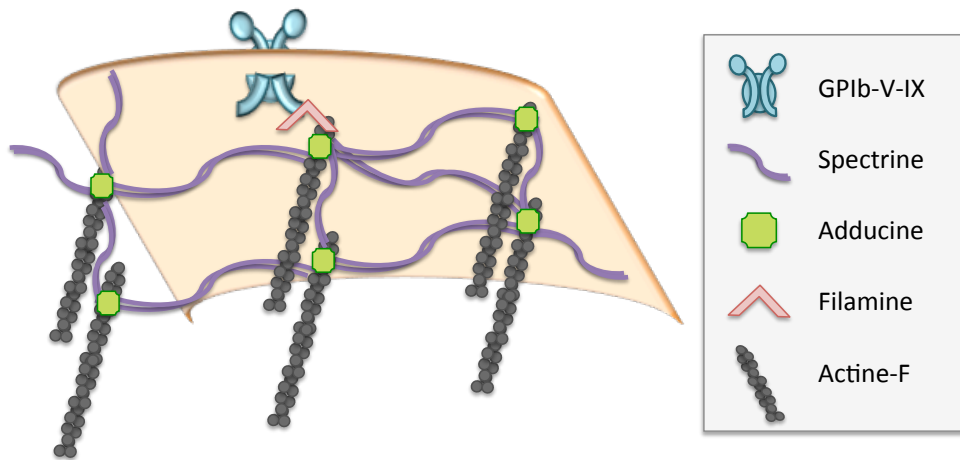


Figure 8. Le squelette membranaire d'actine.

Schéma représentatif du squelette membranaire avec les filaments d'actine interconnectés à l'aide de la spectrine et de l'adducine. La filamine permet de connecter le récepteur du vWF au cytosquelette d'actine.

b) Le squelette d'actine cytoplasmique

Le squelette cytoplasmique de la plaquette au repos est un réseau de filaments d'actine interconnectés par l'intermédiaire de protéines telles que l' α -actinine qui lient les filaments entre eux, et la filamine qui connecte le cytosquelette au squelette membranaire et aux récepteurs [17]. L'actine forme aussi des filaments contractiles en s'associant à la myosine II, un hexamère constitué de deux chaînes lourdes et de deux paires de chaînes légères. La phosphorylation des chaînes légères régulatrices de la myosine II (MLC, parfois nommées RLC ou MRLC) entraîne un changement de conformation qui active l'activité ATPasique de la myosine et engendre la contraction des filaments.

I. 3. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la biologie des plaquettes

La fonction physiologique primordiale des plaquettes est la formation d'un thrombus hémostatique afin de prévenir l'extravasation sanguine et maintenir l'intégrité de la paroi vasculaire. En circulation, les plaquettes sont non-adhérentes et dites dans un état de repos. Elles s'activent au contact de protéines adhésives de la matrice extracellulaires exposées suite à une lésion au niveau de l'endothélium, ou par des agonistes plaquettaires solubles.

L'activation plaquettaire se déroule en plusieurs étapes : (1) La reconnaissance par des récepteurs plaquettaires spécifiques de protéines adhésives, (2) l'augmentation de calcium, (3) la sécrétion des granules, (4) l'activation plaquettaire par les agonistes solubles (5) l'activation du récepteur au fibrinogène GPIIbIIIa (médiée par la voie « *Inside-out signaling* »), l'agrégation et, consécutivement, (6) la rétraction du clou plaquettaire (médiée par la voie « *Outside-in signaling* »). Bien sûr, l'activation plaquettaire est un processus hautement dynamique impliquant de multiples interactions entre les différentes voies de signalisation et des boucles de rétro-contrôles [43, 44].

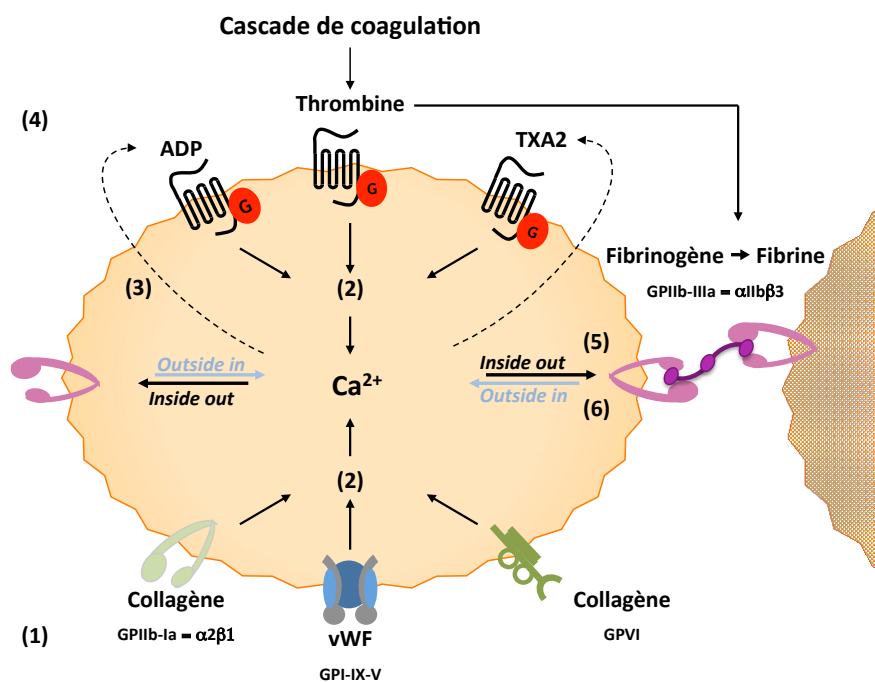


Figure 9. Les voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire

Schéma représentatif des différentes étapes au cours de l'activation des plaquettes sanguines dans le processus hémostatique : (1) l'activation par les récepteurs d'adhésion, (2) l'augmentation calcique, (3) la sécrétion des granules, (4) l'activation par les agonistes solubles, (5) la voie « *Inside-out* » menant à l'activation du récepteur intégrine GPIIbIIIa, (6) la voie « *Outside-in* » menant à la rétraction du clou plaquettaire.

I.3.1. Les récepteurs de l'adhésion (figure 10)

Lorsque les forces de cisaillement sont importantes, comme dans les artérioles ou les artères sténosées, le vWF est un prérequis pour l'adhésion des plaquettes. Le vWF circulant dans le plasma a une faible affinité pour son récepteur. Cependant quand il est immobilisé sur le collagène sous-endothélial et exposé aux forces de cisaillement, il adopte une conformation différente qui lui permet une meilleure interaction avec son récepteur. Cette régulation empêche ainsi une liaison aléatoire des plaquettes circulantes au vWF du plasma. En outre, en se liant avec le FVIII, il est protégé contre une protéolyse dans la circulation sanguine. Le vWF est une protéine multimérique synthétisée par les mégacaryocytes et les cellules endothéliales où il peut aussi être stocké dans les granules α et corps de Weibel-Palade, respectivement. Un défaut qualitatif ou quantitatif de cette protéine conduit à la maladie de von Willebrand avec différents grades et des conséquences hémorragiques variables [45].

Le vWF est reconnu par le complexe GPIb-V-IX fortement présent à la surface des plaquettes à raison de 25000 copies. Cette interaction ne permet cependant qu'un attachement transitoire des plaquettes. Une fois ralenties, elles vont pouvoir se lier au vWF via l'intégrine GPIIb/IIIa et s'associer au collagène grâce à la glycoprotéine GPVI et à l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Ces liaisons vont assurer une adhésion stable des plaquettes [46, 47].

D'autres protéines de la matrice extracellulaire participent au processus d'adhésion des plaquettes, comme la laminine, la fibronectine et la vitronectine. Les interactions impliquant la fibronectine et la vitronectine ne semblent pas jouer un rôle clé dans l'hémostase primaire. Par contre, l'importante contribution des laminines dans la formation du thrombus a récemment été démontrée *in vivo* [48].

Les plaquettes expriment abondamment un récepteur de type lectine, CLEC-2 (« C-type lectin-like receptor 2 »). Son ligand connu est la podoplanine qui est exprimée par une variété de tissus mais pas par les cellules endothéliales vasculaires. Pourtant, plusieurs études utilisant des anticorps spécifiques ou un modèle génétique de souris déficiente pour CLEC-2, montrent une altération de la formation d'un thrombus. Cela suggère que ce récepteur a probablement un rôle à jouer dans les processus hémostatique, par l'intermédiaire d'un ligand encore non identifié [49, 50].

Bien que les signalisations induites par ces différents récepteurs possèdent des caractéristiques qui leurs sont propres, elles partagent aussi de nombreuses cibles, principalement des tyrosines kinases. Aussi, un concept qui se généralise est celui des microdomaines enrichis en glycolipides (aussi appelé « lipid raft ») où se regroupent les acteurs nécessaires à la transduction du signal [51].

I.3.1.1. Le complexe GPIb-V-IX

Quatre protéines transmembranaires distinctes s'assemblent pour former le complexe : deux GPIb α (135KDa), deux GPIb β (26KDa), un GPV (82KDa) et deux GPIX (20KDa). GPIb α et GPIb β sont associées entre elles par des ponts di-sulfures, et liées par des liaisons non-covalentes à GPV et GPIX [38]. Chez l'homme, un défaut de fonction du complexe est associé au syndrome de Bernard Soulier, une maladie congénitale caractérisée par des saignements sévères et accompagnée d'un défaut du nombre et de la taille des plaquettes (macrothrombocytopenia).

La région cytoplasmique de GPIb α est associée à la filamine, la calmoduline et la protéine 14-3-3 ζ . La filamine, en plus de créer un pont avec le cytosquelette, contribue au recrutement de la tyrosine kinase CSK (« C-Src Kinase ») de la famille des SFK (« Src Family kinase »). L'activation de cette enzyme conduit à la phosphorylation d'une autre tyrosine kinase, Syk (« Spleen Tyrosine Kinase »), qui mène à une modeste activation de la PLC γ 2 (« Phospholipase C γ 2 ») [52]. Les PLC sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et inositol-1,4,5-triphosphate (IP3). L'IP3 est responsable de l'augmentation intracellulaire de calcium.

En plus d'induire une augmentation de calcium via la phospholipase, le complexe GPIb-V-IX participe à l'activation du récepteur au fibrinogène, GPIIb/IIIa, via la voie PI3K/PKB (« Phosphoinositide 3 kinase », « Protein Kinase B » aussi appelée Akt) [53]. Il est suggéré que la sous-unité régulatrice p85 α de la PI3K interagit indirectement avec GPIb α par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice 14-3-3 ζ . De plus, des expériences de co-immunoprécipitation ont montré qu'une autre SFK, Lyn, forme un complexe avec la sous-unité p85 α de la PI3K et GPIb α dans les plaquettes activées, suggérant que la PI3K est impliquée dans l'activation de cette tyrosine kinase en aval du récepteur [54].

La calmoduline est une protéine sensible à la concentration en calcium cytosolique avec qui elle forme un complexe. Elle participe à la régulation d'un grand nombre de protéines qui en dépendent, comme la kinase qui phosphoryle les MLC (MLCK) jouant un rôle majeur dans la réorganisation et la contraction du cytosquelette d'actine [55].

Le vWF n'est pas le seul ligand du complexe GPIb-V-IX. Depuis les années 70, plusieurs études montrent que la thrombine, l'enzyme clé de la coagulation sanguine et un puissant agoniste plaquettaire, peut se lier à GPIb α et cliver la GPV [56]. Si le clivage de ce dernier ne semble pas impliqué dans l'activation plaquettaire en réponse à la thrombine [57], la liaison de la thrombine avec le GPIb α contribue quand même à son rôle physiologique. En effet, des plaquettes de patients présentant le syndrome de Bernard Soulier ont une réduction de l'agrégation induite par la thrombine [58].

1.3.1.2. Le récepteur GPVI

Le récepteur GPVI est exprimé uniquement dans les mégacaryocytes et les plaquettes (entre 3000 à 5000 copies par plaquette). La région extracellulaire du récepteur est composée de deux domaines de type immunoglobuline (D1 et D2). Dans sa région transmembranaire, se trouve un résidu arginine formant un pont salin avec le résidu asparagine de FcR- γ . Ils forment ainsi un complexe dimérique essentiel à l'activité du récepteur [59]. La partie cytosolique contient une région riche en proline qui lie le domaine SH3 des tyrosines kinases de la famille des Src-kinases, Fyn et Lyn [60]. Lorsque le collagène se fixe à son récepteur, il entraîne le rapprochement de Fyn et Lyn avec le motif ITAM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif ») du récepteur FcR- γ , ce qui entraîne sa phosphorylation. Ceci permet la liaison avec le domaine SH2 de Syk, déclenchant à son tour son autophosphorylation et son activation. Dès lors, Syk activée recrute des protéines adaptatrices (LAT, « Linker for Activation of T-cells » ; SLP-76, « SH2 domain containing Leukocyte Protein of 76 KDa » ; Vav proteins) et effectrices qui vont contribuer à l'activation de PLC γ 2 et des petites GTPases de la famille Rho, essentielles dans le remodelage des filaments d'actine [61-63].

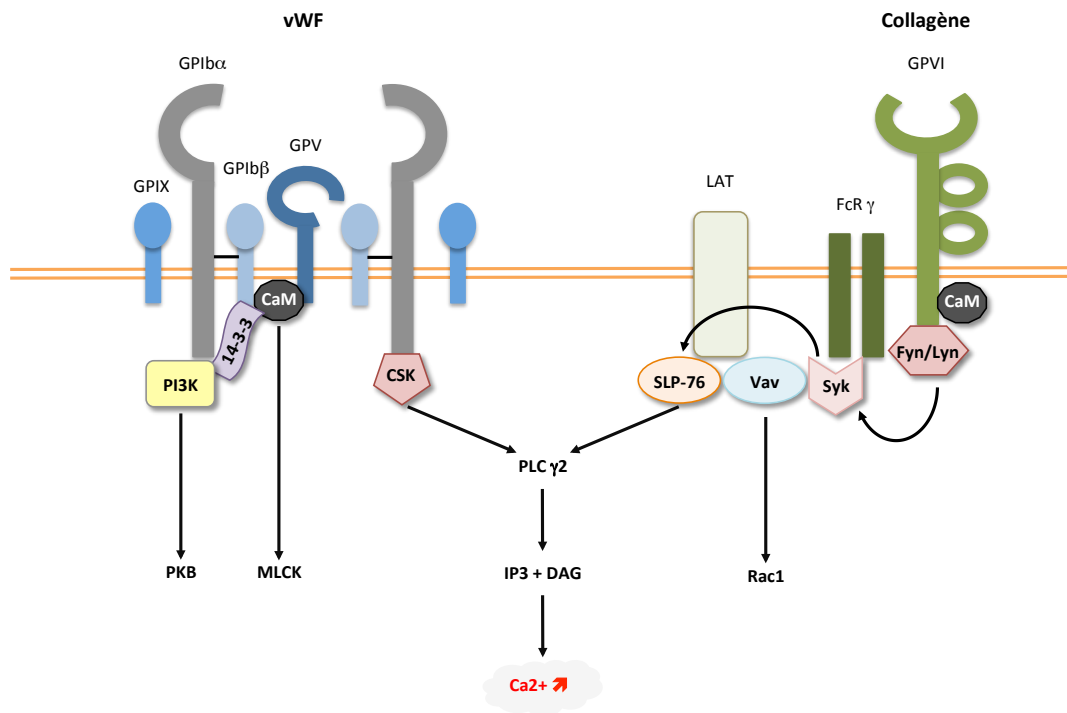


Figure 10. Les principaux récepteurs d'adhésion

Schéma représentatif des deux signalisations principales induites par les récepteurs impliqués dans l'adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire. Le complexe GPIb-V-IX reconnaît le vWF et mène à l'activation de PLCγ2 (« Phospholipase C γ2 ») via CSK (« c-Src Kinase »), ce qui mène à une augmentation de calcium intracellulaire. Il conduit aussi à l'activation de la voie PI3K/PKB (« Phosphoinositide 3 Kinase » ; « Protein Kinase B »). Le collagène se lie au GPVI et induit également une augmentation de calcium intracellulaire via d'autres tyrosines kinase (Fyn, Lyn et Syk) et des protéines adaptatrices (LAT, « Linker for Activation of T-cells » ; SLP-76, « SH2 domain containing Leukocyte Protein of 76 KDa » et Vav). (CaM, « Calmodulin » ; DAG, « Diacylglycerol » ; IP3, « Inositol-1,4,5-triphosphate » ; MLCK, « Myosin Light Chain Kinase » ; Syk, « Spleen Tyrosine Kinase »).

I.3.2. Les récepteurs aux agonistes solubles

L'activation plaquettaire proprement dite est caractérisée par la sécrétion d'agonistes secondaires solubles, notamment l'ADP, la sérotonine, l'adrénaline et la production de thromboxane A2 (TXA2). Cette étape amplifie le stimulus initial et provoque le recrutement d'autres plaquettes sur le site de la lésion. Elle est aussi associée à l'exposition en surface des phosphatidylsérines membranaires et à l'activation du récepteur au fibrinogène (GPIIb/IIIa). La thrombine, issue de la cascade de coagulation, et l'ensemble de ces agonistes secondaires, exercent leurs effets sur la plaquette via des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (figure 11) [46, 64].

Les GPCRs (« G Protein-Coupled Receptor ») représentent la plus grande famille de récepteurs dans le génome humain avec environ 340 types de récepteurs répertoriés, sans compter les récepteurs olfactifs [65]. Ils sont activés par une large variété de ligands tels que des amines, des lipides, des peptides, des ions, des nucléotides ou des protéases [66]. Ils partagent une structure commune composée de 7 segments transmembranaires avec une partie extracellulaire N-terminale et une queue intracellulaire C-terminale. La région de plus grande homologie se situe dans la partie transmembranaire alors que la région N-terminale, dont la longueur peut varier de 10 à 600 acides aminés, est peu conservée. La partie intracellulaire C-terminale s'associe à une protéine G hétérotrimérique composée des sous-unités α , β et γ . Les sous-unités β et γ sont inséparables et forme un dimère $G\beta\gamma$. Lorsque le récepteur est inactif, la sous-unité α est liée au GDP. Ce dernier est remplacé par le GTP lorsque le récepteur est activé. Le complexe hétérotrimérique devient instable et se sépare du récepteur. $G\alpha$ se sépare de $G\beta\gamma$ mais elles restent toutes deux attachées à la membrane plasmique. Trois produits actifs sont alors capables d'induire une signalisation : le récepteur actif, le dimère $G\beta\gamma$ et la sous-unité α -GTP. Le type de signalisation engagé dépend essentiellement de la nature de la sous-unité $G\alpha$ [67, 68]. Le cycle se termine lorsque $G\alpha$ hydrolyse le GTP en GDP, permettant la reformation de l'hétérotrimère. Les sous-unités α présentes dans les plaquettes sont : $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12}$, $G_{\alpha 13}$, $G_{\alpha i}$.

I.3.2.1. Les récepteurs à la thrombine : PAR-1 et PAR-4

A côté de ses nombreux effets pléiotropiques, la thrombine est aussi le plus puissant agoniste plaquettaire. Elle se lie à la famille des PAR (« Protease-Activated Receptors ») qui comporte quatre membres dont trois (PAR-1, PAR-3 et PAR-4) sont reconnus par la thrombine. PAR-1 et PAR-4 sont présents à la surface des plaquettes humaines. Cependant, chez la souris, on retrouve PAR-3 et PAR-4 à la surface plaquettaire. PAR-1 et PAR-3 sont des récepteurs de plus forte affinité pour la thrombine que PAR-4 (EC_{50} de 50pM et 5nM, respectivement). Ces récepteurs sont activés par un clivage protéolytique dans son domaine amino-terminal extracellulaire, démasquant ainsi un peptide qui sert de ligand au récepteur (auto-agoniste). Une fois clivés, les récepteurs sont internalisés dans des microvésicules plaquettaires durant l'agrégation, via un mécanisme moléculaire impliquant les β -arrestines, la clathrine et la protéine AP-2 (« clathrin Adaptor Protein-2 »). Comme les plaquettes n'ont pas la capacité de synthétiser de nouvelles protéines, elles sont activées de façon terminale [69].

A faible concentration, la thrombine peut aussi interagir avec GPIIb α . Bien que cette interaction n'entraîne pas l'activation d'une signalisation intracellulaire, elle a pour conséquence d'améliorer le clivage et l'activation de PAR-1 et donc de soutenir l'activation plaquettaire [58]. Une étude récente a montré que la thrombine à très haute concentration peut induire la polymérisation de l'actine indépendamment de ces trois récepteurs, via l'activation de tyrosine-kinases, ce qui suggère l'implication potentielle d'un ou plusieurs autres récepteurs encore non identifiés [70].

Les récepteurs PARs induisent une signalisation de type $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12/13}$. $G\alpha_q$ conduit à l'augmentation intracellulaire de calcium via la PLC β . $G\alpha_{12/13}$ mène à l'activation de petites GTPases de la famille Rho dont les membres RhoA, Rac et Cdc42 sont les principaux architectes qui régulent l'organisation du cytosquelette d'actine [71, 72]. La p115-RhoGEF, un facteur d'échange qui favorise la conversion de RhoA-GDP inactive en RhoA-GTP active, a été identifiée comme un effecteur direct de $G\alpha_{12/13}$ [73]. La voie RhoA/ROCK (« Rho Kinase ») contrôle des protéines du cytosquelette impliquées dans la remodelage ou la contraction des filaments d'actine par la cofiline et les MLC, respectivement. Les MLC sont également directement phosphorylées par la MLCK en réponse à une augmentation de calcium intracellulaire.

Le couplage de PAR-1 à $G_{\alpha i}$, conduisant à l'inhibition de l'adénylate cyclase et de la protéine kinase A (PKA), a été aussi suggéré mais est sujet à controverse [74-76]. Les récepteurs PARs font l'objet d'un intérêt particulier pour l'industrie pharmaceutique. Des études pré-cliniques sur un inhibiteur spécifique de PAR-1, le vorapaxar, ont montré une diminution de l'agrégation plaquettaire en réponse à la thrombine. Cependant des risques hémorragiques élevés ont été remarqués chez des patients souffrant d'un syndrome coronarien aigu non-STEMI (càd sans élévation du segment ST qui correspond à la phase de repolarisation des cellules ventriculaires). Cela suggère que le traitement devrait être envisagé en tenant compte de la pathologie du patient [77].

1.3.2.2. Les récepteurs à l'ADP: P2Y1 et P2Y12

L'activation par l'ADP passe par sa liaison à deux récepteurs purinergiques présents à la surface des plaquettes, P2Y1 couplé à une protéine $G_{\alpha q}$ et P2Y12 couplé à $G_{\alpha i}$. P2Y1 est considéré comme l'initiateur de la réponse à l'ADP tandis que P2Y12 joue un rôle d'amplificateur de l'activation induite par l'ADP ou d'autres agonistes plaquettaires [78], ce qui en a fait une cible de choix pour les traitements anti-thrombotiques [79].

P2Y1 est exprimé dans différents tissus comme le myocarde, la paroi des vaisseaux sanguins et les cellules sanguines mais aussi dans le système nerveux et les organes reproducteurs [80]. Seulement 150 copies sont exprimées par plaquette, mais des études ont montré qu'il est néanmoins requis pour une activation plaquettaire complète induite par l'ADP [81, 82]. Son couplage à $G_{\alpha q}$ entraîne, via l'activation de la $PLC\beta$, une augmentation de calcium intracellulaire qui aboutit à une agrégation réversible.

P2Y12 est moins largement distribué dans les tissus. Il est présent dans les cellules gliales et les cellules du muscle lisse où il contribue à la contraction vasculaire [80]. Dans les plaquettes (425 copies), il est responsable d'une agrégation complète induite par l'ADP et d'autres agonistes, comme le collagène, la sérotonine, le TXA2 et la thrombine. Ce récepteur est couplé à $G_{\alpha i}$ qui inhibe l'AC (« Adénylate Cyclase ») menant à une diminution de la production de cAMP (« cyclic AMP ») nécessaire à l'activation de la sérine/thréonine kinase PKA. Cette dernière inhibe l'activation des plaquettes en régulant des cibles impliquées dans la mobilisation du calcium intracellulaire (IP_3R), la réorganisation du cytosquelette d'actine

(VASP, Filamine), la sécrétion des granules et l'activation du récepteur au fibrinogène (GPIIb/IIIa). D'autres voies de régulation sont activées par la sous-unité β de $G_{\alpha i}$, comme par exemple la PI3K [72]. L'isoforme p110 β de la PI3K régule l'activation des intégrines par un mécanisme dépendant des phosphatidylinositides et impliquant la GTPase Rap1 [83]. Le récepteur P2Y₁₂ est une cible thérapeutique clé dans la prévention de maladies athérotrombotiques. Le clopidogrel, une thiéno-pyridine qui antagonise irréversiblement P2Y₁₂, est prescrit en association avec l'aspirine chez des patients souffrants de pathologies cardiovasculaires telles que le syndrome coronarien aigu [84].

1.3.2.3 Les récepteurs au thromboxane : TP

Les récepteurs TP (« Thromboxane/Prostaglandin ») au TXA₂ sont largement répandus dans le système cardiovasculaire. Ils participent à la progression de l'athérosclérose par l'activation des plaquettes, mais aussi en jouant un rôle dans la vasoconstriction et dans l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales [85].

Le TXA₂ est une molécule très instable (demi-vie de 20 à 30 secondes) produite dans les plaquettes en réponse au vWF, au collagène ou à la thrombine mais pas à l'ADP [86, 87]. Sa production résulte de l'activation de la PLA₂ (« Phospholipase A₂ ») qui produit l'AA (« Arachidonic acid ») à partir des phospholipides membranaires. L'AA est le précurseur des PG (« Prostaglandins »), converties en PGH₂ via l'action de COX-1 (« Cyclo-Oxygenase 1 »). Cette dernière est couramment ciblée dans le traitement des thromboses artérielles par le plus ancien des anti-plaquettaires, l'aspirine. Finalement, le PGH₂ est converti en TXA₂ par la thromboxane synthase [88]. Comme le TXA₂ est liposoluble, il diffuse à travers la membrane plasmique et se fixe à ses récepteurs TP afin d'amplifier la réponse plaquettaire [85]. Il existe deux isoformes pour les récepteur TP, α et β , codées par un même gène et issus d'un épissage alternatif. Bien que les ARNm des deux isoformes ont été détectés dans les plaquettes, seule l'isoforme α semble présente, à raison de 1500 copies par plaquette [89, 90]. TP α induit une signalisation cellulaire de type $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha 12/13}$ [72, 85].

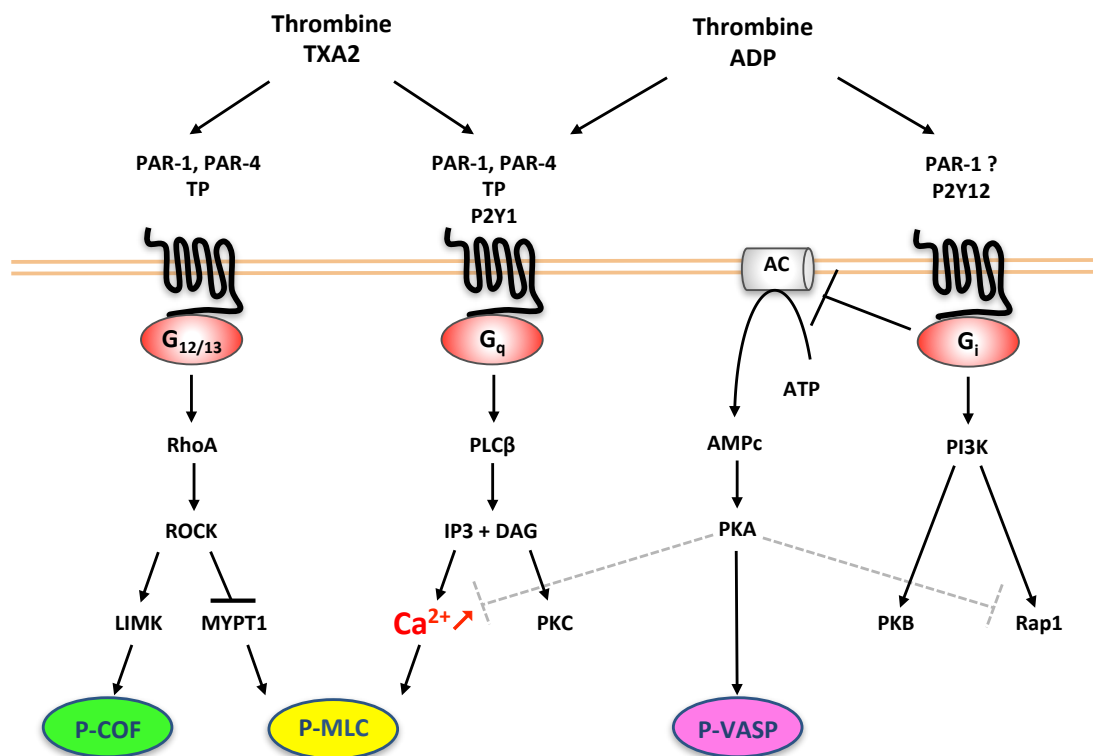


Figure 11. Les principaux récepteurs aux agonistes solubles (GPCR).

Principales voies de signalisation induite par les agonistes plaquettaires solubles : thrombine, TXA2 et ADP. Ils sont reconnus par des récepteurs couplés à des protéines G (GPCRs). Les 3 agonistes ont en commun un GPCR couplé à une Gq dont la cascade de signalisation en aval mène à l'augmentation de calcium intracellulaire suite à l'activation de la PLCβ (« phospholipase Cβ »). La thrombine et le TXA2 reconnaissent un GPCR couplé à G12/13 qui active la voie RhoA/ROCK (« Rho Kinase ») qui conduit à la phosphorylation de la cofiline, via les LIMKs (« Lin-11, Isl1, Mec-3 Kinases »), et des MLC (« Myosin Light Chain »). Le récepteur P2Y12 de l'ADP est couplé à Gi, qui inhibe l'AC (« Adenylate cyclase ») et la signalisation de la PKA (« Proteine Kinase A ») qui phosphoryle VASP (« Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein »).

I.3.3. L'augmentation de calcium plaquettaire

Les récepteurs activés par l'adhésion plaquettaire ou les agonistes solubles conduisent à l'activation des PLC qui produisent du DAG et de l'IP₃ à partir du PIP₂. L'IP₃ est responsable de la mobilisation du calcium à partir des réserves intracellulaires, tandis que le DAG est impliqué dans l'entrée de calcium extracellulaire via l'activation des PKCs conventionnelles. Dans les plaquettes, on retrouve 3 sous-familles de PLC : PLC β , PLC γ et PLC δ . Les isoformes principalement exprimées chez l'homme sont PLC β 2/ β 3 (β 1 et β 3 chez la souris) et PLC γ 2. Les isoformes β sont uniquement régulées par les agonistes qui activent G α q. PLC γ 2 se situe en aval des récepteurs au collagène (GPVI et α 2 β 1), du récepteur au vWF (GPIb-V-IX), du récepteur au fibrinogène (GPIIb/IIIa), du récepteur CLEC-2 et chez l'homme, du récepteur Fc γ IIa. PLC γ 2 peut aussi être régulée par les PI3K, en aval du récepteur couplé à G α i [91].

I.3.3.1 Le système SOCE

Dans les plaquettes, le calcium est contenu dans deux types de réservoirs : le DTS et les organelles acides. Ceux-ci diffèrent selon le type de SERCA (« Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase »), présent à leur surface membranaire. L'isoforme SERCA2b (100KDa) est présente au niveau du DTS tandis que l'isoforme SERCA3 (97KDa) est exprimée à la surface des organelles acides [92].

De nombreuses études montrent que le relargage du calcium à partir du DTS joue un rôle central dans la signalisation plaquettaire induite par les agonistes tels que la thrombine, l'ADP, le TXA₂ ou le collagène [91, 93]. Le mécanisme est initié par l'IP₃ généré par les PLCs. Il active son récepteur à la surface du DTS, IP₃-R, un canal ionique permettant la sortie du calcium. Trois isoformes (IP₃-R1/2/3) sont exprimées dans les plaquettes, mais les récepteurs IP₃-R1 et IP₃-R2 sont prédominants. Le DTS, une fois vidé de son calcium, induit à son tour l'ouverture des canaux calciques présents à la membrane plasmique, les SOCs (« Store-Operated Ca²⁺ channels »), selon un processus appelé SOCE (« Store-Operated Ca²⁺ Entry ») [93, 94].

Dans la plupart des cellules, le mécanisme implique une connection directe entre IP₃-R2 avec le canal calcique de la famille des SOCs, TRPC1 (« Transient Receptor Potential Channel 1 »). Dans les plaquettes, il fait principalement intervenir les protéines STIM1 (« Stromal

Interaction Molécules ») et Orai1 (« ORAI calcium release-activated calcium modulator 1 ») [95, 96]. STIM1 et Orai1 sont des protéines contenant respectivement 1 et 4 domaines transmembranaires. STIM1 forme un dimère à la membrane du DTS, et Orai1 se tétramérise pour former un canal ionique dans la membrane plasmique. L'association entre STIM1 et Orai1 conduit à la formation de larges agrégats appelés *puncta* où viennent s'ajouter d'autres protéines, l'ensemble permettant l'entrée du calcium extracellulaire dans la plaquette [97, 98] (figure 12).

Les plaquettes de souris déficientes pour STIM1 et Orai1 sont incapables d'induire l'entrée de calcium en réponse aux agonistes. Par contre, elles restent capables d'accomplir certaines fonctions physiologiques comme le changement de morphologie, l'activation des récepteurs aux intégrines et la sécrétion des granules. Cela suggère que le calcium séquestré dans les organelles acides, ou pénétrant de l'extérieur vers l'intérieur par un autre mécanisme que le système SOCE, permet d'assurer ces fonctions. Le contenu en calcium du DTS interviendrait alors plutôt dans la stabilisation du thrombus, la rétraction du clou plaquettaire, l'activité procoagulante ou le recrutement d'autres cellules au site de lésion vasculaire. Cette hypothèse est supportée par l'observation faite sur les plaquettes de souris *Stim1*^{-/-} et *Orai1*^{-/-} qui présentent une diminution de la stabilité du thrombus *in vivo* [99].

La mobilisation du calcium à partir des organelles acides nécessite la production de NAADP (« Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate »). Ce second messager se lie au canal ionique endolysosomal de la famille TPC (« Two-Pore Channels ») et permet la libération du contenu en calcium. Dans les plaquettes humaines, des études montrent que le NAADP participe à la réponse calcique induite par la thrombine via le récepteur PAR-4 et le complexe GPIIb-V-IX, mais aussi en réponse au collagène via le récepteur GPVI [100, 101].

I.3.3.2 Le système ROCE

A côté du système SOCE, un autre mécanisme d'entrée du calcium existe dans les plaquettes, le système ROCE (« Receptor-Operated Ca²⁺ Entry »). Il est constitué de TRPC6, un canal ionique stimulé par les PKCs, et de P2X1, un récepteur purinergique dont le ligand est l'ATP sécrété par les plaquettes activées.

S'il existe 7 sous-unités pour le récepteur P2X, seul P2X1 est présent dans les plaquettes et les mégacaryocytes. Lorsqu'il est lié à son ligand, il génère une augmentation de calcium intracellulaire transitoire mais suffisante pour induire un changement de morphologie et la centralisation des granules [102], mais pas une agrégation plaquettaire [103, 104]. Les souris déficientes pour P2X1 ne montrent pas de défauts de saignements mais présentent une diminution de la taille du thrombus [105, 106]. A l'inverse, une surexpression du récepteur P2X1 dans les plaquettes est associée à une augmentation du nombre d'évènements thrombotiques dans les artérioles intestinales suite à l'injection de collagène et d'adrénaline [107]. P2X1 apparaît dès lors comme un amplificateur de la signalisation induite par le collagène ou la thrombine [104]. Dans une étude récente, les auteurs montrent une synergie de la réponse plaquettaire entre les récepteurs P2X1 et P2Y1. Le mécanisme sous-jacent proposé implique que l'augmentation de calcium intracellulaire induite par P2X1 amplifie l'agrégation via l'activation de ERK2 (« Extracellular signal-Regulated Kinases 2 »), et la production de TXA2 [108].

Le calcium joue un rôle central dans la biologie des plaquettes car il stimule des protéines telles que les PKCs et les CaMKs (« Calcium/Calmoduline dependant Protein Kinases ») comme la MLCK. Ces protéines participent au remodelage du squelette d'actine, à la sécrétion des granules et à l'activation du récepteur au fibrinogène [109]. D'autre part, l'augmentation de calcium entraîne l'activation de la PLA2 menant à la production de TXA2.

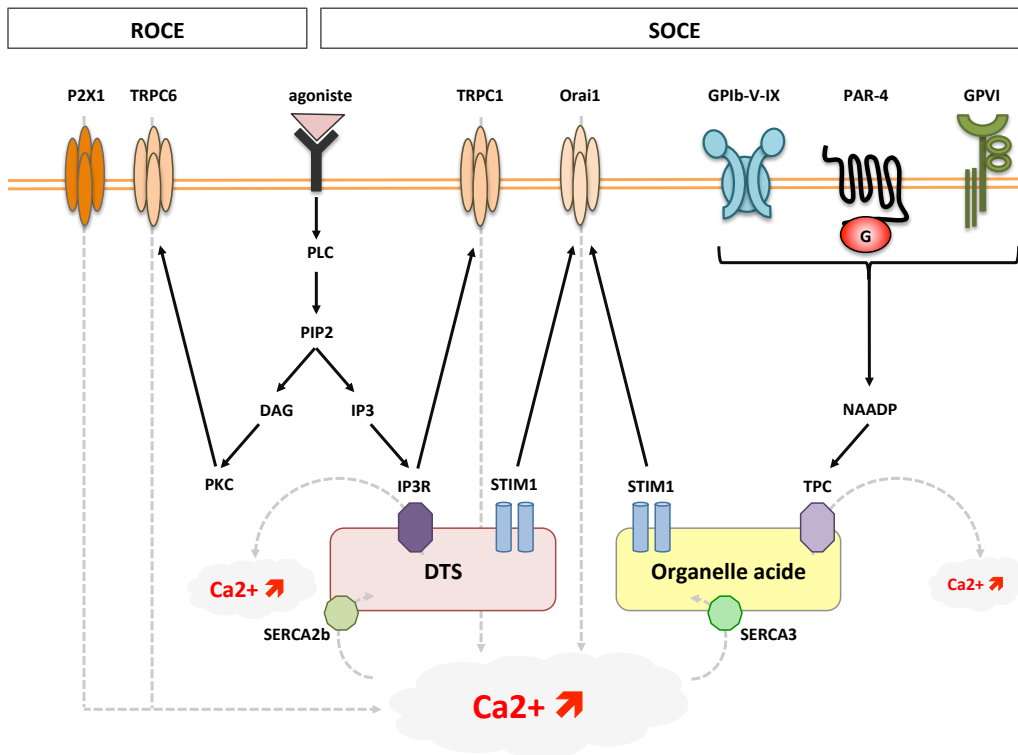


Figure 12. Les mécanismes impliqués dans l'augmentation de calcium intracellulaire.

Dans la plaquette au repos, le calcium est séquestré dans deux types de réservoirs internes : le DTS et les organelles acides. Ces deux réservoirs diffèrent par la nature de l'isoforme SERCA présente à la membrane et par le mécanisme de libération du calcium. La libération de calcium par le DTS est stimulée par l'IP3 et son récepteur IP3R. La libération de calcium à partir des organelles acides est stimulée par la production de NAADP et les récepteurs TPC. Ces réservoirs, une fois vidés, induisent l'ouverture de canaux calciques via l'interaction entre les protéine STIM1 et Orai1. C'est le système SOCE. Un autre système, indépendant de la mobilisation du calcium intracellulaire, est activé directement soit par les PKCs, pour le canal ionique TRPC6 ; soit par l'ATP sécrété pour le canal ionique P2X1. C'est le système ROCE.

I.3.4. La sécrétion du contenu des granules

La dégranulation joue un rôle critique dans l'amplification du signal, l'activation et le recrutement des plaquettes circulantes au site de lésion vasculaire. Lors de l'activation plaquettaire, les granules se centralisent avant de fusionner avec la membrane plasmique par un mécanisme de contraction de filaments d'acto-myosine, ce qui facilite la sécrétion de leur contenu par le système OCS [110, 111]. La sécrétion des granules par exocytose fait intervenir les protéines SNAREs (« Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Attachment protein Receptors ») et des protéines régulatrices.

Les protéines SNAREs présentes à la surface des vésicules plaquettaires sont les v-SNAREs, aussi appelées VAMPs (« Vesicle-Associated Membrane Protein ») : VAMP-2, -3, -7 et -8. Les SNAREs présentes au niveau de la membrane plasmique sont nommées t-SNAREs, ce sont les syntaxines 2, 4, 7, 11 et les SNAP (« Synaptosomal-Associated Protein »)-23, -25 et -29 [112]. Au cours de l'activation plaquettaire, les v-SNAREs et t-SNAREs s'assemblent pour former un complexe qui catalyse l'apposition et la fusion membranaire entre les granules et la membrane plasmique. Les protéines régulatrices contrôlent l'interaction des SNAREs entre elles. Certaines sont sensibles à la concentration intracellulaire de calcium (Munc13) [113] et du DAG, tandis que d'autres sont des régulées par des kinases (Munc18) [114].

Des études réalisées sur des plaquettes de souris transgéniques ont montré l'importance de VAMP-8 dans la sécrétion des granules plaquettaires et la formation du thrombus [115, 116]. Chez l'homme, les plaquettes de patients déficients pour la syntaxine 11 présentent un défaut sévère de la sécrétion du contenu des granules α et denses [117]. L'utilisation d'anticorps dirigés contre SNAP-23 a également permis de démontrer son rôle crucial dans la sécrétion des granules plaquettaires [118-120].

I.3.5. Le récepteur au fibrinogène : GPIIb/IIIa

I.3.5.1 L'activation du récepteur au fibrinogène : Signalisation « Inside-out »

Le récepteur au fibrinogène GPIIb/IIIa (aussi nommé $\alpha_2\beta_3$) appartient au groupe des intégrines qui sont des hétérodimères α/β . Elles sont classées en plusieurs familles suivant leur sous-unité β . Le GPIIb/IIIa fait parti des intégrines β_3 . L'expression de GPIIb/IIIa est limitée aux mégacaryocytes et aux plaquettes. C'est le récepteur le plus abondant, avec environ

80000 copies en surface et 30000 copies supplémentaires dans les granules α et l'OCS [121]. Dans la plaquette au repos, il se trouve dans un état de faible affinité pour ses ligands. La transition vers un état de forte affinité est une conséquence majeure de l'activation des plaquettes. Cette activation a lieu en réponse à de nombreux agonistes plaquettaires tels que les protéines adhésives (le vWF et le collagène) et les agonistes solubles (la thrombine, l'ADP et le TXA₂). L'ensemble des processus moléculaires impliqués dans l'activation de GPIIb/IIIa est désigné par le terme « *Inside-out* » (figure 13).

Chez l'homme, une anomalie qualitative ou quantitative de GPIIb/IIIa cause un défaut d'agrégation plaquettaire, associé à des hémorragies plus ou moins sévères. Cette maladie congénitale, appelée la Thrombasthénie de Glanzmann, est rare et touche principalement des populations à forte consanguinité.

1.3.5.1.1. *Rap1b-GTPase*

Rap1b est la plus abondante petite GTPase de la famille Ras, et elle joue un rôle clé dans l'activation du GPIIb/IIIa [122, 123]. Des plaquettes de souris déficientes pour Rap1b présentent une diminution de l'activation du GPIIb/IIIa, accompagnée d'une altération de l'agrégation plaquettaire et d'une protection contre la thrombose artérielle [124]. Dans les plaquettes sanguines, Rap1b est régulée par le facteur d'échange CalDAG-GEF1 (« Calcium and DAG-regulated Guanine nucleotide Exchange Factor 1 ») et les PKCs.

L'importance de CalDAG-GEF1 a été démontrée dans un modèle de souris déficientes qui montre une altération de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP et le TXA₂, mais pas par le collagène ou la thrombine. Cette différence de réponse suggère l'existence d'un mécanisme d'activation du GPIIb/IIIa indépendant de CalDAG-GEF1 [125]. Chez l'homme, la présence d'une mutation dans le gène CalDAG-GEF-1 a été proposée comme un des facteurs responsables du syndrome LAD-III, une pathologie autosomique récessive présentant les mêmes désordres hémorragiques que la thrombasthénie de Glanzmann [126].

Rap1b forme un complexe avec la taline au niveau de la queue cytoplasmique de la sous-unité β ₃ du récepteur au fibrinogène via RIAM1 (« Rap1-GTP-Interacting Adaptor Molecule ») qui est requis pour son recrutement [127-129].

1.3.5.1.2. La taline

La taline est une protéine cytoplasmique de 270kDa constituée d'une tête globulaire de 50KDa, appelées taline-H, suivi d'une région flexible de 220KDa, la taline-R. Elle est exprimée à partir du gène Tln qui existe sous deux isoformes partageant 74% d'homologie : Tln1 et Tln2 [130]. Il semble que seule l'isoforme Tln1 soit exprimée dans les plaquettes humaines ou murines [131, 132]. La délétion de Tln1 dans les cellules hématopoïétiques de souris montre des défauts d'adhésion, d'agrégation et de rétraction du clou plaquettaire, tandis que la sécrétion ne semble pas affectée [133, 134]. Dans des cellules au repos, la taline adopte une conformation qui l'empêche de se lier aux intégrines à cause d'une répulsion entre ses charges négatives et les phosphatidylsérines de la face interne de la membrane plasmique. L'activation de la taline se fait en présence de PIP2 par un changement de sa conformation [135]. Une régulation par phosphorylation a aussi été proposée suite à une étude de spectrométrie de masse qui a révélé environ 30 sites potentiels de phosphorylation par les PKCs entre autres [136]. Cependant, la relevance physiologique de la phosphorylation de la taline sur l'activation de l'intégrine n'est pas encore clairement élucidée [130]. La taline-R contient de multiples sites de liaison pour l'actine et la vinculine, indiquant une connexion avec le cytosquelette d'actine [137].

La calpaine, une protéase activée en réponse à une augmentation de calcium, peut cliver la taline libérant ainsi la taline-H de la taline-R. La taline-H a une plus grande affinité pour la partie C-terminale de la sous-unité $\beta 3$ de l'intégrine, ce qui mène à son activation. Depuis 2008, d'autres co-activateurs majeurs de GPIIb/IIIa ont été identifiés : les kindlines [138].

1.3.5.1.2. Les kindlines

La famille des kindlines est constituée de trois membres codés par des gènes différents (kindline-1, -2, -3). La kindline-1 est ubiquitaire [139]. La kindline-2 est présente dans tous les tissus à l'exception des lignées hématopoïétiques alors que l'expression de la kindline-3 est restreinte aux cellules hématopoïétiques et est particulièrement abondante dans les mégacaryocytes et les plaquettes [140]. Une caractéristique importante est la présence d'un domaine PH (« pleckstrin homology ») qui suggère que les kindlines sont recrutées à la membrane via la liaison aux phosphoinositides [141].

Dans des « Chinese Ovary cells » (CHO) surexprimant GPIIb/IIIa, la co-expression de la taline avec les kindlines-1 et -2 suractive l'intégrine [142]. Au contraire, les plaquettes de souris dépourvues de kindline-3 ont un défaut d'agrégation sévère *in vitro* et sont incapables de former un thrombus *in vivo* [143, 144]. En 2008, des mutations dans le gène de la kindline-3 chez l'homme, conduisant à une inhibition de son expression, ont été identifiées comme le défaut moléculaire majeur associé au syndrome LAD-III [145].

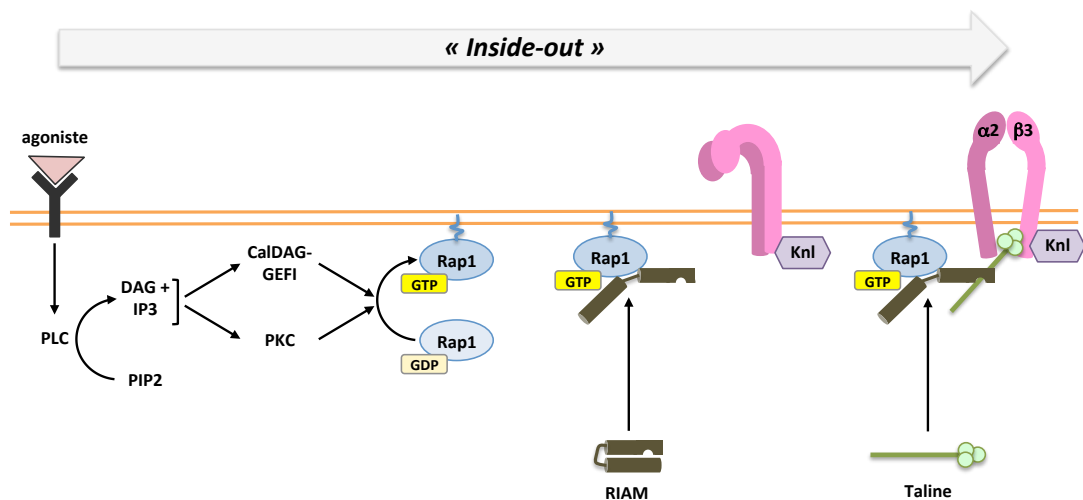


Figure 13. Le signal « Inside-out ».

Lorsqu'un agoniste se lie à son récepteur plaquettaire, il déclenche un signal qui active une PLC. Celle-ci convertit les PIP2 (« Phosphoinositides-4,5-diphosphate ») en DAG (« diacylglycerol ») et IP3 (« Inositol-1,4,5-triphosphate »). Ces deux molécules permettent la localisation et l'activation de Rap1 à la membrane via l'activation des PKC (« Protein Kinase C ») et d'un facteur d'échange, Cal-DAG-GEF1. Rap1-GTP s'associe à RIAM (« Rap1-GTP-Interacting Adaptator Molecule ») qui recrute la taline à la partie cytoplasmique de GPIIb/IIIa. La taline, avec la Knl (« Kindlin ») participe au changement de conformation de GPIIb/IIIa.

1.3.5.2. La rétraction du clou plaquettaire : Signalisation « Outside-in »

Le terme « Outside-in » désigne, quant à lui, les événements de signalisation qui sont induits par l'intégrine activée, après la fixation d'une molécule de fibrinogène. Cette signalisation fait appel à des protéines effectrices et de protéines structurales du cytosquelette d'actine qui contrôlent les réponses tardives de la plaquette comme, notamment, la rétraction du clou plaquettaire (figure 14).

Les tyrosines kinases et la GTPase Gα13, toutes deux liées à la partie cytoplasmique de la sous-unité β3 du récepteur [146], jouent un rôle central dans la signalisation « Outside-in ».

Leur action aboutit notamment à la phosphorylation des MLC via l'activation des Rho GTPases, RhoA et Rac. La position centrale de RhoA dans la signalisation « Outside-in » et la rétraction du clou plaquettaire a été démontrée récemment dans une étude utilisant des souris invalidées spécifiquement pour RhoA dans les plaquettes [147]. Rac peut également contribuer à ce phénomène, indépendamment de la voie RhoA [148]. Récemment, l'étude de Ego et al a montré que la signalisation « *Outside-in* » induit une phosphorylation biphasique des MLC, le premier pic de phosphorylation impliquant l'activation des GTPases RhoA et Rac et de la MLCK alors que le deuxième pic, plus tardif, résulte uniquement de l'action de la GTPase Rac [149].

La tyrosine kinase CSK induit également la phosphorylation des résidus Tyr747 et Tyr759 de la queue cytoplasmique de la chaîne $\beta 3$. Cela permet notamment le recrutement d'une protéine d'adhésion focale, Pyk2, qui interagit avec la PI3K à l'aide d'une protéine adaptatrice (c-Cbl) menant à son activation [150]. D'autre part, elle induit l'activation de Syk qui va contribuer à l'activation des facteurs d'échange (Vavs) impliqués dans l'activation de la petite GTPase Rac [151, 152].

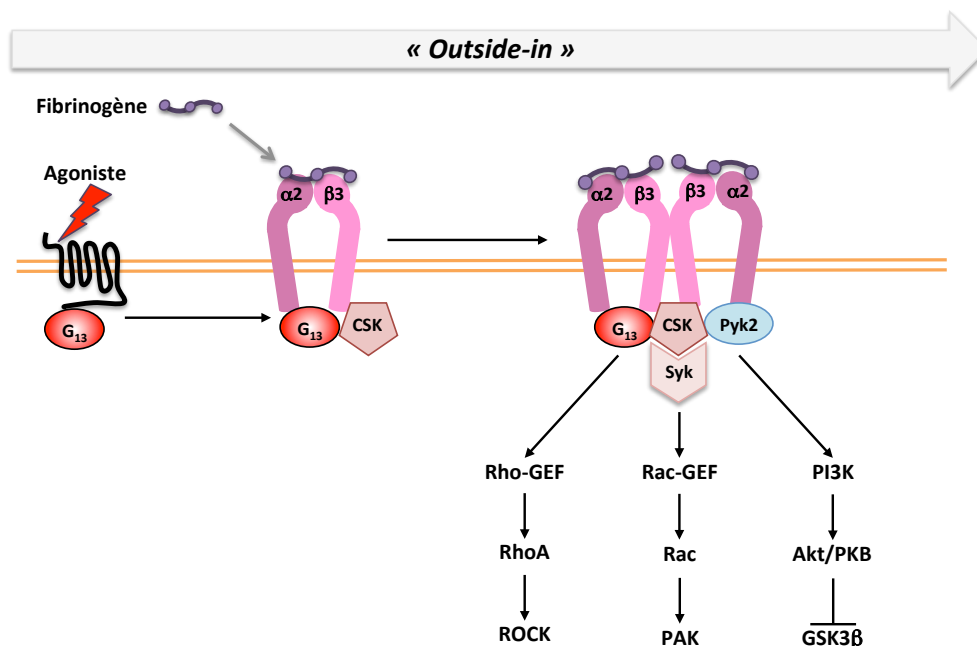


Figure 14. Le signal « *Outside-in* ».

La liaison du fibrinogène sur GPIIb/IIIa, entraîne la liaison de la protéine G_{13} à la sous-unité $\beta 3$, sur un site différent de celui sur lequel vient se fixer la tyrosine kinase CSK (« c-Src Kinase »). Ces éléments permettent le déclenchement de voie de signalisations dépendantes des petites GTPases, Rho/ROCK et Rac/PAK ainsi que celle de la PI3K.

I. 4. Le remodelage du squelette d'actine au cours de l'activation plaquettaire

Le squelette d'actine est finement régulé et réorganisé au cours de chacune des étapes du processus d'activation plaquettaire. Ce remodelage permet la formation des filopodes et lamellipodes, caractérisant la transition d'une forme discoïde à l'état basal vers une forme respectivement sphérique puis progressivement étalée. Ce processus est initié par l'activation de récepteurs membranaires spécifiques qui entraînent des signalisations moléculaires affectant directement la polymérisation ou la contraction des filaments d'actine. A son tour, le cytosquelette constitue en lui-même une structure permettant de co-localiser des molécules de signalisation dans un espace-temps spécifique et d'assurer de cette façon une réponse plaquettaire adéquate.

Ce mécanisme complexe se déroule en plusieurs étapes. Le squelette sous-membranaire doit être dissocié. Des sites de nucléation et de polymérisation apparaissent. Les filaments d'actine formés sont assemblés et organisés pour donner naissance soit aux lamellipodes, soit aux filopodes. Les plaquettes en suspension activées par les agonistes solubles (thrombine, ADP ou thromboxane) se contractent, deviennent sphéroïdes et développent des filopodes en périphérie avant de former des agrégats stables (figure 15A). Ce changement de forme s'accomplit en quelques secondes. Lorsque les plaquettes sont activées suite à leur adhésion avec des protéines de la matrice extracellulaire (fibrinogène, vWF ou collagène), elles se contractent, émettent des filopodes mais établissent aussi un feuillet circulaire à la membrane, appelé lamellipode, avant de s'étaler complètement sur la surface (figure 15B). Le processus d'activation est clôturé par la rétraction du clou plaquettaire.

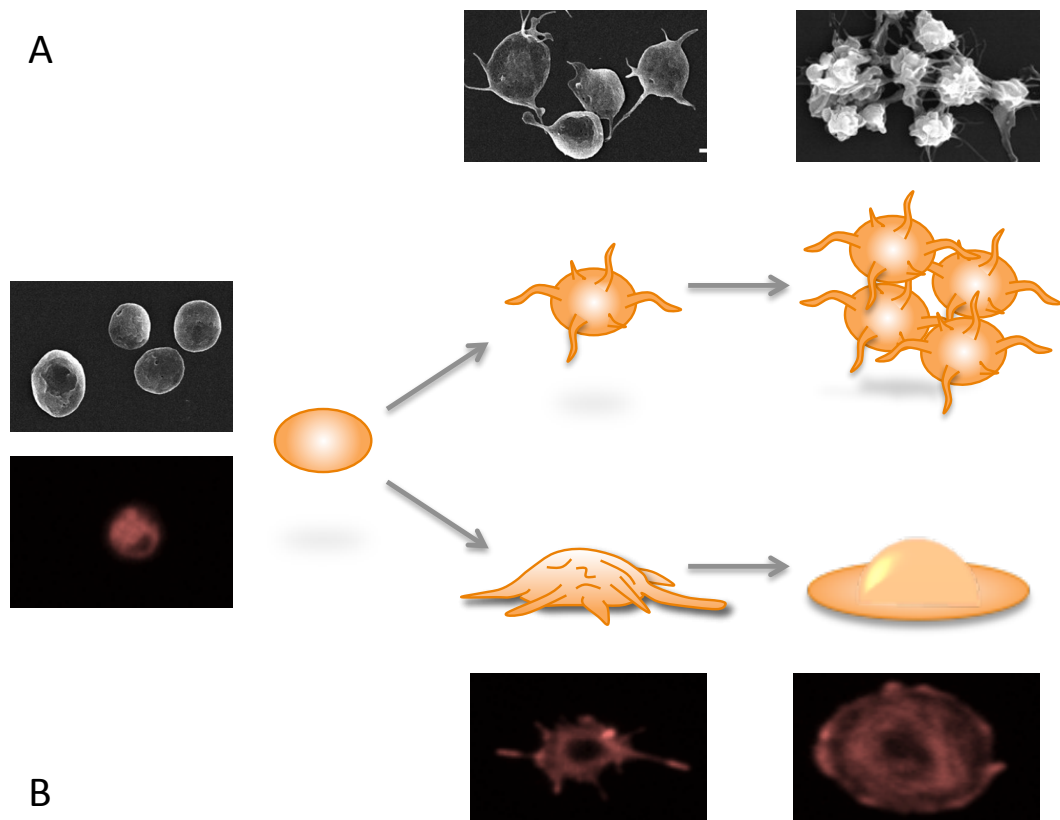


Figure 15. Le changement de morphologie et la réorganisation du cytosquelette plaquettaire.

Schéma représentant le changement de morphologie drastique que subissent les plaquettes activées en suspension (A) ou au cours de l'adhésion (B), sur base d'images prises en microscopie électronique (A, issues de Bettache N. et al., J Cell Sc 2003) ou en microscopie à fluorescence après un marquage avec la phalloïdine-TRITC (B, images prises au laboratoire de pathologie cardiovasculaire, IREC, UCL).

I.4.1. Le désassemblage du squelette membranaire de spectrine

L'adducine se dissocie des filaments d'actine et de la spectrine, ce qui entraîne la dislocation du squelette d'actine membranaire. L'augmentation immédiate de la concentration en calcium (de 0.1 jusqu'à 2 μM) est un signal majeur pour l'inactivation de l'adducine qui dépend notamment de sa phosphorylation, sur son site Ser726, par des PKC ou de sa liaison au complexe calcium-calmoduline [153]. L'activation de la voie RhoA/ROCK est aussi impliquée dans l'inactivation de l'adducine via la phosphorylation d'un autre site, la Thr445 [154].

1.4.2. La formation de nouveaux sites d'amorces et de polymérisation

1.4.2.1. La gelsoline

La gelsoline est une protéine capable de fragmenter les filaments d'actine préexistant dans la plaquette au repos afin de générer de nouvelles extrémités libres disponibles pour la polymérisation et la réorganisation de nouveaux filaments. Au cours de l'activation plaquettaire, la liaison du calcium à la gelsoline provoque un changement de conformation permettant le coiffage et le clivage des filaments d'actine [155]. La gelsoline reste associée aux fragments de F-actine générés et sera déplacée par des polyphosphoinositides produits lors de l'activation plaquettaire. Des plaquettes de souris déficientes pour le gène de la gelsoline présentent un turnover beaucoup plus lent de leurs filaments d'actine en raison d'une capacité de polymérisation diminuée de 80% en réponse à divers agonistes [36]. D'autre part, ces plaquettes ne sont pas capables de former des lamellipodes [156].

1.4.2.2. La cofiline

L'activation de la cofiline contribue également au turnover des filaments d'actine au cours de l'activation plaquettaire. Les protéines de la famille des ADF/cofiline peuvent être regroupées en 5 classes distinctes, ADF/cofiline, twinfilin, Abp1/drebrine, coactosine et « glia maturation factor », toutes caractérisées par la présence d'un domaine ADF-H homologue. L'ADF/cofiline est elle-même constituée de trois paralogues hautement similaires : la cofiline-1 (isoforme non-musculaire), la cofiline-2 (isoforme musculaire) et l'ADF (« Actin-Depolymerizing-Factor ») ou destrine [157]. La cofiline-1 et l'ADF/cofiline sont présentes dans la plaquette ainsi que dans la majorité des tissus. En plus de leur rôle de fragmentation mécanique des filaments d'actine [158], ces protéines participent au recyclage des monomères de G-actine [159]. L'ADF/cofiline se lie en effet aussi bien à la G-actine qu'à la F-actine (ratio de 1 :1) [160], avec une affinité plus importante pour les formes d'actine-ADP, ce qui favorise la dépolymérisation à l'extrémité pointue des filaments. Une fois liée à l'actine monomérique, elle inhibe l'échange du nucléotide ADP en ATP. Cet échange est accéléré grâce à la profiline qui remplace l'ADF/cofiline sur l'actine. Dès lors, le complexe actine-profiline peut être ajouté du côté barbu des filaments [159].

L'activité de l'ADF/cofiline est régulée par la phosphorylation de la Ser3 par les LIM Kinases, LIMK1 et LIMK2. Cette phosphorylation inhibitrice empêche la liaison à l'actine et inhibe dès lors sa fragmentation. Les phosphatases qui relèvent cette inhibition sont celles de la famille des Slingshot (SSH). SSH1L est la seule phosphatase connue pour non seulement activer l'ADF/cofiline mais aussi pour inactiver les LIMKs [161]. L'activité de l'ADF/cofiline peut également être inhibée par sa liaison aux phospholipides membranaires PIP2 ou lorsque le pH devient trop acide [162].

De façon surprenante, des travaux ont mis en évidence que la cofiline non phosphorylée et donc active pouvait également favoriser la génération de nouveaux filaments d'actine [160]. Cette dualité dans la fonction de la protéine s'expliquerait par l'existence dans la plaquette d'un équilibre entre oligomères et monomères de cofiline. Les auteurs de l'étude proposent un modèle selon lequel des oligomères se formeraient lorsque la concentration locale en cofiline non phosphorylée est élevée. Dès lors ils ne s'associeraient pas aux filaments d'actine pour la fragmenter mais serviraient au contraire de site de nucléation pour amorcer la polymérisation de nouveaux filaments [163].

Dans les plaquettes au repos, 90% de la cofiline est phosphorylée, indiquant un faible turnover de l'actine. La stimulation par la thrombine induit une déphosphorylation quasi maximale en moins d'une minute, via un mécanisme impliquant l'activation de SSH1L en aval de la GTPase Rac1 (Pandey et al, 2009). Cette première phase de déphosphorylation est suivie par une phase de rephosphorylation de la protéine par la LIMK, elle-même activée suite à sa phosphorylation par la ROCK (Pandey et al, 2006). Cette inactivation plus tardive de la cofiline restabilise le cytosquelette d'actine.

Chez les souris déficientes en ADF/cofiline, le nombre de plaquettes est dramatiquement réduit, à moins de 5% de celui des souris contrôles, indiquant un rôle important de cette protéine dans la production plaquettaire [164]. Malgré cette diminution drastique, les souris sont viables et ne souffrent pas d'hémorragies sévères. Les plaquettes sont cependant anormales : elles contiennent des agrégats d'actine, présentent des défauts de sécrétion [165, 166], d'agrégation et sont incapables de s'étaler sur une surface recouverte de fibrinogène [167].

1.4.3. La génération de lamellipodes et/ou de filopodes

Les extrémités libres générées par la gelsoline et la cofiline vont servir d'amorce pour l'assemblage de nouveaux réseaux d'actine organisés en lamellipodes et/ou en filopodes (figure 16 et 17).

1.4.3.1. Les lamellipodes : Arp2/3 – WASP (figure 16)

Le lamellipode est une fine protrusion membranaire en deux dimensions (200 nm d'épaisseur et plusieurs microns de large) [168]. Il est constitué d'un réseau dendritique dense et polarisé d'actine [169, 170].

Le complexe Arp2/3 est depuis une quinzaine d'années le nucléateur de l'actine le plus étudié *in vitro* et *in vivo*. Des études récentes menées à l'aide de fibroblastes n'exprimant pas le complexe Arp2/3 démontrent que ce dernier est essentiel à la formation des lamellipodes [171, 172]. Son activité est finement régulée par des protéines comme la cortactine ou les membres de la famille WASP (« Wiskott Aldrich Syndrome Protein »). WASP se fixe au complexe Arp2/3 et modifie sa conformation de sorte à ce qu'il ressemble à une surface libre de l'extrémité barbue d'un filament d'actine. Les monomères d'actine-ATP s'unissent au complexe Arp2/3, conduisant à la nucléation des filaments d'actine. Ils sont ainsi à l'origine de rameaux latéraux qui s'allongent en formant un angle d'environ 70° par rapport aux filaments préexistants auxquels ils sont fixés [169]. L'extrémité barbue des filaments plus anciens fixe une protéine de coiffe (CapZ) qui arrête leur croissance. Cet arrêt est nécessaire pour la régulation de la polymérisation de l'actine dans l'espace et le temps. L'extrémité pointue des filaments préexistants plus anciens se dépolymérise à l'aide de la cofiline qui s'associe à l'actine-ADP favorisant sa dissociation (figure 16).

Ces activateurs de la nucléation sont activés par les GTPase Rac et CDC42. Les plaquettes de souris déficientes pour Rac sont incapables de former des lamellipodes sur diverses matrices [173]. Par contre l'importance de la contribution de WASP n'a pas été clairement établie. En effet, les plaquettes de patients porteurs du syndrome de Wiskott-Aldrich ou de souris invalidées pour la protéine WASP restent capables de produire des lamellipodes [174-176]. Il est cependant probable que la fonction de WASP soit, dans ce cas, compensée par les autres membres de cette famille protéique (n-WASP et Wave 1-3).

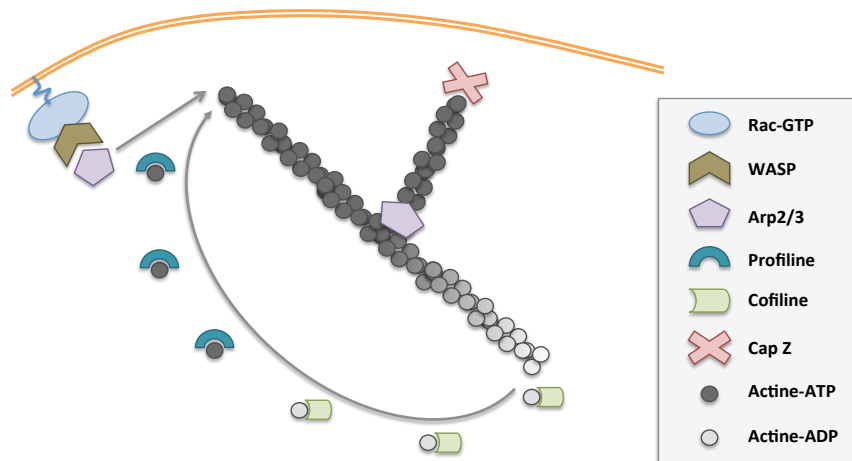


Figure 16. La formation des lamellipodes.

L'assemblage d'un réseau dendritique de filaments d'actine réticulés se produit à l'extrémité barbue de filaments déjà existants. L'activation de la petite GTPase Rac recrute à la membrane la protéine WASP (« Wiskott Aldrich Syndrome protein ») associée au complexe Arp2/3 qui, une fois actif, est dirigé sur le filament d'actine. La cofiline, en désassemblant les filaments d'actine à l'extrémité pointue, augmente la disponibilité d'actine-ADP monomérique. Celle-ci est prise en charge par la profiline qui favorise l'échange de l'ADP en ATP et permet son intégration au polymère. La protéine de coiffe, CapZ, se fixe à l'extrémité barbue pour stopper leur croissance en longueur.

1.4.3.2. Les filopodes : ENA/VASP (figure 17)

Les filopodes sont de fines projections cytoplasmiques qui renferment des filaments d'actine longs, parallèles et non branchés formant un faisceau serré avec leur bout barbu dirigé vers la membrane [169]. Plusieurs études montrent que le complexe Arp2/3 n'est pas nécessaire à la formation des filopodes [171, 172]. Il est possible que d'autres effecteurs des GTPases interviennent dans ce processus. Par exemple, la capacité des formines à nucléer, allonger et protéger les filaments d'actine des protéines de coiffe (CapZ), en association avec la protéine VASP (« Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein »), en font un candidat idéal impliqué dans l'initiation et la maintenance des filopodes [177, 178].

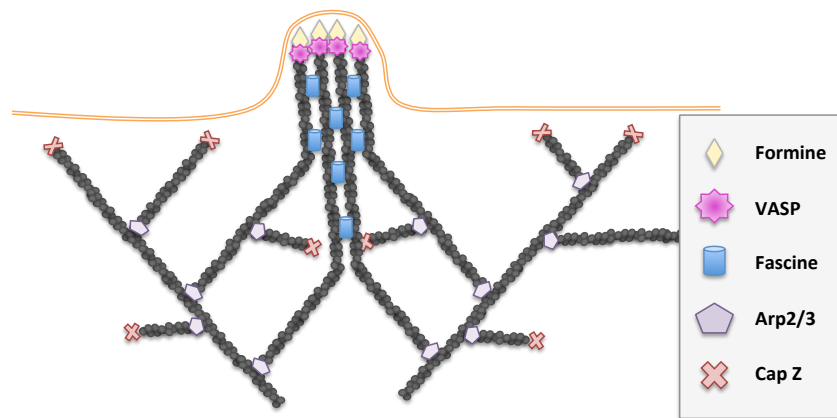


Figure 17. La formation des filopodes.

Ce modèle de formation des filopodes débute par l'association de la protéine anti-coiffe VASP avec la formine qui assure l'élongation des filaments d'actine. Ces filaments parallèles sont interconnectés par des molécules de fascine.

La protéine VASP fait partie de la famille ENA/VASP qui comprend Mena, VASP et EVL. Elles partagent plusieurs domaines spécifiques qui incluent le domaine d'homologie EVH1 (« Ena/VAP Homology 1 ») dans la partie N-terminale, un domaine central riche en proline (PPR) et un autre domaine d'homologie EVH2 dans la partie C-terminale (figure 18). Le domaine EVH1 permet la liaison avec des protéines contenant un motif spécifique riche en proline comme la zyxine et la vinculine, toutes deux impliquées dans la formation des adhésions focales. La région centrale riche en proline interagit avec la profiline et les domaines SH3 (« Src Homology 3 »). Enfin, le domaine EVH2 permet la tétramérisation de la protéine Ena/VASP et la liaison à l'actine monomérique et filamenteuse [179].

Ena/VASP a été étudié dans une variété de modèles cellulaires dans lesquelles elle joue un rôle clé dans les mouvements cellulaires et le changement de morphologie [180, 181]. Dans les fibroblastes et les plaquettes, elle se localise aux points d'adhésion focal, au bord distal des lamellipodes et à l'extrémité des filopodes. On lui attribue différents rôles : elle peut empêcher le coiffage et les branchements des filaments d'actine, ou elle peut favoriser le recrutement du complexe profiline-G-actine nécessaire à l'élongation des filaments [178, 180, 182].

De façon surprenant, les plaquettes de souris déficientes pour la protéine VASP ont une capacité d'adhésion à la matrice extracellulaire augmentée en condition basale [183]. Elles ont également un taux d'agrégation plus élevé en réponse au collagène, par rapport à des plaquettes contrôles [184]. Ces résultats ont été controversés en 2009 par une étude sur la formation des filopodes de plaquettes exposées à des protéines adhésives (le vWF et le fibrinogène), ou à des agonistes solubles (l'ADP, un agoniste de PAR-4 et un analogue stable du TXA2) [185]. Les auteurs n'ont pas montré de différences entre des plaquettes de souris déficientes pour VASP par rapport à leurs contrôles wild type. Ils concluent que, dans ces conditions, VASP n'est pas essentielle dans les processus précoces de formation des filopodes dans les plaquettes. Par contre, comme VASP est une cible bien établie de PKA et de PKG, deux enzymes impliquées dans l'inhibition plaquettaire induite par les prostacyclines (PGE1) et le NO. Ils suggèrent que son rôle serait plus relevant dans des conditions où les nucléotides cycliques sont augmentés [185].

Les protéines Ena/VASP peuvent être régulées par phosphorylation. Cette régulation peut diminuer l'association de VASP avec l'actine et d'autres partenaires, ou réguler négativement la polymérisation de l'actine. Cinq résidus ont été identifiés par spectrométrie de masse : les Tyr39, Ser157, Ser239, Thr278 et Ser322 [186].

La phosphorylation sur la Tyr39 est induite par la tyrosine kinase Abl et participe à la migration cellulaire dans les fibroblastes [186]. Les Ser157, Ser239 et Thr278 sont les cibles de la PKA ou de la PKG [187, 188]. La phosphorylation du résidu 157 est impliquée dans la localisation de la protéine à la membrane, mais n'a pas d'effet sur la polymérisation de l'actine (Benz et al, 2009). La Ser239 et la Thr278 empêchent l'accumulation de filaments d'actine et diminue le nombre et la longueur des filopodes [189]. Etant donné que PKA et PKG sont activées en réponse à des stimuli qui induisent l'inhibition des plaquettes, il est tentant de d'associer la phosphorylation de VASP à un mécanisme de régulation négative de la fonction plaquettaire. L'état de phosphorylation de la Ser157 est couramment utilisé pour évaluer la résistance des patients traités avec le clopidogrel, un antagoniste du récepteur P2Y12 qui conduit à l'inhibition de la PKA.

Néanmoins, en réponse à des stimuli favorisant l'élongation des filaments d'actine, la phosphorylation de VASP a aussi été observée. Dans ce contexte, la phosphorylation de la Ser157 est indépendante de PKA et PKG, mais fait intervenir les PKCs. Récemment, PDK1 a

également été identifiée comme une sérine/thréonine kinase menant à la phosphorylation de la Ser157 et la Ser322 [190, 191]. Dans cette étude sur des lignées cellulaires (HeLa et Hek293T), les auteurs montrent que ces phosphorylations, par PDK1, dépendent d'une activation de la voie RhoA/ROCK. Des souris présentant une délétion spécifique de PDK1 dans les plaquettes, montrent une légère thrombocytopénie, une diminution de l'agrégation en réponse à de faibles concentrations en agonistes solubles (thrombine, ADP et TXA2), une altération de la rétraction du clou plaquettaire, un retard dans la formation d'un thrombus artériel et une diminution de la surface des plaquettes étalées sur des lames recouvertes de fibrinogène [192].

De façon intéressante, une autre enzymes peut aussi phosphoryler les résidus Thr278 et Ser322, il s'agit de l'AMPK (« l'AMP-activated protein Kinase ») [193, 194]. L'AMPK a été identifié comme une sérine/thréonine kinase responsable de la phosphorylation de la Thr278 *in vitro*. La co-transfection dans une lignée cellulaire des formes mutantes de l'AMPK et de VASP montre que cette phosphorylation s'accompagne d'un défaut d'organisation du cytosquelette d'actine [193]. Dans une étude plus récente qui a permis d'identifier un nouveau site de phosphorylation direct pour l'AMPK, la Ser322, les auteurs ont observé que la phosphorylation affecte également l'interaction de VASP avec l'actine [194].

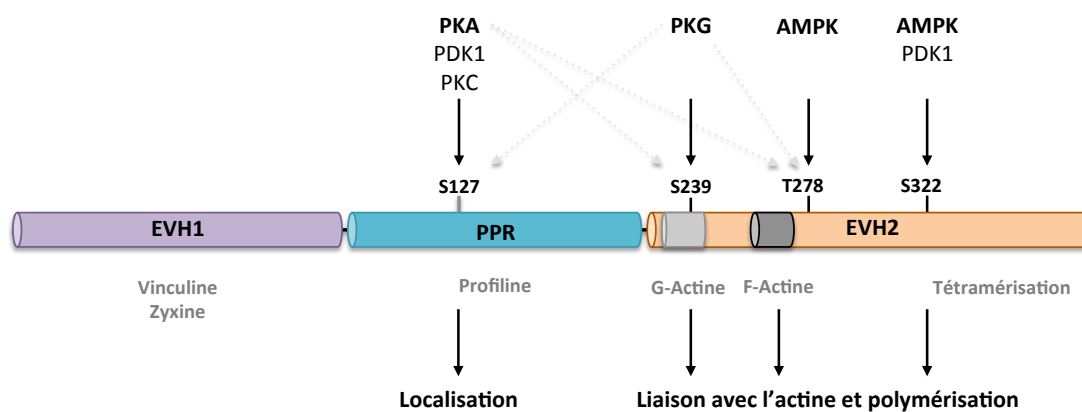


Figure 18. La structure de la protéine VASP

VASP comprend 3 grands domaines : EVH1, PPR et EVH2. Le domaine EVH1 permet la liaison de protéines contenant un motif riche en proline comme la Vinculine et la Zyxine. PPR est une région riche en proline qui permet l'interaction avec la profiline. Le domaine EVH2 est le site de liaison avec l'actine monomérique ou filamenteuse et permet la tétramérisation de la protéine. On retrouve plusieurs sites de phosphorylation par PKA, PKG, PKC, PDK1 et l'AMPK.

I.4.4. La contraction du squelette cytoplasmique

Parallèlement à la réorganisation du squelette d'actine, la contraction du cytosquelette est un processus clé du processus d'activation plaquettaire. Au cours de l'hémostase, la contraction des filaments d'actine associés à la myosine (1) permet à la plaquette de passer d'un état discoïde à sphéroïde ; (2) centralise les granules dispersées dans le cytoplasme ce qui favorise leur sécrétion ; (3) participe à l'organisation des récepteurs membranaires ; (4) contribue à l'étalement des plaquettes via la formation de fibres de stress ; et (5) est essentielle à la rétraction du clou plaquettaire stabilisant le thrombus.

L'augmentation rapide de la concentration en calcium entraîne la phosphorylation de la myosine attachée aux filaments d'actine, ce qui induit leur contraction. Les myosines constituent une grande famille de 17 membres. Plusieurs sont présents dans les plaquettes : les myosines Ic, If et Ig, la myosine IIa, la myosine Va et la myosine IXb. Une étude récente démontre que l'isoforme Va n'est pas impliqué dans la régulation des fonctions plaquettaires [195]. Par contre, la myosine IIa (codée par le gène MYH9) joue un rôle crucial dans les mégacaryocytes et les plaquettes [196]. Des mutations ponctuelles du gène *MYH9* sont responsables du syndrome de May-Hegglin, un maladie autosomique dominante qui regroupe trois autres variants alléliques: les syndromes de Sebastian, de Fechtner et d'Epstein [197, 198]. Cette anomalie est caractérisée par la présence de plaquettes géantes définies par un diamètre supérieur à celui d'un globule rouge.

La myosine IIa est une myosine non-musculaire impliquée dans de multiples réponses cellulaires comme la migration cellulaire, l'adhésion, la cytokinèse ou la phagocytose [199, 200]. Elle se compose de 2 chaînes lourdes, de 2 chaînes légères essentielles (ELC) et 2 chaînes légères régulatrices (MLC, parfois nommées RLC ou MRLC) (figure 19). La phosphorylation des MLC entraîne un changement de conformation qui augmente l'activité ATPase de la myosine, et favorise la contraction des filaments d'actine. Deux voies de signalisation conduisent à la phosphorylation des MLC : la stimulation de la MLCK par le complexe calcium/calmoduline et l'activation de ROCK en aval de la GTPase RhoA. Ces kinases phosphorylent deux résidus contigus, la Thr18 et la Ser19. Dans les plaquettes, il a été montré que la phosphorylation de la Thr18 ne dépend pas de l'augmentation du calcium mais de l'activation de la voie RhoA/ROCK. La Ser19 est rapidement phosphorylée par la MLCK, puis plus tardivement par la ROCK. Elle est d'ailleurs suffisante pour induire un

changement de forme, par contre la phosphorylation des deux sites (Ser19 et Thr18) est requise pour assurer la sécrétion complète des granules denses [201].

La déphosphorylation de ces résidus résulte de l'action de la MLCP (« Myosine Light Chain Phosphatase »), composée d'une sous-unité catalytique sérine/thréonine phosphatase (PP1c δ), d'une sous-unité régulatrice MYPT1 (« Myosine Phosphatase Target subunit 1 » ou PPP1R12A) et d'une petite sous-unité de 20 kDa (M20). La ROCK peut aussi phosphoryler directement les résidus Thr696 et Thr853 de MYPT1, ce qui inhibe l'activité phosphatase et contribue à la phosphorylation des MLC. L'ensemble de ces processus est sévèrement altéré dans des plaquettes issues de souris invalidées pour RhoA [147].

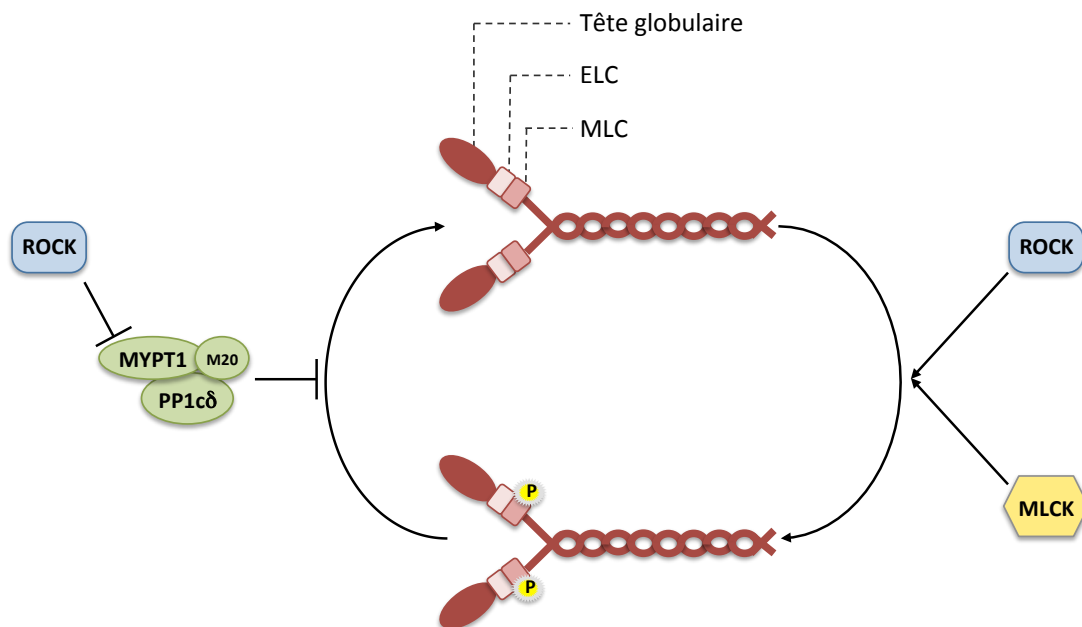


Figure 19. La régulation des chaînes légères de la myosine IIa.

La myosine non-musculaire IIa se compose de deux chaînes lourdes avec un domaine hélicoïdal et une tête globulaire à l'extrémité N-terminale, et de 2 paires de chaînes légères : ELC (« Essential Light Chain ») et MLC (« Myosin Light Chain »). C'est sur les MLC que se situent les sites de phosphorylation nécessaires à son activation, la Thr18 et la Ser19, par les enzymes ROCK et MLCK. La déphosphorylation se fait par le complexe phosphatase MLCP (« Myosin Light Chain Phosphatase ») constitué de 3 sous-unités : PP1c δ (catalytique), MYPT1 (régulatrice) et M20.

I.5 L'AMP-activated protein Kinase : un nouveau régulateur du cytosquelette plaquettaire ?

L'AMPK (« AMP-activated protein Kinase ») est un senseur énergétique qui joue un rôle clé dans la régulation des voies métaboliques cellulaires mais aussi dans le contrôle de l'homéostasie énergétique à l'échelle de l'organisme. Au-delà de son rôle dans le contrôle du métabolisme, l'AMPK exerce d'autres fonctions non métaboliques, comme une régulation de la prolifération, de la polarité, de la migration et de l'architecture cellulaires [202-204].

I.5.1 La structure de l'AMPK

Chez les mammifères, l'AMPK existe sous la forme d'un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ . Ces trois sous-unités possèdent plusieurs isoformes codées par des gènes distincts et qui sont exprimés dans des tissus spécifiques (figure 20).

I.5.1.1. La sous-unité α

Les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ partagent 90% d'homologie au niveau de leur partie catalytique N-terminale, et 60% du côté C-terminal [205]. La sous-unité α est constituée d'un domaine catalytique de type Ser/Thr kinase (Domaine kinase), située du côté N-terminal. Ce domaine comporte un acide aminé conservé qui correspond à la thréonine 172 (Thr172) de l'isoforme $\alpha 2$ isolée à partir de foie de rat (Thr174 pour $\alpha 1$). Il est situé entre deux motifs Asp-Phe-Gly et Ala-Pro-Gly caractéristiques de nombreuses kinases activées par phosphorylation. La phosphorylation *in vitro* du résidu Thr172 augmente de 1000 fois l'activité de l'AMPK et demeure le principal site de régulation de l'enzyme [206]. Un autre site de phosphorylation, la Thr258, a été identifié sur la sous-unité α . Cette phosphorylation semble jouer un rôle inhibiteur mineur [207]. A côté du domaine catalytique se trouve une petite région d'autoinhibition (DAI) qui a pu être identifiée à l'aide de protéines tronquées ou partiellement délétées par mutagenèse [208]. Un domaine de liaison pour les sous-unités β et γ se trouve du côté C-terminal et participe donc à la formation du complexe $\alpha\beta\gamma$ (figure 20). On y retrouve un site de phosphorylation inhibiteur, la sérine 491 pour $\alpha 2$ (485 pour $\alpha 1$), qui est une cible de la PKB [209] et de la PKA [210]. Plusieurs autres résidus tels que les

Thr 373, 379, 481 et 517 et les Ser 499, 514 et 515 ont été décrits comme étant des sites de phosphorylation potentiels. Le rôle physiologique de ces phosphorylations doit encore être défini mais le degré de conservation de leurs séquences laisse supposer qu'elles pourraient jouer un rôle au niveau de l'assemblage du complexe $\alpha\beta\gamma$ [211].

1.5.1.2 La sous-unité β

La sous-unité β est l'une des deux sous-unités régulatrices de l'AMPK. Elle existe aussi sous deux isoformes de 270 acides aminés pour β_1 (34KDa) et 272 pour β_2 (38KDa), qui ne partagent que 71% d'homologie [212]. Dans la partie N-terminale, les deux sous-unités possèdent un motif consensus pour la myristoylation : **MGNTSS** (AMPK β_1) et **MGNTTS** (AMPK β_2). Ce groupement myristoyl permet un ancrage lipidique de la protéine, et donc joue un rôle dans la localisation du complexe $\alpha\beta\gamma$ [44]. Dans la partie intermédiaire la mieux conservée, la sous-unité β possède un domaine de liaison au glycogène (GBD, ou actuellement plutôt appelé CBM pour « Carbohydrate-Binding Domain »). A l'extrémité C-terminale se trouve un domaine de liaison avec les autres sous-unités (« $\alpha\gamma$ -subunit-binding sequence » ou $\alpha\gamma$ -SBS), essentiel à la formation stable du complexe $\alpha\beta\gamma$. Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés sur les sous-unité β . Si la plupart n'ont pas encore de rôle physiologique clairement identifié, il semble que les Ser24/25 et Ser182 soient nécessaires à la localisation de l'AMPK au niveau du noyau [213].

1.5.1.3 La sous-unité γ

La deuxième sous-unité régulatrice est la sous-unité γ qui existe sous 3 isoformes : γ_1 , γ_2 et γ_3 . Elles diffèrent entre elles par leur partie N-terminale : γ_2 et γ_3 possèdent une extension par rapport à γ_1 . Ces extensions peuvent se présenter sous une forme dite « longue » (569aa pour γ_2 , 489aa pour γ_3) ou « courte » (328aa pour γ_2 , 444aa pour γ_3), et sont le résultats de la présence de deux sites d'initiation de la transcription différents [211]. Récemment, un troisième variant pour γ_2 a été découvert dans le cœur de souris : γ_2 -3B. Il ressemble à la forme « longue » mais il a perdu la séquence codée par l'exon 1-3, qui est remplacée par une suite de 32 acides aminés issus d'un exon alternatif, 3B [214]. Chaque sous-unités γ comporte en C-terminal, 4 répétitions en tandem d'une structure cystathionine- β -

synthase (CBS). Ces structures s'associent en paires (CBS1+2 et CBS3+4) pour former deux modules nommés domaines Bateman [215, 216]. Les tandems CBS sont les sites de fixations des nucléotides qui interagissent avec un résidu aspartate. Tandis que CBS2 reste inoccupé car il ne contient pas cet acide aminé, les sites CBS1 et CBS3 peuvent fixer réversiblement l'AMP, l'ADP ou l'ATP de manière compétitive. Le CBS4, quant à lui, se lie à l'AMP irréversiblement, à cause de sa haute affinité pour ce dernier, ce qui modifie la structure de l'AMPK [216, 217]. Chez les trois isoformes γ , une région de 25 acides aminés placés immédiatement en position N-terminale de la structure CBS1 a été caractérisée comme étant responsable de la liaison avec la sous-unité β [218].

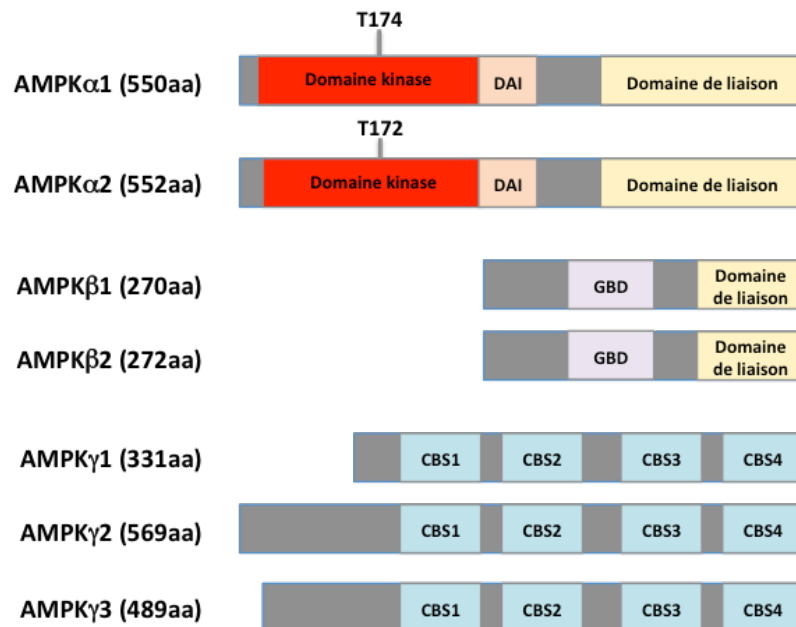


Figure 20. La structure des différentes sous-unités de l'AMPK.

L'AMPK comprend plusieurs sous-unités. Les sous-unités α comporte le domaine catalytique en partie C-terminale, un domaine central d'auto-inhibition (DAI), et, en partie N-terminale, un domaine de liaison pour la sous-unité β . Les sous-unités régulatrice β comportent un domaine central de liaison avec le glycogène (GBD), et un domaine N-terminal de liaison avec les autres sous-unités. Les sous-unités γ comportent quatre motifs répétés (CBS) où se lient l'AMP, l'ADP ou l'ATP.

I.5.2 La stimulation allostérique par l'AMP

En condition physiologique, la concentration en AMP est très basse et résulte d'un rapport ATP:ADP élevé (de l'ordre de 10:1) qui dirige la réaction de l'adénylate kinase vers la synthèse d'ADP ($ATP + AMP \leftrightarrow 2ADP$). L'ATP se fixe aux domaines CBS et inhibe l'AMPK en permettant l'interaction entre le groupement myristoyl de la sous-unité β et un site présent sur la sous-unité α , ce qui rend le résidu Thr172 non disponible pour une phosphorylation. Lorsqu'un stress métabolique survient, la production d'ATP chute, ce qui déplace la réaction vers une augmentation de la concentration en AMP. L'AMP peut remplacer l'ATP sur les sites CBS situés dans la sous-unité γ , ce qui entraîne un changement de conformation de l'AMPK [219] laissant les AMPK kinases accéder à la Thr172 et protégeant le site phosphorylé, de sa déphosphorylation par les protéines phosphatases (PP2A et PP2C) [206, 220]. Récemment, l'ADP s'est révélé avoir aussi un rôle important dans le maintien de l'activation de l'AMPK en la préservant aussi de la déphosphorylation par les phosphatases. L'ADP étant jusqu'à 400 fois plus concentré que l'AMP, il est un meilleur compétiteur pour le plus faible des sites de fixation des nucléotides, le CBS3. Les auteurs proposent donc que comme pour l'AMP, la liaison de l'ADP sur la sous-unité γ induit une modification de conformation de l'AMPK qui la protège de l'inhibition par les phosphatases [217]. Cette vision a été très récemment contredite. Dans cette étude, les auteurs ont ré-évalué l'importance de l'ADP dans la stimulation allostérique de l'AMPK et montré que l'ADP est seulement capable de protéger l'AMPK de la déphosphorylation par les phosphatases. Ils confirment que l'AMP reste le signal principal impliqué dans l'activation de l'AMPK, mais aussi que l'AMP peut induire une stimulation allostérique significative dans des cellules intactes, même si elle reste relativement faible (10x) comparée à une activation par phosphorylation (>100x) induite par les AMPK kinases [221].

I.5.3 L'activation par phosphorylation : les AMPK kinases

Les principales AMPK kinases qui phosphorylent la T172 sont LKB1 (« Liver Kinase B1 ») et la CaMKK β (« Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase Kinase beta »). La TAK1 (« Transforming growth factor- β (TGF- β)-Activated Kinase ») active également l'AMPK *in vitro* [222].

I.5.3.1 LKB1

LKB1 a été identifiée comme un suppresseur de tumeurs qui est muté dans le syndrome de Peutz-Jeghers. Dans cette pathologie, les patients développent des polypes intestinaux bénins (Hamartomas) avec une prédisposition pour le cancer du sein, de l'ovaire et du cancer gastro-intestinal [223, 224]. Cette Ser/Thr kinase phosphoryle et active au moins 13 enzymes, dont l'AMPK, qui sont impliquées dans différents processus cellulaires comme le cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose et le métabolisme énergétique [225]. Le gène codant pour LKB1 génère deux protéines issues d'un épissage alternatif, se différenciant par leur partie C-terminale : une forme longue de 50kDa, LKB1L, et une forme courte de 48 kDa, LKB1S. LKB1L est largement exprimée dans les tissus de mammifères, tandis que LKB1S est principalement exprimée dans les testicules [226, 227].

LKB1 contient un peptide signal qui le maintient au niveau du noyau. Parce qu'il ne comporte pas de séquences lui permettant de s'exporter vers le cytoplasme, il a besoin d'interagir avec d'autres protéines qui permettront cette translocation nucléocytoplasmique. La formation d'un complexe avec deux sous-unités régulatrices, appelées STRAD α (« STE20-Related Adaptor protein α ») et MO25 (« Mouse protein 25 ») permet sa complète activation. En facilitant la liaison avec l'exportine et en empêchant celle de l'importine- α/β , STRAD α empêche la re-localisation nucléaire de LKB1 [228]. MO25 agit comme un stabilisateur de l'interaction entre LKB1 et STRAD α [224]. Parallèlement, LKB1 présente plusieurs sites de phosphorylation et d'auto-phosphorylation [229-231]. Leur rôle dans l'activation et la localisation de LKB1 reste à définir.

1.5.3.2 La CaMKK β

Les CaMKKs sont des protéines kinases multifonctionnelles codées par deux gènes (CAMKK1 et CAMKK2) qui produisent la CaMKK α et CaMKK β , respectivement. Elles partagent environ 65% d'homologie au niveau du domaine catalytique. Comme les autres CaMKs, elles possèdent un domaine d'autoinhibition ainsi qu'un domaine de liaison pour le complexe calcium/calmoduline. De plus, elles comprennent plusieurs sites de phosphorylation qui régulent leur activité. Par exemple, la CaMKK α peut être phosphorylée par la PKA, ce qui induit le recrutement de la protéine adaptatrice 14-3-3 et mène à son inactivation [232]. Cette régulation n'a pas été démontrée pour la CaMKK β . D'ailleurs, cette dernière présente une activité autonome importante en l'absence d'une liaison avec le complexe calcium/calmoduline. Cela suggère une implication, uniquement pour l'isoforme β des CaMKKs, dans des mécanismes indépendants du calcium. Une étude *in vitro* récente montre que la CaMKK β peut être phosphorylée sur les Ser129, Ser133 et Ser137 par les enzymes CDK5 et GSK3, ce qui mène à une diminution de son activité autonome basale [233]. De façon intéressante, la protéine GSK3 β exerce un rôle de régulateur négatif sur la fonction plaquettaire [234].

Les CaMKKs possèdent divers substrats : la CaMKI, la CaMKIV et l'AMPK. Les deux premières sont eux mêmes régulés par le calcium, alors que l'AMPK ne l'est pas [235, 236]. Dans des neurones qui expriment de façon importante les deux isoformes de CaMKKs (α et β), seule la CaMKK β entraîne la phosphorylation de l'AMPK [237].

1.5.4 Les fonctions de l'AMPK : le métabolisme et au delà...

Les substrats de l'AMPK contiennent en général un motif de reconnaissance bien défini. Cette séquence consensus est la suivante ($\Phi(X,\beta)XXS/T^*XXX\Phi$), où Φ et β sont des résidus respectivement hydrophobiques (M, L, I, F ou V) et basiques (R, K ou H) [238]. Dans la plus part des cas, la sous-unité catalytique α de l'AMPK transfère l'ATP à un résidu Sérine [239].

I.5.4.1 Rôle de l'AMPK dans le métabolisme

L'AMPK phosphoryle et régule de nombreuses cibles impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (figure 21).

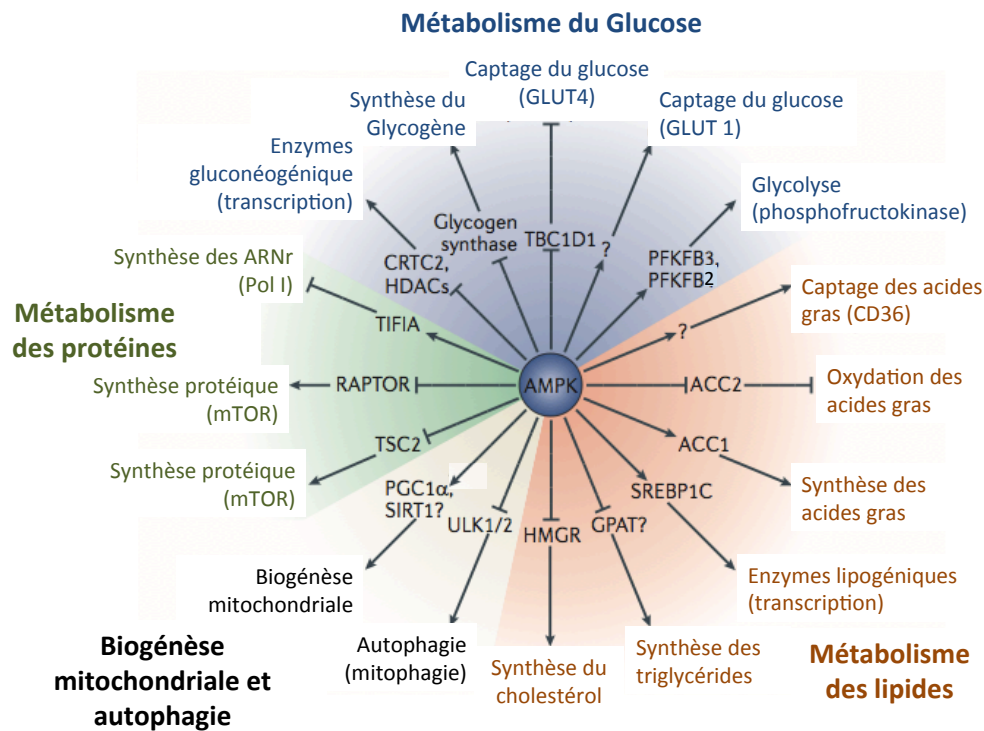


Figure 21. Cibles de l'AMPK impliquées dans l'homéostasie métabolique.

Schéma (adapté de Hardie et al, Mol Cell Biol 2012) représentant les principales cibles métaboliques de l'AMPK. Le point d'interrogation signifie que la protéine peut ne pas être directement phosphorylée par l'AMPK. Les voies cataboliques activées par l'AMPK comprennent le captage du glucose via les transporteurs de glucose de type 4 (GLUT4) et GLUT1, la glycolyse, le captage des acides gras via CD36, l'oxydation des acides gras, la biogénèse mitochondriale et l'autophagie. Les voies anaboliques inhibées par l'AMPK comprennent la synthèse des acides gras, des triglycérides, du cholestérol, des protéines, des ARN ribosomiaux et du glycogène, la transcription des enzymes lipogéniques et gluconéogéniques. ACC (« Acetyl-CoA-Carboxylase »); CRTC2 (« CREB-regulated transcription co-activator 2 »); GPAT (« glycerol phosphate acyl transferase »); HDACs (« histone deacetylases »); HMGR (« 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase »); mTOR (« mammalian target of rapamycin »); PFKFB (« 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphate »); PGC1 α (« peroxisomeproliferator-activated receptor- γ -co-activator 1 α »); TBC1D1 (« TBC1 domain family member 1 »); TIFIA (« transcription initiation factor IA »); TSC2 (« tuberous sclerosis 2 »); ULK (« UNC-51-like kinase »).

De façon intéressante, la régulation de cibles métaboliques telles que la protéine mTOR (« mammalian Target Of Rapamycin ») permet de connecter le métabolisme au contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaires mais aussi à l'architecture cellulaire. En effet, en phosphorylant et en activant la p70S6K1 (« p70 ribosome S6 protein Kinase »), mTOR peut jouer un rôle important dans le remodelage du cytosquelette d'actine via la régulation des petites GTPases RhoA et Rac1 [240]. Le rôle important de la signalisation mTOR/p70S6K1 dans le contrôle de la fonction plaquettaire a récemment été mis en évidence [241].

Le rôle de l'AMPK dans le contrôle de l'activité des GTPases a également été étudié dans le contexte de la stimulation du transport de glucose dans le muscle. L'insuline stimule le transport du glucose en induisant la translocation à la membrane du transporteur de glucose GLUT4, via une signalisation impliquant la PI3K et PKB [242]. AS160 (« Akt substrate 160 »), une cible directe de PKB, est une GAP de la GTPase Rab impliquée dans le transport des vésicules exprimant GLUT4 à leur surface. La phosphorylation inhibitrice de AS160 par la PKB permet l'activation de Rab et la translocation de GLUT4 à la membrane. AS160 peut également être directement phosphorylé et inhibé par l'AMPK [243], ce qui permet de stimuler le transport de glucose dans le muscle, indépendamment de la voie insulinique.

L'importance du métabolisme dans la fonction plaquettaire a très peu été étudiée. Très récemment, une étude sur le métabolisme mitochondriale et glycolytique a montré qu'ils contribuaient ensemble à la production d'énergie nécessaire au maintien de la plaquette au repos. L'agrégation est associée à une stimulation de la glycolyse mais la phosphorylation oxydative est néanmoins requise pour assurer une activation plaquettaire maximale [29].

Des dysfonctions mitochondriales plaquettaires couplées à un stress oxydatif ont été associées à certaines pathologies comme le diabète de type II. Elles s'accompagnent d'une hyperactivité des plaquettes [248]. Cependant, aucun lien clair entre la respiration mitochondriale et l'activation palquettaire n'a encore été établi dans la littérature.

1.5.4.2 Rôle de l'AMPK dans l'organisation du cytosquelette d'actine

Depuis près d'une dizaine d'années, des études montrent que l'AMPK peut contrôler l'organisation des filaments d'actine en régulant des protéines du cytosquelette.

Les petites GTPases de la famille Rho jouent un rôle clé dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Des études dans les cellules musculaires ont montré que l'AMPK régule ces GTPases directement ou indirectement. L'AMPK peut phosphoryler RhoA sur la Ser188, ce qui mène à l'inhibition de la signalisation en aval [244]. L'AMPK peut aussi phosphoryler et activer TIAM-1 (« T-cell lymphoma Invasion And Metastasis 1 »), un GEF spécifique de Rac-1 [245]. Cette régulation contribue au réarrangement du cytosquelette d'actine associé à la stimulation du transport de glucose. Une autre GEF spécifique de la GTPases Arf, GBF1 (« Golgi-specific Brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange Factor 1 »), a également été identifiée comme un nouveau substrat direct de l'AMPK dans les cellules de mammifères, dans lesquelles il contrôle le désassemblage de l'appareil de Golgi durant la mitose [246]. Dans la plaquette, le rôle de Arf est peu décrit. Seule une étude s'est intéressée à Arf6 et montre que le collagène, via son récepteur GPVI, augmente les niveaux d'Arf6-GTP qui à son tour régule les petites GTPases de la famille de Rho [247, 248].

L'ensemble de ces travaux indique que l'AMPK peut être un régulateur central de l'activité des GTPases, ce qui pourrait contribuer à son rôle déjà décrit dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Ce paradigme a d'ailleurs été démontré en 2010 dans les cellules épithéliales, où une activation de l'AMPK a été associée à l'activation de la voie RhoA/ROCK et à une augmentation de l'état de phosphorylation de la cofiline et des MLC [203].

D'autre part, l'étude de Banko et al en 2011 démontre que l'AMPK peut également phosphoryler directement MYPT1. En phosphorylant MYPT1, l'AMPK favorise sa liaison avec la protéine 14-3-3, ce qui empêche le complexe phosphatase de se former et mène donc à une augmentation de la phosphorylation des MLC [249]. Dans cette même étude, l'effecteur de la petite GTPase Rac, PAK-2 (« p-21 Activated Kinase 2 »), est un autre substrat direct de l'AMPK. Sa phosphorylation est également associée à une augmentation de la phosphorylation des MLC [250].

La protéine du cytosquelette VASP a aussi été identifiée comme une cible directe de l'AMPK. L'activation de l'AMPK mène à la phosphorylation de VASP sur deux sites, la Thr278 et la Ser322. Elle est associée à une altération de la polymérisation de l'actine [193, 194].

Très récemment, dans des cellules de rat qui sécrètent de l'insuline (INS-1) et des cellules épithéliales (Hek293T), une étude d'interaction protéiques avec les sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ de l'AMPK a permis d'identifier de nouvelles cibles du cytosquelette : la gelsoline, impliquée dans la polymérisation des filaments d'actine, et la vimentine, principalement connue pour son rôle dans le mécanisme d'adhésion cellulaire et le transport des vésicules [251].

BUT DU TRAVAIL

II. BUT DU TRAVAIL

Les fonctions plaquettaires sont assurées grâce à une augmentation de calcium intracellulaire et à un réarrangement drastique du cytosquelette d'actine. Les mécanismes impliqués dans leur régulation font l'objet d'intenses recherches afin de mieux comprendre leurs rôles physiologiques dans ce modèle, mais aussi dans le but d'améliorer les traitements anti-thrombotiques utilisés dans certaines pathologies cardiovasculaires, comme le syndrome coronarien aigu.

L'AMP kinase a été longtemps revue dans les processus métaboliques. Bien que le métabolisme et l'AMPK n'aient encore jamais été investigués dans les plaquettes sanguines, nous nous sommes intéressés à son rôle dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine. En effet, depuis plusieurs années, des données montrent que l'AMPK contrôle des cibles du cytosquelette impliquées dans le remodelage (Cofiline, VASP) ou la contraction des filaments d'actine (MLC), cependant cela n'a pas été étudié dans le modèle plaquettaire. Une étude en 2003 a proposé que l'AMPK régulerait la production de NO dans les plaquettes stimulées par l'insuline [252]. Seulement, ces données sont controversées suite à des études qui démontrent que les NO synthases (eNOS et iNOS) et le récepteur à l'insuline ne sont pas ou quasiment pas exprimés dans les plaquettes [253, 254].

L'étude expérimentale que nous avons menée repose sur des travaux antérieurs clés, dont ceux du laboratoire, montrant que :

- L'AMPK est activée en réponse à la thrombine, un agoniste plaquettaire puissant, dans les cellules endothéliales, via une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire [255]
- L'AMPK contrôle, dans d'autres modèles cellulaires, l'organisation du cytosquelette d'actine [203, 209, 256]

Dès lors, nous avons émis l'hypothèse que l'AMPK pourrait être aussi activée dans les plaquettes en réponse à la thrombine. Et que cette activation pourrait jouer un rôle dans le contrôle de certaines fonctions plaquettaires, en régulant des processus dépendant du cytosquelette d'actine.

Les objectifs de notre projet de recherche étaient les suivants :

- 1) Evaluer dans les plaquettes la présence et l'activation de l'AMPK, non seulement par la thrombine mais aussi par les autres agonistes plaquettaires (TXA₂, collagène et ADP).
- 2) Etudier l'implication de l'AMPK dans la phosphorylation de protéines cibles impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine de la plaquette activée par la thrombine (MLC, Cofiline, VASP).
- 3) Examiner l'impact d'une activation de l'AMPK sur la polymérisation de l'actine et son organisation en filopodes/lamellipodes
- 4) Etudier la contribution de l'AMPK dans la régulation des processus plaquettaires dépendant d'une contraction/polymérisation/réorganisation du cytosquelette d'actine : la sécrétion, l'agrégation, l'adhésion et la rétraction du caillot de fibrine

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette étude a été publié dans (cfr Annexes):

Onselaer, M.B., Oury, C., Hunter, R.W., Eeckhoudt, S., Barile, N., Lecut, C., Morel, N., Viollet, B., Jacquet, L.M., Bertrand, L., Sakamoto, K., Vanoverschelde, J.L., Beauloye, C., Horman, S. 2014. *CaMKK β /AMPK- α 1 pathway regulates phosphorylation of cytoskeletal targets in thrombin-stimulated human platelets.* J Thromb Haemost., 2014. **12**(6): p. 973-86.

MATERIEL ET METHODES

III. MATERIEL ET METHODES

III.1. Matériel

III.1.1. Produits

Réactifs		Anticorps	
Nom	Société	Nom	Société
A769662	TOCRIS	ACC	Cell signaling
ADP	Stago	phospho-ACC (S79)	Cell signaling
AICAr	Toronto Research Chemical	beta-Actine	Santa-Cruz biotechnology
Apyrase	Sigma	AMPK	Cell signaling
BSA	Carl ROTH	AMPKalpha1	Kinasource
Collagène	Stago	AMPKalpha2	Kinasource
Eptifibatide	GSK	AMPKbeta1	Cell signaling
Fibrinogène	SIGMA	AMPKbeta2	Cell signaling
FLUO-3AM	Santa-Cruz biotechnology	AMPKgamma1	Cell signaling
OptiPrep	SIGMA	AMPKgamma2	PIERCE antibody
PAR-1 agoniste	American peptide	AMPKgamma3	PIERCE antibody
PAR-4 agoniste	American peptide	phospho-AMPK (T172)	Cell signaling
PGE1	Calbiochem	CaMKKbeta	Santa-Cruz biotechnology
Phalloidine-TRITC	SIGMA	CD62P-FITC	BD biosciences
Probénécide	SIGMA	Cofiline	Cell signaling
Sto-609	TOCRIS	phospho-cofiline (S3)	Cell signaling
Thrombine	SIGMA	GAPDH	Cell signaling
U46619	TOCRIS	Gelsoline	Santa-Cruz biotechnology
		JON/A-PE	Emfret Analytics
		MLC	Cell signaling
		phospho-MLC (S19)	SIGMA
		PAC1-FITC	BD biosciences
		PAK1/2/3	Cell signaling
		phosphoPAK2 (S20)	Cell signaling
		phospho-PKC substrates	Cell signaling
		VASP	Cell signaling
		phospho-VASP (T278)	ECM bioscience

III.1.2. Supports

Dosage du thromboxane B2 (TXB2 immunoassay ki, GE Healthcare).

Dosage de l'ATP (Chrono/Lume)

Cell-DYN Emerald (Abbott diagnostics)

Spectrophotomètre (AMINCO SPF500)

Agrégomètre (Chrono-Log 700, STAGO)

Cytométrie de flux (FACScalibur, BD biosciences)

Microscope (Zeiss) + ApoTome (AxioImager)

III.2. Méthodes

III.2.1. Comité d'éthique

Toutes les procédures sur animaux ont été approuvées par les autorités locales (Comité d'éthique facultaire pour l'expérience animale, UCL/MD/2007/049 et 2011-2/UCL/MD/025p) et elles ont été réalisées en accord avec les règles d'expérimentations sur animaux dans notre institution. De plus, cette étude est conforme aux règles pour les soins et l'utilisation d'animaux de laboratoire, publiées par le US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, révisé en 1996).

L'étude sur des volontaires sains et patients a été approuvée par la Commission d'Ethique Biomédicale Hospitalo-Facultaire de l'Université Catholique de Louvain. Les patients ont été recrutés à l'Unité de Soins Intensifs des Cliniques Universitaires de Saint-Luc (Bruxelles, Belgique) et ont signé un consentement éclairé.

III.2.2. Isolement des plaquettes

III.2.2.1. Isolement de plaquettes humaines

Les plaquettes humaines proviennent de volontaires sains qui sont exempts de médicaments connus pour interférer avec la fonction plaquettaire depuis au moins 7 jours. Le sang a été collecté à partir d'une veine à l'aide d'une aiguille papillon 21G montée sur un tube de

prélèvement (S-monovette) contenant une solution citratée (Citrates de Sodium 1 :10). Le plasma riche en plaquette (PRP) est obtenu après une centrifugation de 15 min à 330g. Les plaquettes sont isolées après une centrifugation de 10 min à 800g et resuspendues dans du tampon Tyrode modifié (135mM NaCl, 12mM NaHCO₃, 1mM Citrate de sodium, 2.9mM KCl, 0.3mM Na₂HPO₄, 1mM MgCl₂, 5mM D-glucose, 10mM Hepes, 0.35% BSA, ajusté à pH 7.4 à 37°C) à une concentration de $2.5 \cdot 10^5$ plaquettes/ μ L pour la mesure du calcium intracellulaire et l'agrégométrie.

Pour les analyses protéiques, le PRP en présence d'éptifigatide (4 μ g/ml) et d'apyrase (0.5U/ml) est déposé sur un volume d'OptiPrep[®] (une barrière de densité d'iodixanol) et centrifugé 15 min à 350g. La phase supérieure contenant des plaquettes purifiées est récupérée pour être centrifugées 10 min à 800g. Le culot de plaquette est resuspendu dans du tampon Tyrode modifié à une concentration de $2.5 \cdot 10^5$ plaquettes/ μ L.

III.2.2.2. Isolement de plaquettes de souris

Les souris wild type et knock-out pour l'AMPK (fond génétique mixte C57BL6 et SV-129) sont issus d'une Les souris mâles âgées de 12 semaines ont été anesthésiées avec du pentobarbital (25-35 mg/Kg). Le sang est prélevé à partir du sinus rétro-orbital et collecté dans un tube contenant une solution d'acide-citrate-dextrose (1 :10) et de l'apyrase (0.5U/ml). Le PRP est obtenu après une centrifugation de 5 sec à 800g, suivi de 5 min à 100g. Les PRP de 3 animaux sont rassemblés avant d'être centrifugés 10 min à 400g. Les plaquettes sont resuspendues dans un tampon Tyrode modifié à une concentration de $2.5 \cdot 10^5$ plaquettes/ μ L.

III.2.3. Analyses protéiques

III.2.3.1. Tests enzymatiques

a) AMPK

L'AMPK a été immunoprécipitée avec 10 μ g d'un anticorps dirigé contre la sous-unité α 1 ou α 2 à partir de 50 μ g d'extraits protéiques plaquettaires. L'activité de l'AMPK est mesurée dans un volume final de 50 μ L de tampon Hepes 50mM, pH 7.2 contenant du peptide SAMS

contenant le site de reconnaissance de l'ACC (0.2mM), 0.2mM AMP et 0.1mM [γ - 32 P]MgATP (radioactivité spécifique : 1000 cpm/pmole), à 30°C. Des aliquots de 10 μ L sont prélevés pour être déposés sur du papier Whatman P81 pour la mesure d'incorporation du 32 P. Une unité d'activité de la protéine kinase correspond à l'incorporation d'1 mmole de phosphate par minute dans le substrat peptidique approprié, dans les conditions du test.

b) LKB1

LKB1 a été immunoprécipité avec 2 μ g d'anticorps spécifique à partir de 1mg d'extraits protéiques plaquettaires. L'activité de LKB1 est mesurée à l'aide du LKBtide, un peptide artificiel contenant le site de reconnaissance de NUAK2 (une AMPK-related kinase). Le tampon pour la mesure d'activité contient 40mM d'HEPES, 80mM NaCl, 8% glycérol, 0.8mM EDTA, 0.8mM DTT, 5mM MgCl₂, 200 μ M LKBtide et 0.1mM [γ - 32 P]MgATP (radioactivité spécifique : 1000 cpm/pmole), à 30°C..

III.2.3.2. Western Blotting

30 μ g d'extraits protéiques sont dilués dans un tampon Laemmli (5x concentré contenant 1M glycérol 87% ; 0.7M β -mercapto ; 80mM SDS ; 62mM Tris : pH 6,8) et déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Les protéines migrent selon leur taille et sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidène fluorure (PVDF). La membrane est bloquée avec une solution d'albumine bovine 5 % diluée dans un tampon TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Tween). Ensuite, la membrane est mise en présence de l'anticorps primaire dilué dans le TBS: généralement dilué 1/1000, excepté pour l'anti-AMPK- α 1 et anti-AMPK- α 2 (Kinasource), l'anti- β actine (SC) et anti-pMLC 1/10000 (Sigma). L'anticorps primaire est incubé pendant une nuit à 4°C. Après plusieurs rinçages, un anticorps secondaire (1/20000 anti-lapin, 1/1000 anti-souris et 1/10000 anti-mouton), couplé à une peroxydase, permet de révéler le signal par chemiluminescence.

III.2.3.3. Immunoprécipitation

100-1000 µg d'extraits protéiques sont mis en contact avec des billes de sépharose couplées avec l'anticorps primaire (1/100) pendant 1 heure à 4°C. Après plusieurs étapes de centrifugations et de lavages, la protéine, immunoprécipitée et couplée aux anticorps est dénaturée dans le tampon Laemmli, est déposée sur un gel de polyacrylamide.

III.2.4. Etudes plaquettaires

III.2.4.1. Comptage des plaquettes

Les plaquettes resuspendues dans le tampon Tyrode modifié sont quantifiées à l'aide du Cell-DYN Emereald (Abbott Diagnostics).

III.2.4.2. Mesure de l'entrée de calcium intracellulaire

a) Spectrofluorimétrie

Les plaquettes resuspendues dans un tampon Tyrode modifié exempt de calcium, sont incubées 30min à 37°C avec du Fluo-3AM (3µM). On ajoute du probénécide (2.5mM) avant l'expérimentation pour éviter la fuite du marqueur. Après deux lavages, les plaquettes sont resuspendues dans un tampon Tyrode modifié à une concentration de $2 \cdot 10^7$ plaquettes/mL. Les plaquettes, dans une cuvette, sont alors pré-traitées avec du STO-609 (10µM – 2 min) en présence de calcium (2mM) extracellulaire ajouté extemporanément. Les plaquettes sont mises sous agitation à 37°C et stimulées avec de la thrombine (0.1U/ml). La fluorescence émise est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Fluo-3AM : Excitation 505nm, Emission 530nm).

b) Cytométrie de flux

Les plaquettes resuspendues dans un tampon Tyrode modifié exempt de calcium, sont incubées 30min à 37°C avec du Fluo-3AM (3µM). On ajoute du probénécide (2.5mM) avant l'expérimentation pour éviter la fuite du marqueur. Après deux lavages, les plaquettes sont resuspendues dans un tampon Tyrode modifié à une concentration de $2 \cdot 10^7$ plaquettes/mL.

Les plaquettes sont analysées par cytométrie de flux (FACScalibur) afin d'obtenir le niveau basal (T0). Elles sont, ensuite, traitées avec du STO-609 (10 μ M – 2 minutes) ou le véhicule contrôle (DMSO 1/1000) et réanalysées en FACS. Dès qu'elles sont stimulées avec de la thrombine (0.1U/ml), elles sont repassées en FACS et analysées à différents temps.

III.2.4.3. Dosage du thromboxane

Suite à une stimulation, les plaquettes peuvent produire du TXA2 à partir d'acide arachidonique. Etant donné que le TXA2 est très instable (demi-vie de 30 sec), il est rapidement converti en un métabolite plus stable, le TXB2. C'est ce métabolite qui est mesuré par un test enzymatique basé sur le principe du test d'immunodosage par compétition. Les échantillons analysés sont des surnageants de plaquettes pré-traitées ou non 2 min avec du STO-609 (10 μ M) et stimulées avec de la thrombine (0.1U/ml) pendant 5 min. La réaction est stoppée par une centrifugation, afin de récupérer le surnageant. Le contrôle négatif est réalisé à l'aide de surnageants de plaquettes activées avec de la thrombine (0.1U/ml), en présence d'aspirine (ASA 1mM).

III.2.4.4. Mesure de la polymérisation de l'actine

a) Centrifugation

La détermination de la proportion d'actine monomérique (actine-G) et filamenteuse (actine-F) a été réalisée à l'aide d'un kit et quantifiée par Western Blot (G-actin/F-actin in vivo assay Biochem kit, Cytoskeleton). Brièvement, des plaquettes stimulées avec de la thrombine (0.1U/ml – 1 minute) après une pré-incubation ou non avec le STO-609 (10 μ M - 2 minutes) sont lysées avec un tampon qui stabilise et maintient les formes d'actine monomérique ou filamenteuse. Une centrifugation précipite l'actine-F et laisse l'actine-G dans le surnageant. Le culot et le surnageant sont traités et analysés par la technique du Western Blot.

b) Cytométrie de flux

A l'aide de phalloïdine couplée à une molécule fluorescente (FITC pour « Fluorescein Isothiocyanate »), on mesure par cytométrie de flux la quantité d'actine-F dans les

plaquettes. Après traitement, la réaction est stoppée avec un volume de paraformaldéhyde (4%) pendant 30 min à 37°C. Ensuite, elles sont perméabilisées avec 0.1 volume d'un mélange de Triton X-100 (1%) et de phalloïdine-FITC (10µM) pendant 1 heure à 25°C.

III.2.4.5. Adhésion statique

Des lames de verre sont saturées avec une solution contenant du fibrinogène (100µg/ml) toutes une nuit à 4°C. Après un lavage au PBS (« Phosphate Buffer Saline »), elles sont ensuite bloquées avec de la BSA (5mg/ml dans du PBS) 1 h à température ambiante. Les plaquettes sont lavées et resuspendues dans du tampon Tyrode modifié à la concentration de $2 \cdot 10^4$ plaquettes/µL. Elles sont stimulées ou non avec de la thrombine (0.05 U/ml) en présence de calcium (2mM) juste avant d'être déposées sur les lames préparées. Après 1 h à 37°C, les plaquettes qui n'ont pas adhéré sont éliminées après 3 lavages au PBS. Les plaquettes adhérentes sont alors fixées avec de la paraformaldéhyde (4%) pendant 30 min à température ambiante et ensuite lavées. Les plaquettes fixées sont perméabilisées avec un tampon de blocage (PBS, 0.1% SDS + 1% BSA) contenant de la phalloïdine couplée à TRITC, (tétraméthylrhodamine), (1 : 100) pendant 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les lames sont alors montées avec du Fluoromount G (Southern Biotech) avec une lamelle de verre et visualisées à l'aide d'un microscope fluorescent (Zeiss) et ApoTome (Axio Imager) à 100x en immersion à l'huile.

III.2.5. Fonctions plaquettaires

III.2.5.1. Sécrétion des granules α

Pour analyser la sécrétion des granules α , nous utilisons un anticorps spécifique contre la p-selectine CD62P, qui est présent à la surface de ces granules et après activation, se retrouve à la surface plaquettaire. Les plaquettes sont lavées et resuspendues dans du tampon Tyrode modifié à la concentration de $2.5 \cdot 10^5$ plaquettes/µL en présence d'un anti-CD62P couplé à FITC. Elles sont incubées avec du STO-609 (10µM – 2 min) ou le contrôle véhicule (DMSO 1/1000) avant d'être stimulées avec l'agoniste plaquettaire. La réaction est arrêtée lorsque l'on ajoute de la paraformaldéhyde (4%) pour les fixer 30 min à 4°C. Elles sont ensuite analysées en cytométrie de Flux (FACScalibur).

III.2.5.2. Sécrétion des granules denses

Pour analyser la sécrétion des granules denses, nous utilisons le kit Chrono/Lume (STAGO) avec l'agrégomètre (Chrono-Log 700). Brièvement, l'ATP sécrété se fixe au complexe luciférine-luciférase ce qui génère de la lumière proportionnellement à la quantité d'ATP libéré. Des plaquettes lavées et resuspendues dans du tampon Tyrode modifié à une concentration de $2.5 \cdot 10^5$ plaquettes/ μL sont placées dans une cuvette sous agitation à 37°C . Le réactif Chrono/Lume est ajouté 2 min avant tout traitement.

III.2.5.3. Agrégation

La transmission de lumière qui passe à travers une suspension de plaquette est analysée à l'aide d'un agrégomètre (Chrono-Log 700, STAGO). Des plaquettes lavées et resuspendues dans du tampon Tyrode modifié à une concentration de $2.5 \cdot 10^5$ plaquettes/ μL sont placées dans une cuvette sous agitation à 37°C . Séquentiellement sont ajoutés du calcium (2mM), le STO-609 (10 μM) ou son contrôle véhicule (DMSO1/1000) (2 min) et l'agoniste plaquettaire.

III.2.5.4. Activation du récepteur au fibrinogène

Pour analyser l'activation du récepteur au fibrinogène (GPIIb/IIIa), nous utilisons un anticorps spécifique qui reconnaît la conformation active de ce récepteur (PAC-1). Les plaquettes sont lavées et resuspendues dans du tampon Tyrode modifié à la concentration de $2.5 \cdot 10^5$ plaquettes/ μL , en présence de PAC-1 couplé à FITC. Elles sont incubées avec du STO-609 (10 μM – 2 min) ou le contrôle véhicule (DMSO 1/1000) avant d'être stimulées avec l'agoniste plaquettaire. La réaction est arrêtée par ajout de la paraformaldéhyde (4%) pour les fixer 30 min à 4°C . Elles sont ensuite analysées en cytométrie de Flux (FACScalibur).

III.2.5.5. Rétraction du clou plaquettaire

Le PRP est ajusté à $6 \cdot 10^5$ plaquettes/ μL avec du plasma pauvre en plaquette (PPP). A 300 μL de cette suspension on ajoute 300 μL d'une solution qui contient de la thrombine (1U/ml, concentration finale) et du calcium (2mM, concentration finale). La rétraction du clou

plaquettaire est photographié à différents temps jusqu'à 1 h à 37°C. L'étendue de la rétraction est quantifiée à l'aide du programme ImageJ.

III.2.6. Etude clinique

Des patients consentants prévus pour subir une chirurgie cardiaque avec la mise en place d'une circulation extra-corporelle (CEC) ont été recrutés à l'Unité des Soins Intensifs des Cliniques Universitaires Saint-Luc (Bruxelles, Belgique). Aucun de ces patients n'avait reçu d'aspirine ou autres anti-plaquettaires endéans les 5 jours précédant l'opération. Les patients ayant souffert d'un syndrome coronarien aigu endéans les 6 mois ont été exclus. Un premier prélèvement sur tube S-monovette citraté a été effectué durant la CEC, après l'administration de l'héparine non-fractionnée (UHF, 'Unfractionned Heparin »). Un second prélèvement a été effectué 4 h après le retour du patient au CVI lorsque les paramètres de la coagulation sont revenus à des valeurs normales.

III.2.7. Analyses cliniques

III.2.7.1. Multiplate

L'analyseur Multiplate® (fonction plaquettes multiples) est un instrument conçu pour le diagnostic *in vitro* dans les hôpitaux et autres établissements médicaux et scientifiques. L'analyseur évalue la fonction des plaquettes dans le sang total. Il présente plusieurs canaux (jusque 4 analyses simultanément) et propose des options de test, ainsi que des détecteurs dupliqués dans chaque cuve réactionnelle. Les mesures des caractéristiques de l'agrégation des plaquettes se font sur le principe de l'impédancemétrie. L'appareil évalue l'augmentation de la résistance électrique, due à l'accumulation des plaquettes sur des électrodes en métal.

III.2.7.2. ROTEM

Le ROTEM est un système d'hémostase sur sang total, basé sur la thromboélastographie (TEG) rotative, forme moderne de la TEG classique mise au point en 1948 par Hartert. Le Rotem est un instrument compact et facilement transportable, composé de quatre canaux

de mesure, d'une pipette électronique commandée par ordinateur équipé d'un logiciel dédié. Le principe de mesure du ROTEM est basé sur une cellule de mesure à cuvette fixe, contrairement au TEG classique. Il permet une étude rapide et globale de la coagulation. Les paramètres mesurés sont le CT (Temps de Coagulation), CFT (Temps de Formation du Caillot), MCF-A10 et MCF-A15 (Fermeté Maximale du Caillot).

III.2.7.3. Génération de thrombine endogène

L'« ETP » (Endogenous Thrombin Potential) correspond au potentiel d'activité que la thrombine peut développer pour convertir ses substrats. Il est exprimé en concentration (nanomolaire) de thrombine, multipliée par le temps en minutes: $ETP = \text{nM Thrombine} \times \text{temps en minutes}$. L'ETP est avant tout dépendant de la concentration de la prothrombine et des antithrombines plasmatiques. Il est aussi influencé par les facteurs de coagulation qui participent directement ou indirectement à l'activation de la prothrombine.

Pour réaliser le test, 20 μ l d'un mélange contenant du FT et des phospholipides sont ajoutés à 80 μ l de plasma de patients. La calibration se fait avec 20 μ l de « Thrombin calibrator » (contenant le complexe α 2-macroglobuline – thrombine) ajoutés à 80 μ l de plasma de patients. Ces échantillons sont déposés en triplicats dans une plaque de 96 puits. La réaction démarre lorsque l'on ajoute 20 μ l d'un mélange de substrat fluorogénique et de calcium. Le signal est lu toutes les 20 sec pendant 1 min à l'aide d'un lecteur de fluorescence. L'ETP correspond à l'aire sous la courbe. La hauteur du pic donne le taux maximal de thrombine produite.

III.2.7.4. Analyses de coagulation

a) Temps de Prothrombine (PT)

Via l'utilisation de thromboplastine, la mesure du PT (en secondes) permet d'évaluer la voie extrinsèque de la cascade de coagulation qui regroupe le complexe FT-VIIa et les facteurs de coagulation de la voie commune (prothrombine, V, X et le fibrinogène). On calcule le temps nécessaire pour la formation d'un caillot de fibrine.

b) Temps de Thrombine (TT)

Il évalue l'étape finale de la cascade de la coagulation, à savoir la conversion du fibrinogène en fibrine. Cette technique mesure le temps de formation d'un caillot en mettant en contact du plasma avec de la thrombine.

c) INR (« International Normalized Ratio »)

L'INR est un ratio établi pour monitorer la prise de traitements anticoagulants coumariniques. Les antagonistes de la vitamine K inhibent la synthèse hépatique des facteurs de coagulation II (prothrombine), VII, IX et X, ainsi que celle de la protéine C et de la protéine S qui sont des inhibiteurs de la coagulation.

d) aPTT (« activated Partial Thromboplastin Time »)

C'est une mesure qui analyse l'intégrité de la voie intrinsèque (Facteurs XII, XI, IX et VIII) et également de la voie commune. Elle mesure le temps pour la formation d'un caillot de fibrine en mettant en contact le plasma avec du matériel n'ayant pas d'activité sur la voie du facteur tissulaire comme du kaolin ou de la silice. Elle permet aussi de suivre l'action de l'héparine. Le mécanisme d'action de l'héparine consiste en une inhibition indirecte de la thrombine. En effet, l'héparine se lie avec l'antithrombine et convertit ce cofacteur dans sa forme la plus active d'inhibition de la thrombine, ainsi que du facteur Xa, XIa et Ixa.

e) ACT (« Activated whole blood Clotting Time »)

Sur du sang total, on calcule le temps nécessaire pour la formation d'un caillot sanguin à l'aide d'un agent activateur. C'est une mesure utile pour évaluer l'efficacité de la dose d'héparine administrée lors d'une chirurgie cardiaque nécessitant la mise en place d'une circulation extracorporelle (CEC). Etant donné que la quantité d'héparine dépasse 1U/mL lors d'une CEC, la mesure de l'aPTT n'est plus assez fiable pour l'interprétation. On préfère dès lors l'utilisation de l'ACT

f) Dosage des D-dimères

Les D-dimères sont les produits de dégradation de la fibrine, élément de la coagulation sanguine. La présence des D-dimères dans le sang témoigne de l'existence d'un caillot sanguin en cours et de la destruction de la fibrine. Le dosage sanguin des D-dimères est un indice révélateur de la formation d'un caillot sanguin.

III.3. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM (« Standard Error of the Mean ») ou SD (« Standard Deviation »). Les moyennes sont traitées et comparées par analyse de variance ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Student pairé ou après une correction de Bonferroni. Le seuil de signification statistique est établi à 0.05.

RESULTATS

Partie 1 : La signalisation CaMKK β /AMPK α 1 régule le cytosquelette d'actine dans les plaquettes stimulées par la thrombine.

IV.1. Expression et activation de l'AMPK dans les plaquettes.

Nous avons examiné la présence des isoformes catalytiques de l'AMPK dans les plaquettes et étudié son activation en réponses aux différents agonistes plaquettaires (Thrombine, TXA2, Collagène, ADP). Cette étude a été réalisée dans des plaquettes humaines isolées à partir de sang de volontaires sains et dans des plaquettes de souris contrôles (WT) ou AMPK α 1 knockout (KO).

IV.1.1. Identification des isoformes catalytiques de l'AMPK.

Les plaquettes humaines ont été purifiées à partir du « platelet rich plasma » (PRP) sur un gradient de densité à base d'iodixanol (OptiPrep®). L'analyse en Western blot des extraits protéiques a permis de mettre en évidence, grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques reconnaissant les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK, que seule l'AMPK $\alpha 1$ est présente dans les plaquettes humaines (figure 22A).

Pour déterminer la nature des isoformes présentes dans les plaquettes de souris, 50 μ g d'extraits protéiques ont été soumis à une immunoprécipitation avec les anticorps anti-AMPK $\alpha 1$ ou anti-AMPK $\alpha 2$, suivie d'une analyse en Western blot avec un anticorps anti-AMPK capable de reconnaître les deux isoformes. Les résultats montrent que, à la différence des plaquettes humaines, les deux sous-unités catalytiques de l'AMPK sont présentes dans les plaquettes de souris (figure 22B).

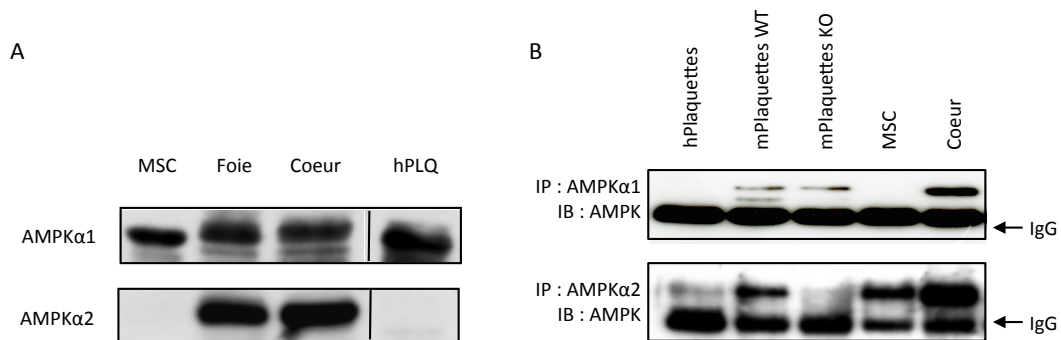


Figure 22. Evaluation de la présence des sous-unités catalytiques de l'AMPK dans les plaquettes humaines et murines.

L'expression de AMPK $\alpha 1$ et AMPK $\alpha 2$ a été analysée par Western Blot (A) à partir d'extraits protéiques de plaquettes humaines purifiées sur OptiPrep® (hPLQ) ou (B) à partir d'extraits protéiques de plaquettes lavées de souris WT et KO, grâce à l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement chacun des isoformes. Des extraits protéiques de cœur et de foie de rat, et de cellules souches mésenchymateuses (MSC) de souris ont été utilisés comme contrôle positif pour $\alpha 2$ et $\alpha 1$, respectivement.

IV.1.2. Activation de l'AMPK α 1 en réponse aux différents agonistes plaquettaires.

L'AMPK α 1 est activée environ 3 fois en réponse à la thrombine. Cette activation est associée à une augmentation de la phosphorylation de son site activateur, la Thr172 (figure 23A). Elle conduit également à la phosphorylation sur la ser79 du *bona fide* substrat de l'AMPK, l'ACC (figure 23B).

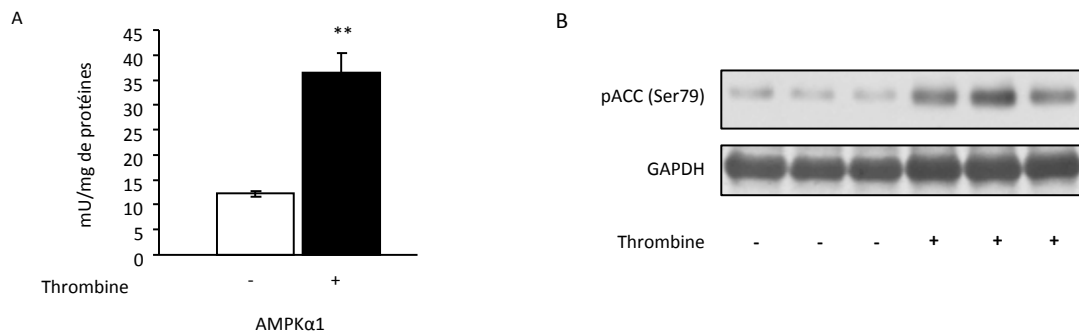


Figure 23. L'AMPK α 1 est activée par la thrombine.

(A) Un dosage d'activité enzymatique de AMPK α 1 a été réalisé après son immunoprécipitation à partir d'un lysat cellulaire de plaquettes humaines stimulées avec de la thrombine (0.1U/ml, 2 min). La moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes est représentée, **P < 0.01. (B) Des plaquettes humaines ont été stimulées avec de la thrombine 0.1U/ml pendant 2 min (triplicats). Les lysats cellulaires ont été analysés par Western blot avec l'anticorps anti-pSer79 de l'ACC.

La stimulation des plaquettes avec des doses croissantes de peptides qui activent spécifiquement PAR-1 (SFLLRN-NH₂, PAR1-AP) montre qu'une dose de 0.3µM entraîne une phosphorylation maximale de l'ACC (Figure 24. Par contre, une concentration de 300 µM est nécessaire pour que PAR4-AP (AYPGKF-NH₂, PAR4-AP) induise un niveau de phosphorylation similaire, ce qui confirme que PAR-1 est le principal médiateur de la signalisation induite par la thrombine dans les plaquettes humaines.

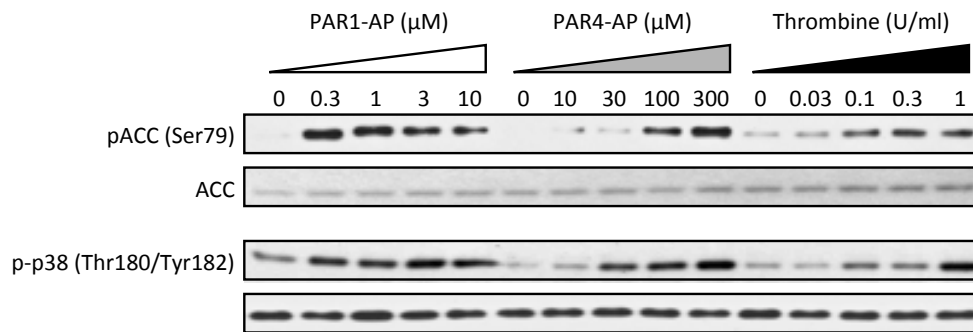


Figure 24. Effet des peptides activateurs de PAR-1 et PAR-4 sur la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes humaines. La phosphorylation de l'ACC a été évaluée en Western blot sur des extraits protéiques de plaquettes stimulées pendant 2 min avec des concentrations croissantes de PAR1-AP et PAR4-AP, et de thrombine. La phosphorylation de la MAPK p38 a été utilisée comme contrôle d'activation plaquettaire.

De façon intéressante, les autres agonistes plaquettaire affectent peu la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes humaines. Des plaquettes humaines purifiées ont été stimulées par des doses croissantes de thrombine (0.1, 0.03, 0.1, 0.3, 1 U/ml), par un analogue stable du TXA2 (U46619 : 0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M), par du collagène (0.5, 1, 2.5, 5, 10 μ g/ml) et de l'ADP (2.5, 5, 10, 25, 50 μ M). L'activation de l'AMPK a été évaluée indirectement, via la détermination de l'état de phosphorylation de la Ser79 de l'ACC. La figure 25 montre que la thrombine est le seul agoniste plaquettaire capable d'induire, déjà à partir d'une concentration de 0.03 U/ml, une phosphorylation significative de l'AMPK.

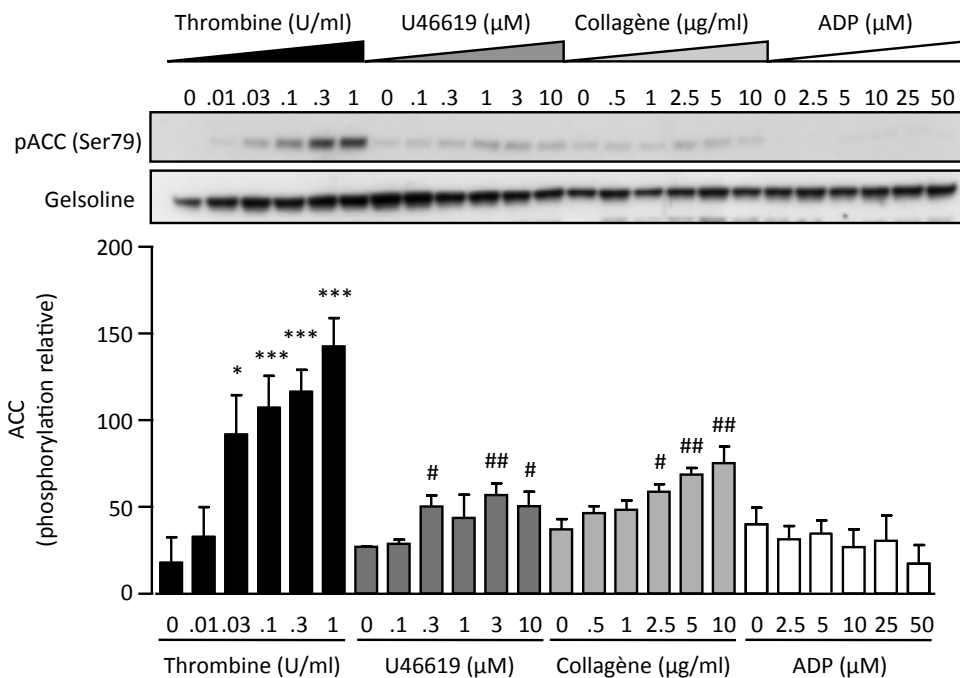


Figure 25. Effets des agonistes plaquettaire sur la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes humaines. Des plaquettes humaines purifiées ont été stimulées pendant 2 min avec des concentrations croissantes de thrombine, d'un analogue stable du TXA2 (U46619), de collagène et d'ADP. L'activité de l'AMPK a été évaluée indirectement en examinant la phosphorylation de son substrat préférentiel, l'ACC. Un Western blot représentatif est présenté dans le panel du haut. La quantification correspondant à la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes est représentée dans le panel du bas. Analyse ANOVA one way : *P < 0.05 et ***P < 0.001. Analyse T-test : # P < 0.05 et ## P < 0.01.

Dans les plaquettes de souris, la thrombine augmente également la phosphorylation de l'ACC (figure 26A). Par contre, à la différence des observations faites dans les plaquettes humaines, d'autres agonistes, tels que le TXA2 et le collagène, exercent le même effet (figure 26B).

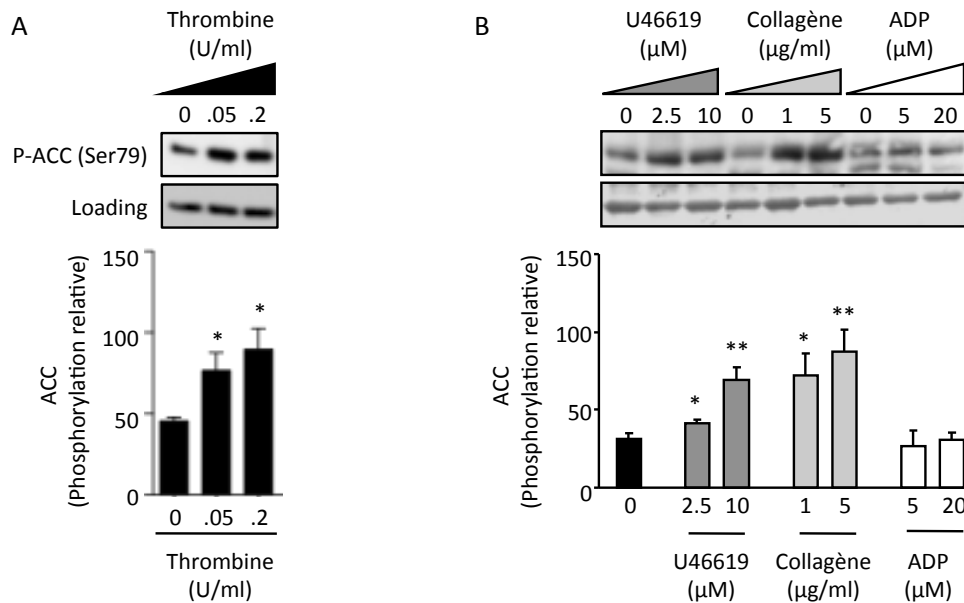


Figure 26. Effets des agonistes plaquettaire sur la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes murines. Des plaquettes murines isolées ont été stimulées pendant 2 min avec (A) des concentrations croissantes de thrombine ou (B) d'un analogue stable du TXA2 (U46619), de collagène et d'ADP (B). L'activité de l'AMPK a été évaluée indirectement en examinant la phosphorylation de son substrat préférentiel, l'ACC. Un Western blot représentatif est présenté dans le panel du haut. La quantification correspondant à la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes est représentée dans le panel du bas. *P < 0.05 and **P < 0.01.

Afin de déterminer la contribution des isoformes catalytiques de l'AMPK, la phosphorylation de l'ACC a été analysée en Western blot dans des extraits protéiques de plaquettes de souris AMPK α 1 et AMPK α 2 knockout traitées par les différents agonistes. Les résultats présentés à la figure 22 indiquent que la phosphorylation de l'ACC est perdue dans les plaquettes de souris AMPK α 1 knockout (figure 27A), par comparaison aux souris contrôles correspondantes. L'absence de l'AMPK α 2 diminue l'état de phosphorylation basal de l'ACC mais n'empêche pas l'augmentation induite en réponse aux différents agonistes (figure 27B).

Ces résultats indiquent que l'AMPK α 1 est le médiateur principal des effets des agonistes plaquettaire sur la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes de souris.

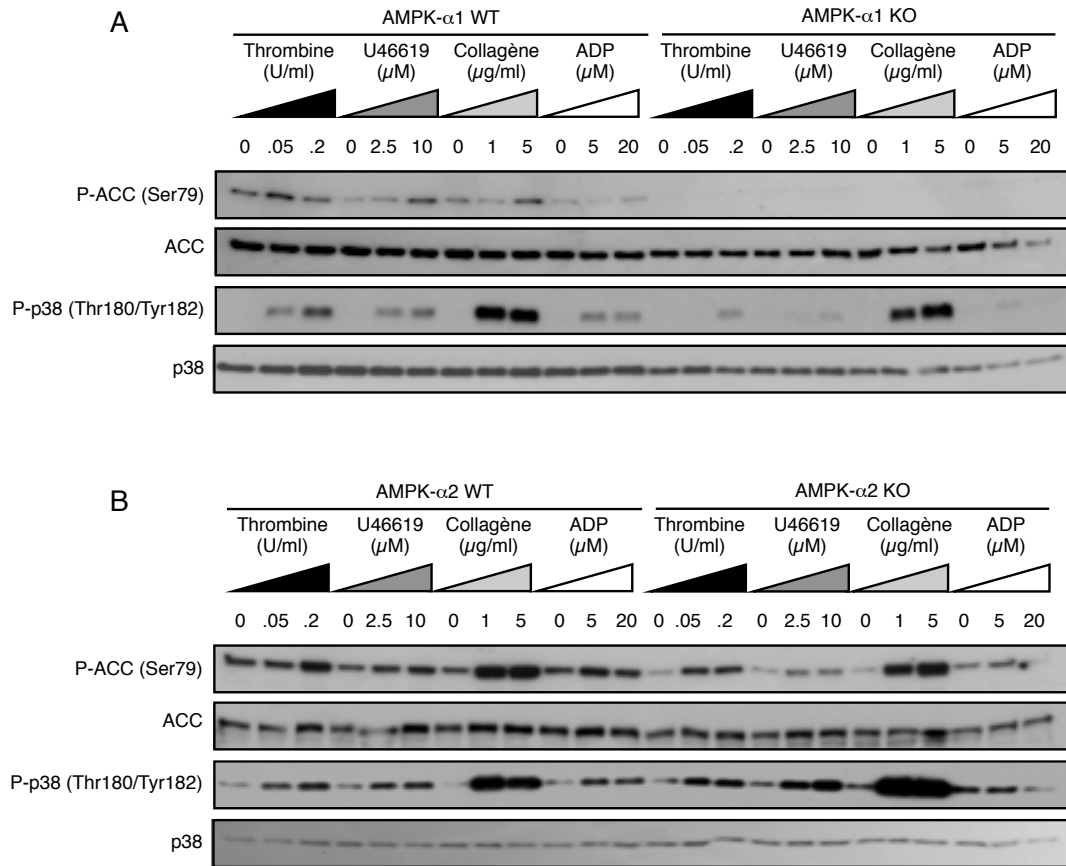


Figure 27. Effets des agonistes plaquettaire sur la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes de souris AMPK α 1 et AMPK α 2 knockout. La phosphorylation de l'ACC sur la ser79 a été évaluée en Western blot dans des extraits protéiques de plaquettes isolées de (A) souris AMPK α 1 knockout ou (B) AMPK α 2 knockout et des souris contrôles correspondantes (AMPK α 1 WT et AMPK α 2 WT), puis stimulées pendant 2 min avec des concentrations croissantes de thrombine, d'U46619, de collagène et d'ADP. La phosphorylation de la MAPK p38 a été utilisée comme contrôle d'activation plaquettaire.

IV.1.3. Rôle des AMPK kinases LKB1 et CamKK β dans la signalisation induite par la thrombine.

Les AMPK kinases, LKB1 et CaMKK β , sont présentes dans la plaquette (figure 28).

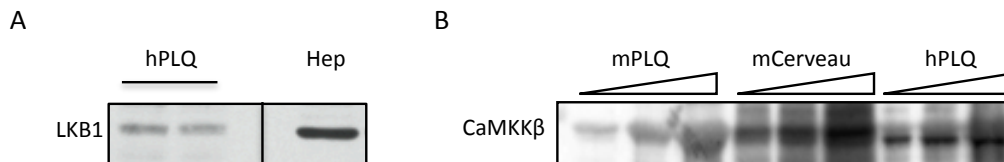


Figure 28. AMPK kinases.

La présence de (A) LKB1 et de (B) CaMKK β a été évaluée en Western blot dans des extraits protéiques de plaquettes isolées humaines ou murines : hPLQ, plaquettes humaines ; mPLQ, plaquettes murines. Comme contrôls : Hep, hépatocytes de rat ; mCerveau, cerveau de souris.

A ce jour, aucun site de phosphorylation n'a été reconnu comme responsable de l'activation de LKB1. L'activité de LKB1 dépend uniquement du complexe qu'elle forme avec les pseudokinases STRAD et Mo25. Elle peut être déterminée par un dosage enzymatique impliquant l'immunoprécipitation du complexe avec un anticorps spécifique anti-LKB1 et la phosphorylation *in vitro* d'un peptide substrat (LKBtide). Les résultats montrent que la thrombine n'augmente pas l'activation de LKB1 (figure 29).

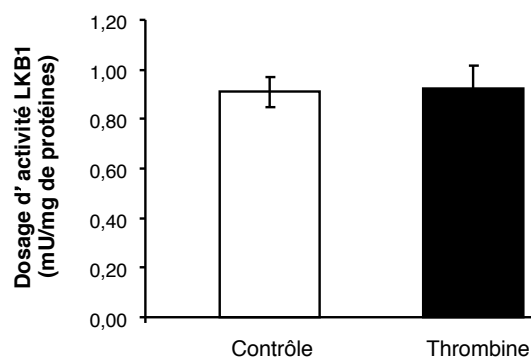


Figure 29. Effet de la thrombine sur l'activation de LKB1.

Un test d'activité enzymatique a été réalisé après immunoprécipitation de 1mg de lysat protéique. L'histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes +/- SEM.

Pour tester l'implication de la CaMKK β , les plaquettes ont été pré-incubées pendant 2 min avec un inhibiteur pharmacologique sélectif de la CaMKK β , le STO-609. Une pré-incubation avec le STO-609 10 μ M inhibe les effets de la thrombine sur la phosphorylation de la Thr172 de l'AMPK α 1 et sur la phosphorylation de l'ACC (figure 30).

La spécificité du STO-609 est soutenue par le fait qu'il n'est pas capable de réduire la phosphorylation de l'ACC induite par le composé A-769662 (100 μ M), un activateur pharmacologique direct de l'AMPK, qui n'implique pas l'action de la CaMKK β (figure 31).

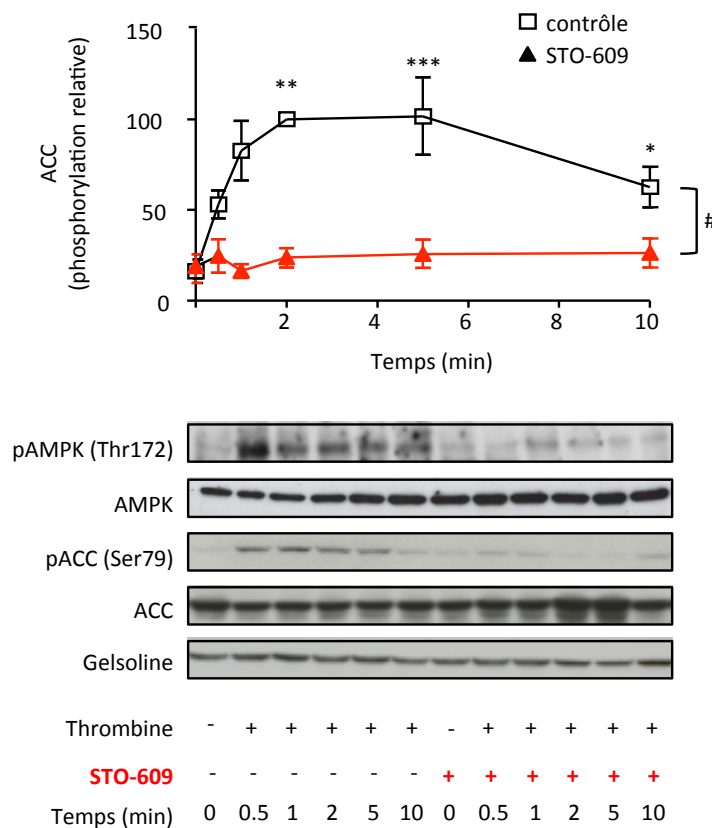


Figure 30. Evaluation de l'implication de la CaMKK β dans l'activation de l'AMPK induite par la thrombine.

Des plaquettes humaines ont été prétraitées (Δ) ou non (\square) pendant 2 min avec le STO-609 (10 μ M) avant d'être stimulées avec de la thrombine 0.1U/ml pendant 2 min. Un Western blot représentatif de la phosphorylation de la Th172 de l'AMPK et de la Ser79 de l'ACC est présenté dans le panel du bas. La quantification correspondant à la moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes est représentée dans le panel du dessus, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 valeurs statistiques entre le groupe traité avec le STO-609 ou non.

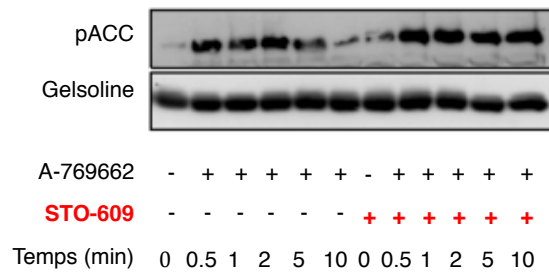


Figure 31. Effet du STO-609 sur l'activation de l'AMPK induite par le composé A-769662.

Des plaquettes humaines ont été prétraitées ou non avec du STO-609 (10µM, 2 min) avant d'être stimulées avec le composé A-769662 (100µM). Les lysats cellulaires ont été analysés en Western blot avec l'anti-pACC (Ser79).

IV.2. Implication de l'AMPK dans la régulation du cytosquelette d'actine de la plaquette activée par la thrombine.

Dans différents modèles cellulaires, l'AMPK contribue au contrôle de l'activité de certaines protéines du cytosquelette. Dans les cellules épithéliales de rein (MDCK), elle contrôle indirectement la phosphorylation des MLC (Ser19) et de la cofiline (Ser3) [203]. Dans les cellules endothéliales, elle entraîne la phosphorylation directe de VASP sur la Thr278 [193]. Ces trois protéines lient l'actine et leur rôle dans la contraction ou la réorganisation des filaments d'actine au cours de l'activation plaquettaire a été largement étudié. Par contre, les mécanismes moléculaires régulateurs, impliqués dans le contrôle de leur phosphorylation et de leur activité, ne sont pas encore complètement élucidés. Un des objectifs de notre étude a consisté à examiner le rôle joué par l'AMPK α 1 plaquettaire dans l'ensemble de ces régulations.

IV.2.1. Etude de la phosphorylation de la MLC, de la cofiline et de VASP dans les plaquettes humaines.

Dans des plaquettes humaines purifiées, la phosphorylation des MLC (Ser19) est déjà détectée après 30 sec et atteint un niveau maximum après 2 min de stimulation par la thrombine (0.1U/ml). Lorsque les plaquettes sont prétraitées avec du STO-609 (10 μ M, 2 min), cette phosphorylation est significativement réduite (figure 32A). Le STO-609 réduit également la phosphorylation de cofiline (Ser3) qui se maintient plus tardivement, jusqu'à 10 min de stimulation (Figure 32B). La thrombine induit aussi la phosphorylation rapide et transitoire (entre 30 sec et 2 min) de VASP sur la Thr278. A nouveau, cette phosphorylation est significativement inhibée en présence de STO-609 (Figure 32C). Ces résultats indiquent que la phosphorylation des protéines du cytosquelette est clairement affectée par l'inhibition pharmacologique de la voie CaMKK β /AMPK α 1.

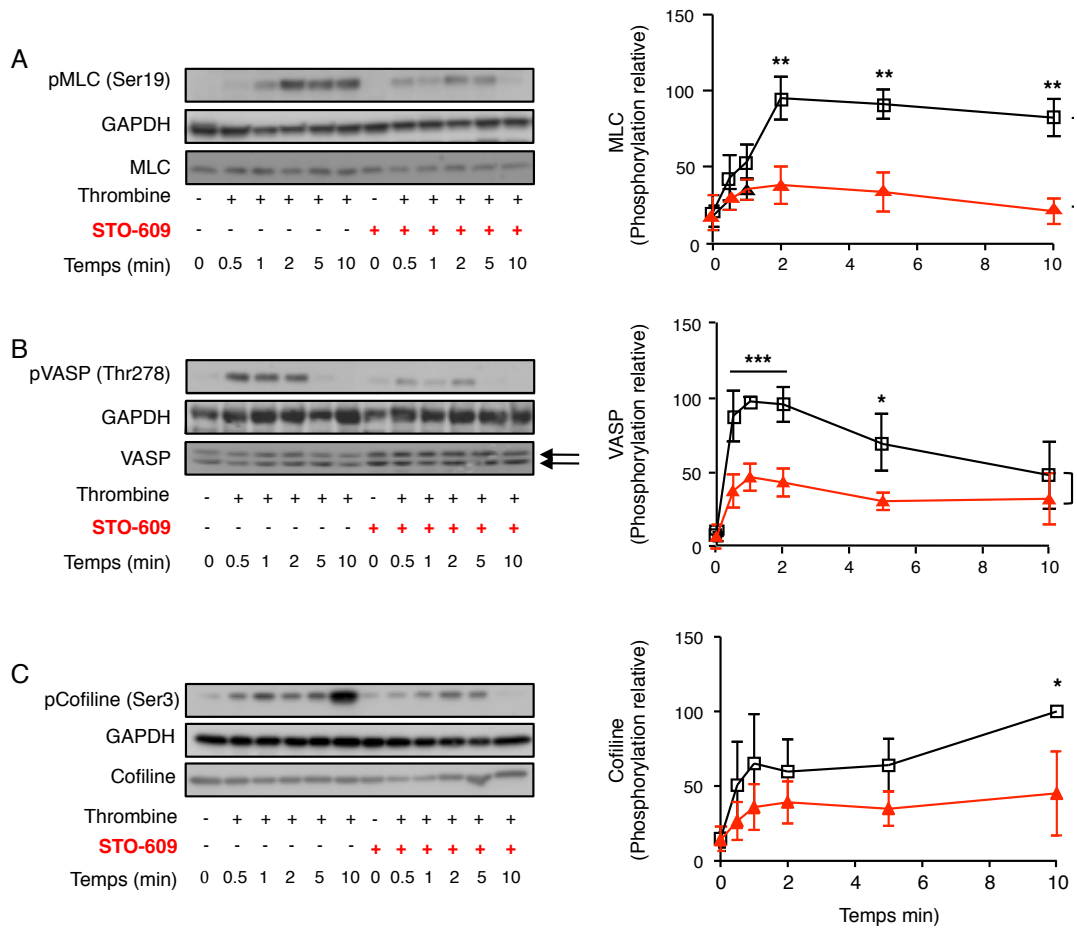


Figure 32. Effet du STO-609 sur la phosphorylation des MLC, de la cofiline et de VASP dans les plaquettes humaines traitées par la thrombine.

Des plaquettes humaines purifiées ont été prétraitées 2 min avec du STO-609 (10 μ M) (Δ) ou non (\square) avant d'être stimulées avec de la thrombine (0,1U/ml). Un Western blot représentatif de la phosphorylation des MLC (A), de la cofiline (B) et de VASP (C) est montré à gauche. Les graphiques à droite correspondent à la moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes. *P < 0.05, **P < 0.01 et ***P < 0.001, valeurs statistiques entre le groupe traité avec le STO-609 ou non.

IV.2.2. Polymérisation des filaments d'actine dans les plaquettes humaines.

En réponse à la thrombine, le cytosquelette d'actine subit un réarrangement drastique dû à son désassemblage presque immédiat suivi d'une stimulation de la polymérisation de l'actine pour assurer la formation de nouveaux filaments.

Afin d'évaluer l'impact d'une inhibition de la voie CamKK β /AMPK α 1 et de la phosphorylation des cibles du cytosquelette sur la polymérisation de l'actine, nous avons mesuré, grâce à une méthode combinant l'ultracentrifugation et le Western Blot, la proportion d'actine filamenteuse (actine-F) et d'actine globulaire (actine-G) présente dans des plaquettes traitées ou non avec du STO-609 (10 μ M, 2 min) avant d'être stimulées avec de la thrombine (0.1U/ml, 5 min). La figure 33A montre que la thrombine stimule la formation de F-actine d'environ 50%. L'inhibition de la voie CaMKK β /AMPK α 1 contrecarre l'augmentation de F-actine induite par la thrombine. La F-actine peut également être détectée par cytométrie de flux, grâce à sa reconnaissance par la phalloïdine couplée au FITC. Les données obtenues en utilisant cette deuxième méthode confirment les résultats précédents (Figure 33B).

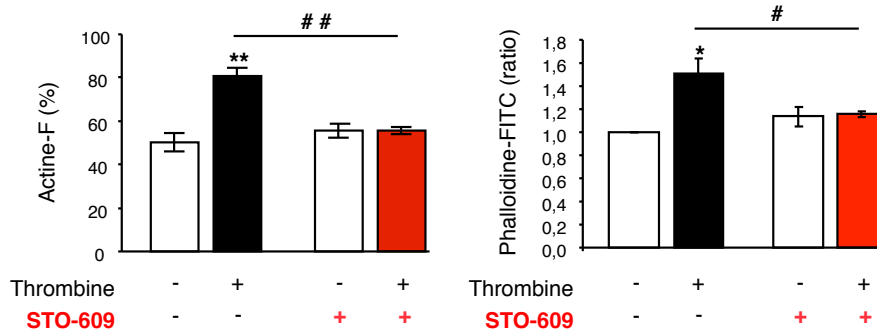


Figure 33. Polymérisation des filaments d'actine dans les plaquettes humaines.

(A) L'actine filamenteuse (F-actine) a été isolée par ultracentrifugation à partir d'un lysat protéique de plaquettes humaines prétraitées ou non avec le STO-609 (10 μ M, 2 min) avant d'être stimulées avec de la thrombine (0.1U/ml, 5 min). La F-actine et la G-actine ont été détectées par Western-blot. La quantification de 4 expériences indépendantes est présentée sous forme de la moyenne des pourcentages d'actine-F obtenus dans chaque condition. (B) L'actine-F a été détectée à l'aide de la phalloïdine (10 μ M) couplée au FITC, et analysée en cytométrie de flux. La quantification correspond à la moyenne \pm SEM des valeurs rapportées à celles correspondant à la quantité de filaments d'actine détectés dans les plaquettes au repos, n=4; *P < 0.05, **P < 0.01 par comparaison aux valeurs contrôles correspondantes; #P < 0.05 et ## P < 0.01 représentent la différence statistique entre la présence ou non du STO-609.

IV.2.3. Phosphorylation de la MLC, de la cofiline et de VASP dans les plaquettes de souris.

Puisque nous avons montré que l'isoforme catalytique AMPK α 1 est le médiateur majeur des effets de la thrombine dans les plaquettes de souris, nous avons étudié la phosphorylation des cibles du cytosquelette dans des plaquettes de souris AMPK α 1-knockout (KO) stimulées par la thrombine. Comme décrit dans les plaquettes humaines, la thrombine induit une augmentation de la phosphorylation des MLC, de la cofiline et de VASP (figure 34A-C). L'absence d'AMPK α 1 réduit fortement l'état de phosphorylation des trois protéines en réponse à la thrombine (0.05U/ml). Ces données permettent de faire la démonstration génétique que l'AMPK α 1 est impliquée dans la régulation de la phosphorylation des cibles du cytosquelette en réponse à la thrombine et corroborent les résultats obtenus avec le STO-609 dans les plaquettes humaines (figure 34A-C).

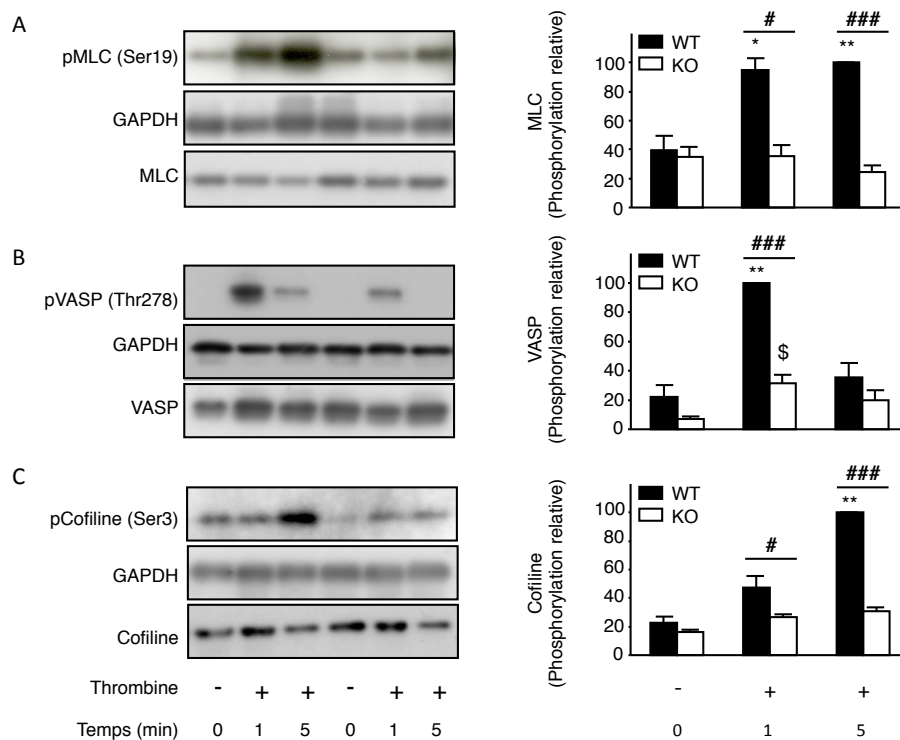


Figure 34. Phosphorylation des MLC, de la cofiline et de VASP dans les plaquettes de souris AMPK α 1-knockout traitées par la thrombine. Des plaquettes de souris WT et KO ont été stimulées avec de la thrombine (0.05U/ml) pendant 1 et 5 min. Un Western blot représentatif de la phosphorylation (A) des MLC, (B) de la cofiline et (C) de VASP est montré dans le panel de gauche. La quantification correspondant à la moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes est présentée dans le panel de droite. *P < 0.05, **P < 0.01 par comparaison aux contrôles WT correspondants ; #P < 0.05 par comparaison aux contrôles KO correspondants ; #P < 0.05 et ### P < 0.001 représentent une différence statistique entre WT et KO.

IV.2.4. Polymérisation des filaments d'actine dans les plaquettes de souris et organisation du cytosquelette en filopodes et lamellipodes.

Comme dans les plaquettes humaines, la diminution de l'état de phosphorylation des cibles du cytosquelette est associée à un défaut de la polymérisation des filaments d'actine dans les plaquettes souris KO (figure 35).

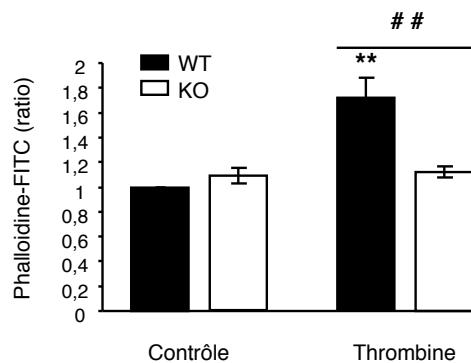
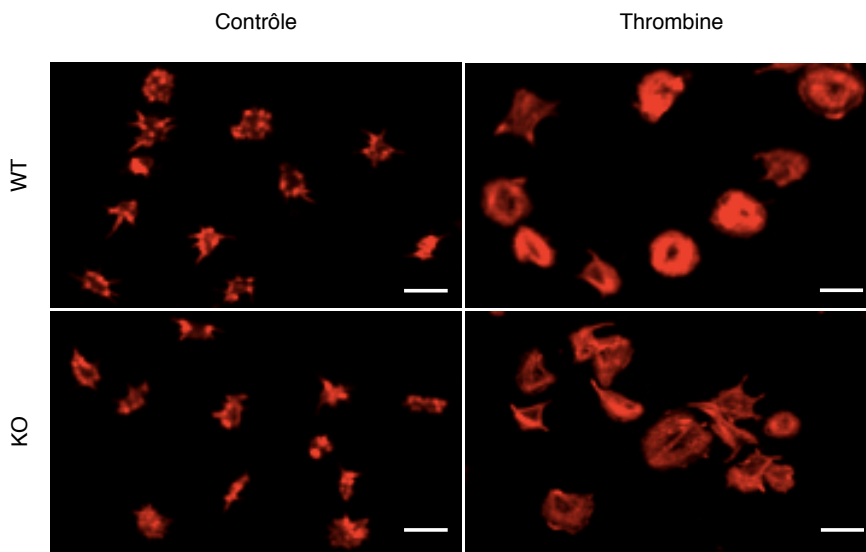


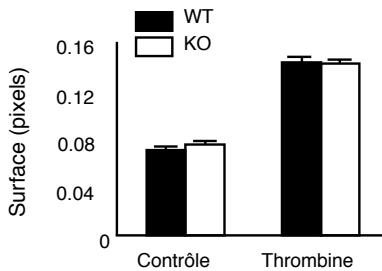
Figure 35. Polymérisation des filaments d'actine dans les plaquettes de souris stimulées par la thrombine. Des plaquettes de souris WT et KO stimulées avec de la thrombine (0.05U/ml, 5 min) ont été incubées avec 10 μ M de phalloïdine couplée au FITC, puis analysées en cytométrie de flux. La quantification correspond à la moyenne \pm SEM des valeurs rapportées à celles correspondant à la quantité de filaments d'actine détectés dans les plaquettes au repos, n=4; **P < 0.01 par comparaison aux valeurs contrôles correspondantes ; ##P < 0.01 représente la différence statistique entre WT et KO.

De façon plus intéressante encore, nous montrons que ce défaut de polymérisation est associé à un défaut de réorganisation du cytosquelette d'actine. Afin d'examiner la formation des filopodes et des lamellipodes, des plaquettes de souris WT et KO ont été déposées, en présence ou en absence de thrombine 0.05U/ml, sur une surface recouverte de fibrinogène pour permettre leur adhésion. Le cytosquelette d'actine est rendu visible grâce à un marquage par la phalloïdine couplée à la rhodamine. Les plaquettes émettent des filopodes avant de développer anneau de lamellipodes en périphérie, caractéristique de la plaquette étalée (figure 36A). Les résultats montrent que, bien que la surface d'étalement soit similaire entre plaquettes WT et KO (Figure 36B), le pourcentage de plaquettes capables de développer des lamellipodes est significativement réduit en absence d'AMPK α 1 (figure 36A et 36C), indiquant une altération claire de l'organisation du cytosquelette dans les plaquettes de souris KO.

A



B



C

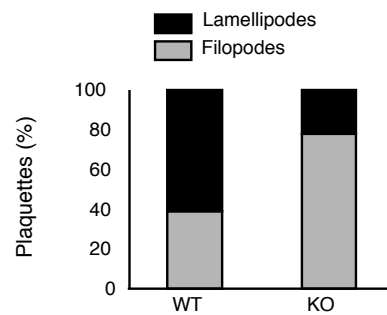


Figure 36. Remodelage du cytosquelette d'actine dans des plaquettes de souris WT et KO au cours de l'adhésion.

Des plaquettes lavées ont été déposées sur une surface de fibrinogène pour permettre leur adhésion pendant 1h, en présence ou en absence de thrombine (0.05U/ml). (A) Les plaquettes ont été fixées, perméabilisées et marquées à la phalloïdine-rhodamine pour visualiser le cytosquelette d'actine. Barre d'échelle : 5µM (B) Quantification informatisée de la surface plaquettaire. (C) Pourcentage de plaquettes présentant des lamellipodes (barre noire) et des filopodes (barre grise). Les histogrammes représentent la moyenne de 250 plaquettes dans 3 expériences indépendantes.

IV.3 Implication de l'AMPK α 1 dans la régulation des processus plaquettaires dépendant du cytosquelette d'actine : la sécrétion, l'agrégation et la rétraction du caillot de fibrine.

Après avoir démontré que l'AMPK α 1 contribuait à la régulation du cytosquelette d'actine, du moins en réponse à la thrombine, il était logique de penser que son inactivation ou son absence pourrait avoir des conséquences majeures sur les processus qui dépendent de la polymérisation, de la contraction et de l'organisation des filaments d'actine.

Dans ce chapitre, nous avons examiné la contribution de l'AMPK α 1 aux processus d'agrégation, de sécrétion et de rétraction du clou plaquettaires.

IV.3.1 L'agrégation et la sécrétion des plaquettes humaines

Le STO-609 inhibe l'agrégation induite par la thrombine (0.03U/ml) (Figure 37).

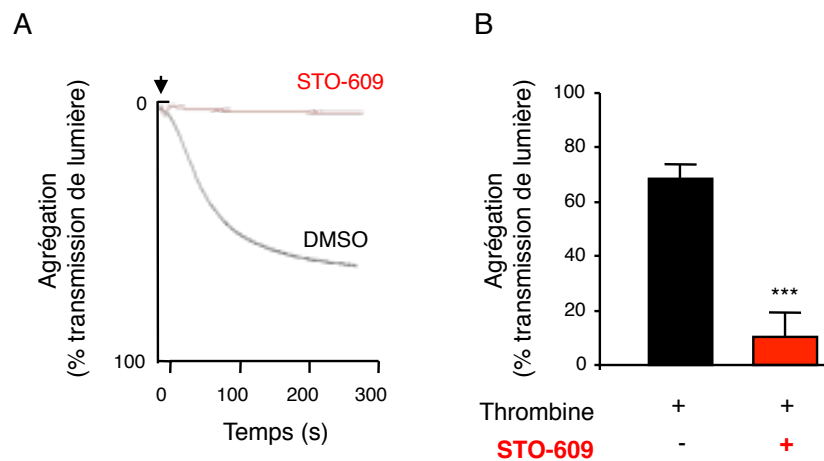


Figure 37. Effet du STO-609 sur l'agrégation des plaquettes humaines. Des plaquettes humaines prétraitées ou non avec du STO-609 (10 μ M, 2 min) ont été stimulées avec de la thrombine (0.03U/ml). Le pourcentage de lumière transmise à travers la solution plaquettaire a été évalué à l'aide d'un agrégomètre (Chrono-Log, STAGO). (A) Tracé d'agrégation représentatif. (B) La quantification correspond à la moyenne \pm SEM de 10 expériences indépendantes, **P < 0.01.

L'activation du récepteur au fibrinogène (GPIIb/IIIa), via un changement de sa conformation, augmente son affinité pour son ligand le fibrinogène, ce qui permet l'agrégation. Cette activation du récepteur peut être évaluée en cytométrie de flux, à l'aide d'un anticorps (PAC-1) qui reconnaît spécifiquement la conformation active. En effet, la liaison de PAC-1 est augmentée en réponse à la thrombine (0.03U/ml, 5 min), ce qui indique l'activation de GPIIb/IIIa à la surface des plaquettes (figure 38). En présence de STO-609, l'activation de GPIIb/IIIa est significativement réduite (figure 38), en accord avec les effets du STO-609 sur les mesures d'agrégation.

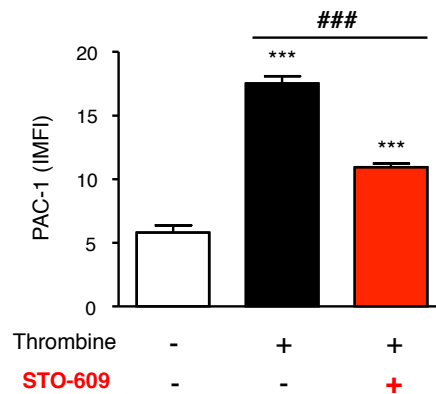


Figure 38. Effet du STO-609 sur l'activation du récepteur au fibrinogène (GPIIb/IIIa) dans les plaquettes humaines.

Des plaquettes humaines purifiées ont été incubées avec l'anticorps PAC1-FITC pendant 30 min à 37°C. Ensuite elles ont été prétraitées avec du STO-609 (10µM, 2 min) avant d'être stimulées avec de la thrombine (0.03U/ml, 5min). La quantification correspond à la moyenne ± SEM de l'intensité de fluorescence (MFI) mesurée en cytométrie de flux dans 5 expériences indépendantes. ***P < 0.001 par comparaison aux valeurs contrôles. ### P < 0.001 représente une différence statistique entre les plaquettes prétraitées ou non avec le STO-609.

Le défaut d'agrégation pourrait résulter d'un défaut de sécrétion des granules. Deux types de granules, les granules α et les granules denses, sont présents dans les plaquettes. La sécrétion des granules α peut être évaluée en cytométrie de flux grâce à la détection de la sélectine CD62-P à la surface plaquettaire. Celle des granules denses est évaluée à l'aide du lumi-agrégomètre qui mesure la quantité d'ATP sécrété via la génération de luminescence. Le STO-609 diminue fortement l'exposition en surface de CD-62P et altère significativement la sécrétion d'ATP en réponse à la thrombine (figure 39A-B).

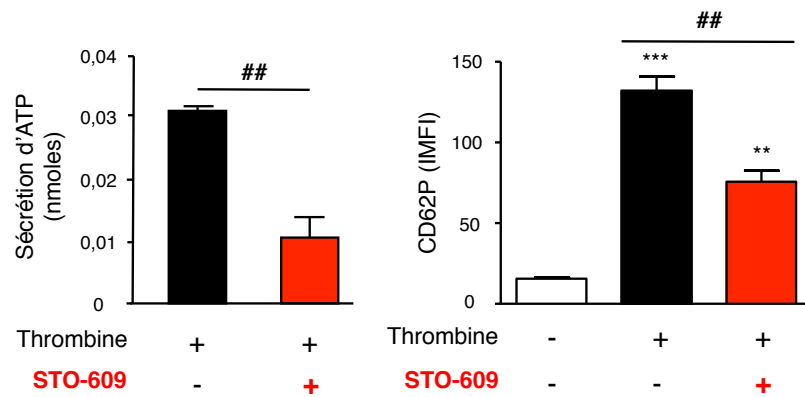


Figure 39. Effet du STO-609 sur la dégranulation des plaquettes humaines.

(A) L'histogramme représente la quantité d'ATP sécrété par les plaquettes prétraitées ou non avec du STO-609 (10 μ M, 2 min) avant d'être stimulées avec de la thrombine (0.03U/ml) pendant 5 min. La quantification correspond à la moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes; ## P < 0.01 représente une différence statistique entre les plaquettes prétraitées ou non avec le STO-609. (B) La sécrétion des granules α est évaluée par cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps anti-CD62P-FITC. La quantification correspond à la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) \pm SEM de 5 expériences indépendantes, **P < 0.01 et ***P < 0.001 par comparaison aux valeurs contrôles. ## P < 0.01 représente une différence statistique entre les plaquettes prétraitées ou non avec le STO-609.

Le TXA₂, le collagène et l'ADP sont également capables d'induire une mobilisation du calcium intracellulaire en se liant à leur GPCR (figure 40), même si la mobilisation de calcium induite par le collagène et l'ADP est environ 2 fois plus faible que celle induite en réponse à la thrombine et au composé U46619 (figure 40). Malgré cette augmentation, ces agonistes n'activent pas l'AMPK de façon significative (figure 23), ce qui indique que la CaMKK β n'est pas activée dans ces conditions. En accord avec ces données, le STO-609 n'affecte ni l'agrégation ni la sécrétion des granules denses en réponse à une stimulation induite par le composé U46619 (0.3 et 1 μ M), le collagène (2.5 et 10 μ g/ml) ou l'ADP (2.5 et 10 μ M) (figure 41A-B).

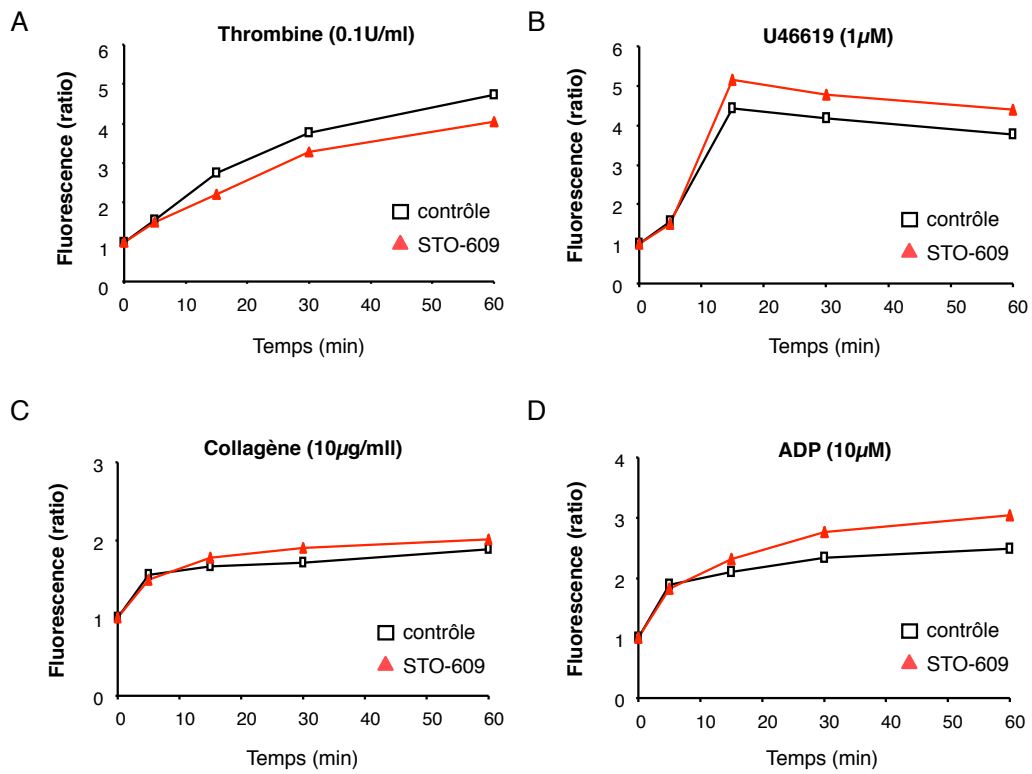
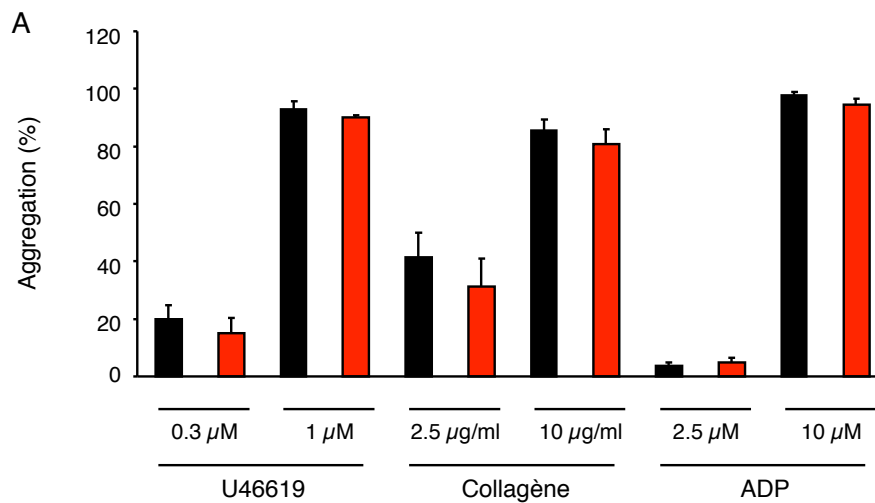


Figure 40. Effet du STO-609 sur la mobilisation du calcium en réponse aux différents agonistes dans les plaquettes humaines.

Des plaquettes humaines purifiées ont été incubées avec du Fluo-3AM (5µM, 30 min, à 37°C). Elles ont ensuite été traitées avec du STO-609 (10µM, 2 min) avant d'être stimulées avec (A) la thrombine, (B) le composé U46619, (C) le collagène ou (D) l'ADP (D). La fluorescence émise a été analysée en cytométrie de flux.



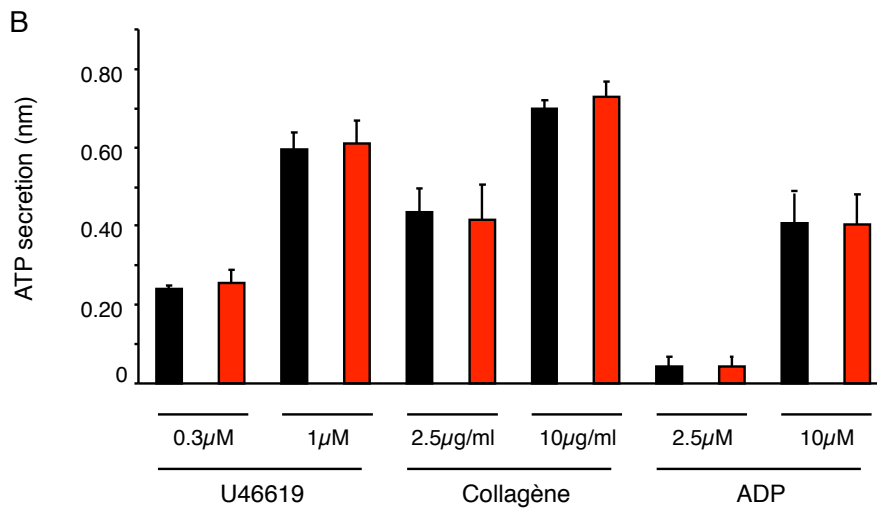


Figure 41. Effet du STO-609 sur l'agrégation et la sécrétion des granules denses induites par le composé U46619, le collagène et l'ADP. Des plaquettes humaines prétraitées ou non avec le STO-609 (10 μ M, 2 min) ont été stimulées avec le composé U46619, le collagène ou l'ADP. (A) La quantification représente le pourcentage de lumière transmise, mesurée à l'aide d'un agrégomètre (Chrono-Log, STAGO). (B) La sécrétion d'ATP a été évaluée par émission de luminescence à l'aide de l'agrégomètre. Les quantifications représentées correspondent à la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes.

Nous avons également vérifié que la préincubation avec le STO-609 n'avait pas d'impact sur la quantité de calcium produite en réponse à la thrombine et aux autres agonistes (figure 40). Le STO-609 n'altère pas non plus la production de TXB2, un métabolite stable du TXA2 (figure 42).

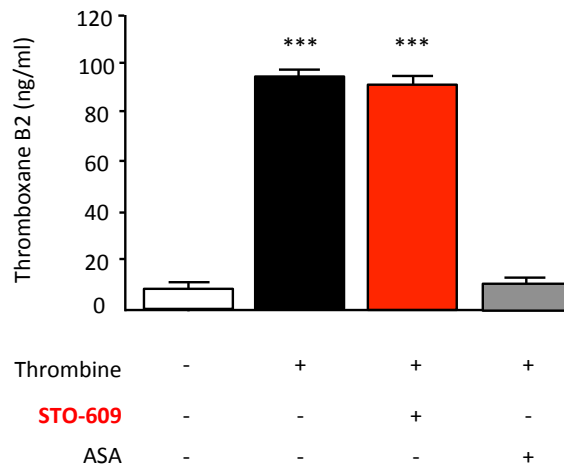


Figure 42. Effet du STO-609 sur la production de TXB2 par les plaquettes humaines stimulées avec de la thrombine.

Des plaquettes humaines prétraitées ou non avec du STO-609 (10 μ M, 2 min) ou de l'ASA (aspirine) (1 mM) ont été stimulées avec de la thrombine (0.1U/ml). La quantification représentée correspond à la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes ; ***P < 0.001 par comparaison aux valeurs contrôles.

IV.3.2 L'agrégation et la sécrétion des plaquettes de souris.

Dans les plaquettes de souris, les deux isoformes catalytiques de l'AMPK sont présents (figure 20). La phosphorylation de l'ACC est augmentée non seulement en réponse à la thrombine, mais aussi après une stimulation par le composé U46619 et le collagène (figure 24). L'isoforme α 1 est l'isoforme majeur impliqué dans la réponse à ces agonistes (figure 25). Nous avons donc étudié les conséquences de l'absence de cet isoforme sur l'agrégation et la sécrétion des plaquettes de souris. Les plaquettes KO ont un défaut d'agrégation sévère en réponse à la thrombine (0.05U/ml) (figure 43A-B). L'exposition de GpIIb/IIIa en surface, mise en évidence par cytométrie de flux grâce à l'utilisation d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la conformation active du récepteur dans les plaquettes de souris (JON/A)

(figure 43C), ainsi que la sécrétion des granules α et des granules denses (figure 43D-E) sont des processus également affectés par l'absence d'AMPK α 1.

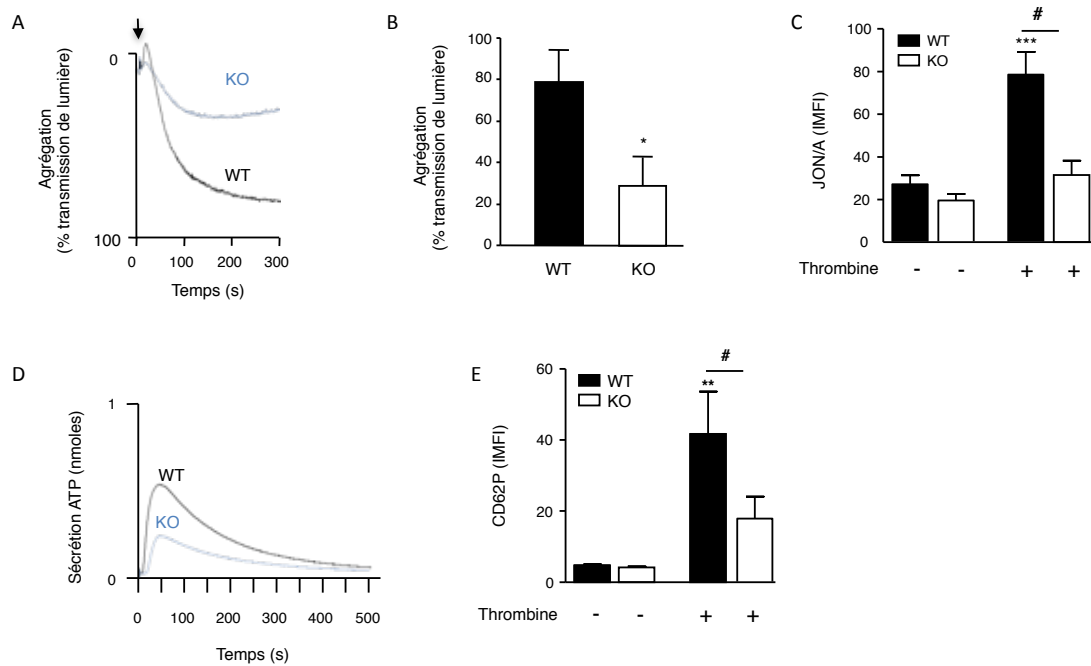


Figure 43. Aggrégation et sécrétion des plaquettes de souris WT et KO en réponse à la thrombine.

Des plaquettes de souris WT et KO ont été stimulées avec de la thrombine (0.05U/ml). (A) Tracé d'agrégation représentatif (B) Quantification de l'agrégation exprimée en pourcentage de lumière transmise. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes; #P < 0.05 représente une différence statistique entre plaquettes WT et KO. (C) Des plaquettes de souris WT et KO ont été incubées avec l'anticorps JON/A-FITC pendant 30 min à 37°C avant d'être stimulées avec de la thrombine. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de l'intensité de fluorescence (MFI) mesurée en cytométrie de flux et correspondent à 5 expériences indépendantes; ***P < 0.001 par comparaison aux valeurs contrôles; #P < 0.05 représente une différence statistique entre plaquettes de souris WT et KO. (D) La sécrétion de granules denses a été mesurée avec le kit ChronoLume à l'aide d'un agrégomètre. (E) La sécrétion des granules α évaluée en condition statique par cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps anti-CD62P-FITC. L'histogramme représente la moyenne \pm SEM de l'intensité de fluorescence (MFI). **P < 0.01 par comparaison aux valeurs contrôles; #P < 0.05 représente une différence statistique entre les plaquettes de souris WT et KO.

L'agrégation induite par le composé U46619 et le collagène est légèrement diminuée dans les plaquettes de souris KO, par comparaison aux plaquettes WT (Figure 44A). De façon surprenante, elle n'est pas associée à une diminution de la détection de GpIIb/IIIa en surface (Figure 45A). La mesure en surface de CD-62P ne montre pas non plus de différence dans la sécrétion des granules α entre plaquettes WT et KO (Figure 45B). Une explication probable est que la sécrétion des granules α qui conduit à l'exposition de CD-62P à la surface plaquettaire est un processus qui est évalué dans une suspension statique de plaquettes, ici traitées par le composé U46619 (5 μ M) ou le collagène (2.5 μ g/ml). Il est reconnu que les processus sécrétoires ne sont pas suffisamment stimulés dans ces conditions expérimentales, ce qui rend probablement difficile la mise en évidence d'une différence entre plaquettes WT et KO. L'agitation des plaquettes, nécessaire pour évaluer l'agrégation plaquettaire, stimule de façon significative les processus sécrétoires. Comme la sécrétion des granules denses (évaluées par la sécrétion d'ATP) peut être mesurée parallèlement à l'agrégation, ces données permettent de démontrer que la sécrétion des plaquettes KO est en effet légèrement affectée en réponse au composé U46619 et au collagène (Figure 44B).

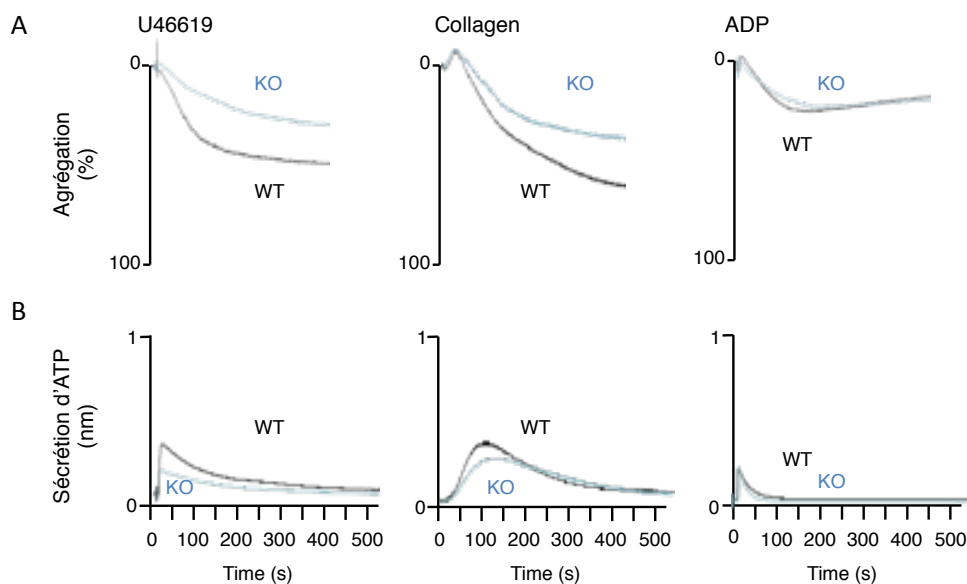


Figure 44. Agrégation et sécrétion d'ATP des plaquettes de souris WT et KO en réponse aux agonistes plaquettaires.

Des plaquettes de souris WT et KO ont été stimulées avec de la thrombine (0.05U/ml), l'U466119 (5 μ M), le collagène (2.5 μ g/ml) et de l'ADP (10 μ M). (A) Tracés représentatifs d'agrégation. (B) Sécrétion d'ATP mesurée avec le kit ChronoLume, à l'aide d'un agrégomètre.

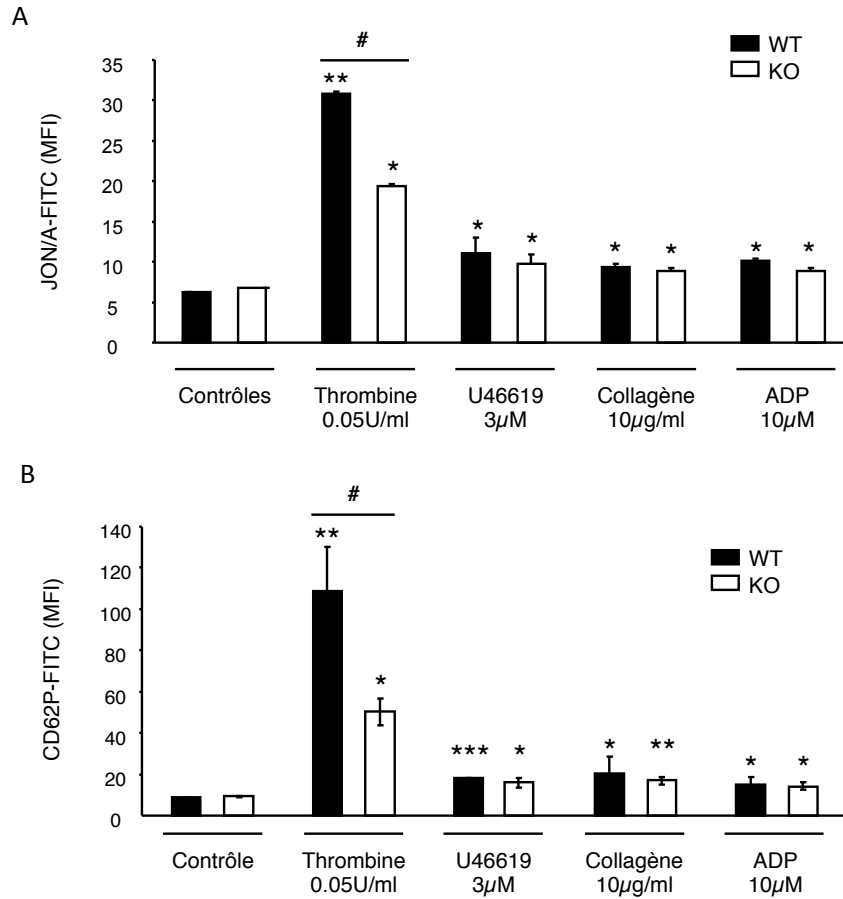


Figure 45. Activation du GPIIb/IIIa et sécrétion des granules α des plaquettes de souris WT et KO en réponse aux agonistes plaquettaires.

(A) Des plaquettes de souris WT et KO ont été incubées avec l'anticorps JON/A-FITC ou anti-CD62P-FITC pendant 30 min à 37°C avant d'être stimulées avec différents agonistes. (A) Pour JON/A, les résultats représentent la moyenne \pm SEM de l'intensité de fluorescence (MFI) mesurée en cytométrie de flux et correspondent à 5 expériences indépendantes; *P < 0.05 et **P < 0.01 par comparaison aux valeurs contrôles; #P < 0.05 représente une différence statistique entre plaquettes de souris WT et KO. (B) Pour CD62P, l'histogramme représente la moyenne \pm SEM de l'intensité de fluorescence (MFI). *P < 0.05, **P < 0.01 et ***P < 0.001 par comparaison aux valeurs contrôles ; #P < 0.05 représente une différence statistique entre les plaquettes de souris WT et KO.

IV.3.3. La rétraction du clou plaquettaire

La phosphorylation des MLC permet la contraction des filaments d'acto-myosine. En plus de son rôle central dans le changement de forme, la dégranulation et l'agrégation, la contraction plus tardive du cytosquelette d'actine stimule la rétraction du caillot de fibrine et la formation du clou plaquettaire. Nous avons également examiné l'impact d'une absence de l'AMPK α 1 dans les plaquettes sur ce processus (figure 46).

Une suspension de plaquettes de souris WT et KO a été stimulée par la thrombine (1U/ml) et la rétraction du thrombus a été observée durant 1h. L'aire du thrombus formé a été mesurée sur photographie. Les résultats présentés à la figure 24 montrent que la rétraction du clou plaquettaire est ralentie dans les plaquettes de souris KO, par rapport aux plaquettes WT.

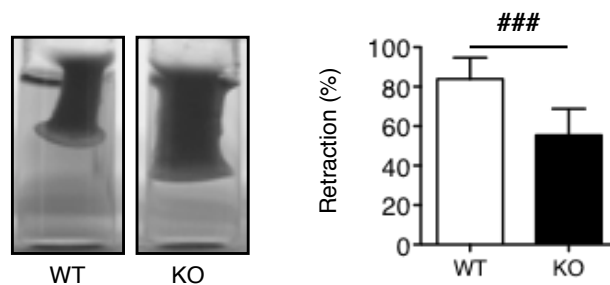


Figure 46. Rétraction du clou plaquettaire.

Des plaquettes de souris WT et KO ont été stimulées avec de la thrombine (1U/ml) et la formation du caillot a été photographiée après 1h de stimulation. Le panel de gauche montre une photographie représentative de la rétraction du clou plaquettaire. Dans le panel de droite, l'histogramme représente la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes ; ###P < 0.001 représente une différence statistique entre les plaquettes de souris WT et KO.

IV.4. Partie I : Conclusion

L'AMPK est un senseur énergétique. Un de ses substrats majeurs est l'ACC, impliquée dans la synthèse et l'oxydation des acides gras. Cette protéine est présente dans les plaquettes. Par contre, son rôle, et plus globalement le rôle du métabolisme des lipides, dans le contrôle de la fonction plaquettaire ont été très peu étudiés. De façon intéressante, le rôle de l'AMPK s'étend au-delà du contrôle de l'homéostasie métabolique. Dans certains modèles cellulaires, elle est impliquée dans la contraction, le remodelage et la polymérisation du cytosquelette d'actine, via l'augmentation de la phosphorylation des MLC, de la cofiline et de la protéine VASP. Or, la régulation du cytosquelette d'actine est un élément clé qui contribue à l'adhésion, l'activation, l'agrégation plaquettaires et la stabilisation du thrombus via la rétraction du caillot de fibrine. Nos résultats montrent que la thrombine, un puissant agoniste des plaquettes, conduit à l'activation de l'AMPK α 1 dans les plaquettes humaines et aussi à la phosphorylation de ses cibles (ACC, MLC, cofiline et VASP). Nous avons alors émis l'hypothèse que l'AMPK pourrait participer au contrôle des fonctions plaquettaires en régulant l'organisation et la contraction du cytosquelette d'actine. En effet, l'inhibition de l'AMPK α 1 par une approche pharmacologique (dans les plaquettes humaines) ou génétique (dans les plaquettes murines) altère la phosphorylation des cibles, la polymérisation de l'actine et son organisation en lamellipodes au cours du processus d'adhésion. Elle altère aussi la sécrétion et l'agrégation des plaquettes en suspension, stimulées par la thrombine. Enfin, l'absence d'AMPK α 1 dans les plaquettes ralentit et diminue la formation du clou plaquettaire. Ces données soutiennent l'hypothèse d'une contribution cruciale de la signalisation AMPK dans le contrôle de la fonction plaquettaire.

De façon très intéressante, nos résultats mettent également en évidence une action spécifique de la thrombine sur l'activation de l'AMPK et donc sur la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes humaines. Cette observation a constitué la base d'une recherche plus translationnelle, menée dans la deuxième partie de ce travail. Nous y avons examiné l'hypothèse que l'état de phosphorylation de l'ACC, lié à l'activation de l'AMPK, pourrait servir de témoin de l'activation des plaquettes par la thrombine chez le patient hémorragique ayant subi une chirurgie lourde, de type cardiaque.

Ces travaux sont présentés dans le chapitre suivant et font actuellement l'objet d'une demande de brevet (WO 2013 076157).

PARTIE 2 : La phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes humaines peut être le reflet de l'activité de la thrombine *in vivo* : « PROOF OF CONCEPT».

V.1. Etude de faisabilité sur 6 patients

En accord avec les données obtenues *ex vivo*, la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes humaines est également détectable *in vivo*, notamment au cours de circonstances cliniques où on assiste à une activation importante de la cascade de coagulation (et donc à une production importante de thrombine), comme en situation post-opératoire d'une chirurgie majeure (figure 47).

Pour démontrer ce concept, une étude préliminaire a été menée sur 6 patients recrutés dans le département de chirurgie cardiovasculaire des Cliniques Universitaires Saint-Luc pour y subir une chirurgie cardiaque. Un prélèvement sanguin a eu lieu pendant la chirurgie, après injection de l'héparine (« Unfractionated Heparin », UFH) et sous circulation extra-corporelle (CEC). Un deuxième prélèvement a été réalisé 4h après l'admission du patient aux soins intensifs cardiaques et vérification de la correction complète des paramètres de l'hémostase (Activated clotting Time, ACT ; activated Partial Thromboplastin Time, aPTT; Thrombin Time, TT). Les plaquettes ont été lavées et lysées. La phosphorylation de l'ACC a été analysée par Western blot. Ce protocole nous a donné l'unique opportunité d'évaluer la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes d'un même patient soumis à deux conditions extrêmes en terme de génération de thrombine : sous CEC (en présence d'héparine) et en situation post-opératoire (après la restauration d'une coagulation « normale »).

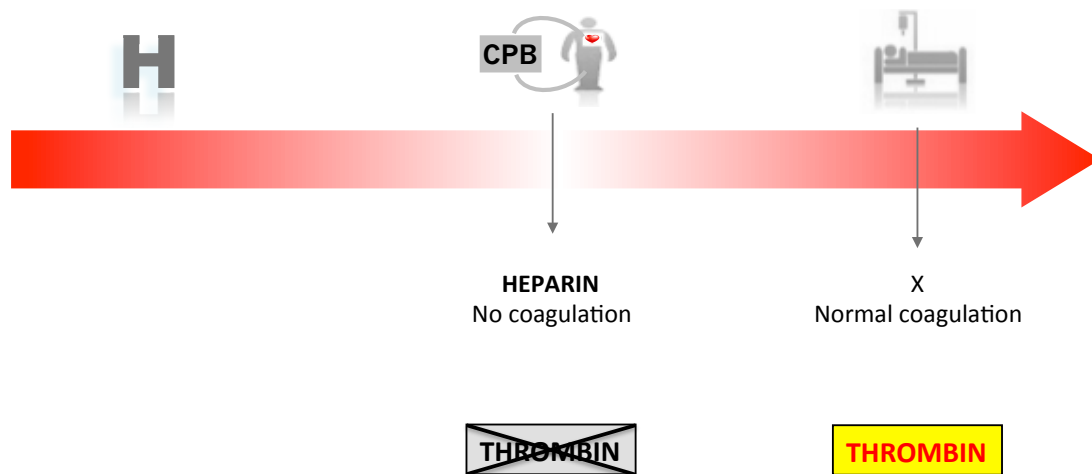


Figure 47. Mode opératoire de l'étude clinique.
 Des prélèvements de sang ont été effectués durant la circulation extracorporelle (CEC), sous héparine qui ne permet pas de production de thrombine. Un deuxième a été effectué en situation post-opératoire (Postop) 4h après le retour du patient aux soins intensifs, lorsque les paramètres de l'hémostase sont revenus à des valeurs normales avec production de thrombine.

Nos résultats montrent qu'une différence drastique de la phosphorylation de l'ACC est observée entre ces deux types de patients : un traitement antithrombotique diminue significativement la phosphorylation de l'ACC (figure 48).

Par ailleurs, une corrélation a pu être établie entre la sévérité de l'hémorragie post-opératoire (caractérisée par le volume de sang recueilli dans les drains) et l'incrément de phosphorylation de l'ACC en Post-op par rapport à la situation CEC (figure 49). Le point marqué d'une flèche représente un patient dont la coagulation était anormale lors de son retour aux soins intensifs, ce qui explique un saignement important avant correction de sa coagulation.

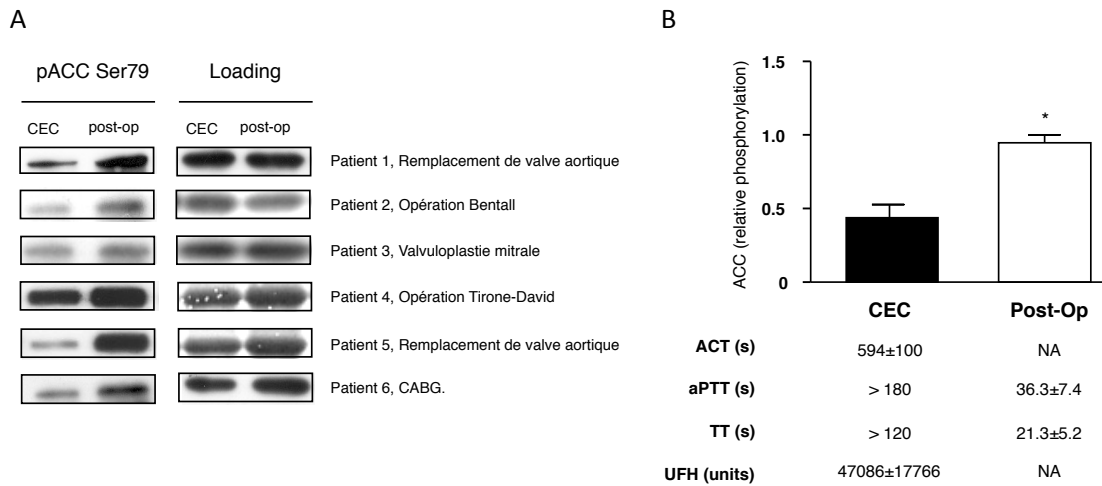


Figure 49. Phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes des 6 patients (CEC vs Post-op). Des prélèvements de sang ont été effectués sur 6 patients hospitalisés aux soins intensifs en vue de subir une chirurgie cardiaque. Un prélèvement a eu lieu durant la circulation extracorporelle (CEC), sous héparine. Un deuxième a été effectué en situation post-opératoire (Postop) 4h après la chirurgie, et après vérification de la récupération des paramètres de l'hémostase (ACT : activated coagulation time; aPTT: activated partial thromboplastin time; TT: Thrombin time; UFH: Unfractionated heparin) . (A) Les plaquettes ont été isolées, lysées et analysées en Western blot avec un anticorps anti-phosphoACC (Ser79). (B) La quantification des données représente la moyenne ± SEM des valeurs de densitométrie obtenues après normalisation sur le niveau d'expression de la GAPDH (contrôle loading). *p<0.05, par comparaison aux valeurs en CEC.

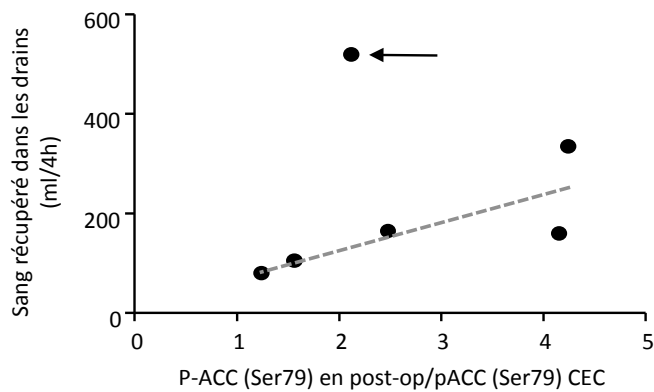


Figure 49. Corrélation entre l'augmentation de la phosphorylation de l'ACC et le saignement post-opératoire.

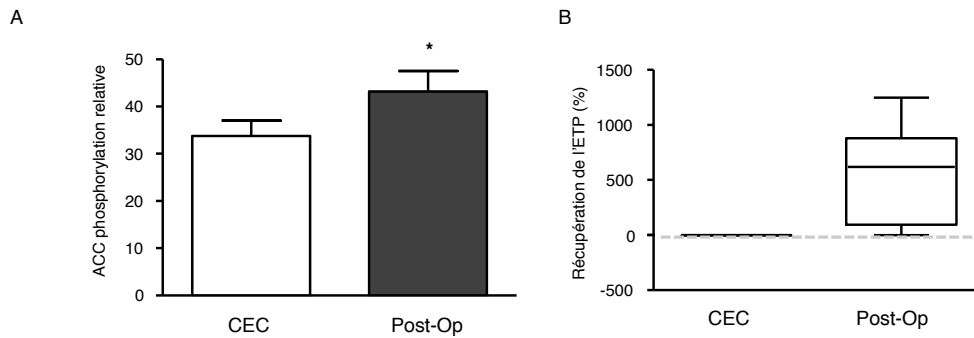
L'hémorragie post-opératoire correspond au volume de sang récupéré dans les drains du patient au cours des 4 premières heures de son séjour aux soins intensifs après son opération. L'incrément de P-ACC résulte du rapport entre la valeur en Post-op et la valeur en CEC.

V.2 Etude clinique sur 29 patients

Dans le but de confirmer nos données préliminaires, un protocole amélioré a été appliqué à un nombre plus important de patients. Aucun des patients recrutés dans cette étude n'a reçu de traitement antiplaquettaire (aspirine ou autres) au moins cinq jours avant l'opération. Les patients ayant souffert d'un infarctus du myocarde ou d'un accident thrombotique dans une période de six mois précédant la chirurgie et les patients diabétiques ont également été exclus.

Un premier prélèvement de sang a été réalisé avant tout geste chirurgical (basal), un second pendant la CEC et un troisième, 4h après la chirurgie et le retour aux soins intensifs (coagulation « normale »). Les plaquettes ont été isolées et l'état de phosphorylation de l'ACC a été analysé en Western blot dans ces trois conditions. En plus des paramètres classiques de la coagulation (ACT, aPTT, TT, UFH), une estimation de la capacité des patients à générer de la thrombine a été réalisée (mesure de l'« ETP » ou du potential thrombinique endogène) en basal, CEC et Post-op, grâce à un test basé sur le clivage d'un substrat fluorogénique et réalisé à partir du plasma du patient.

En accord avec l'étude précédente, les résultats confirment que la phosphorylation de l'ACC augmente en situation post-opératoire (Figure 50A). Cette augmentation est associée à une récupération des valeurs d'ETP, par comparaison à la situation en CEC (Figure 50B).



Heparin UFH (UI) 47025

Drain (ml blood) 336

Figure 50. Phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes des 29 patients (Basal, CEC, Post-op). Des prélèvements de sang ont été effectués sur 29 patients hospitalisés aux soins intensifs en vue de subir une chirurgie cardiaque. Un prélèvement a eu lieu en basal, avant tout geste chirurgical, un deuxième durant la CEC, sous héparine et un troisième en situation post-opératoire (Postop) 4 h après la chirurgie, et après vérification de la récupération des paramètres de l'hémostase (ACT : activated coagulation time; aPTT: activated partial thromboplastin time; TT: Thrombin time; UFH: Unfractionated heparin). (A) Les plaquettes ont été isolées, lysées et analysées en Western blot avec un anticorps anti-phosphoACC (Ser79). (B) L'ETP a été déterminé à partir du plasma des patients grâce à un essai basé sur l'utilisation d'un substrat fluorogénique. L'histogramme représente la moyenne \pm SD des valeurs d'ETP en CEC et Post-op.

L'importante hétérogénéité qui est mise en évidence pour les valeurs d'ETP en Post-op reflète la capacité aléatoire des patients à pouvoir re-générer de la thrombine après une CEC. Nous avons dès lors examiné la phosphorylation de l'ACC dans deux groupes de patients extrêmes, ceux récupérant plus de 80% de leur ETP basal versus ceux n'en récupérant que moins de 20%. La phosphorylation de l'ACC est significativement plus élevée dans les plaquettes de patients ayant préservé une capacité quasi intacte à générer de la thrombine (figure (51)).

Ces données soutiennent clairement la notion que l'état de phosphorylation de l'ACC pourrait être le témoin non seulement de la génération de thrombine in vivo mais aussi de la réponse plaquettaire à la thrombine.

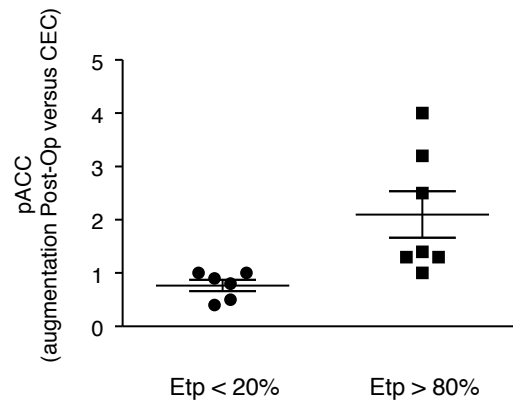


Figure 51. Incrément de phosphorylation d'ACC dans les plaquettes de patients ayant conservé une capacité à générer de la thrombine. La phosphorylation de l'ACC a été évaluée dans deux groupes extrêmes : ETP <20% représente le groupe de patients n'ayant pas ou peu récupéré leur capacité à produire de la thrombine (ETP en post-op versus ETP en basal) ; ETP >80% représente le groupe de patients ayant récupéré quasi la totalité de leur capacité à produire de la thrombine; *P < 0.05.

Dans le but de confirmer et/ou de renforcer les données déjà acquises, une trentaine de patients supplémentaires devant subir une chirurgie cardiaque ont été recrutés dans le département de chirurgie cardiovasculaire des Cliniques Universitaires Saint-Luc. La phosphorylation de l'ACC plaquettaire (basal, CBP, post-op) sera analysée chez chacun de ces patients. En collaboration avec le laboratoire d'hémostase (Dr Stéphane Eeckhout, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Bruxelles), une étude de la coagulation (thromboélastogramme, Rotem) et de la réponse plaquettaire aux agonistes (Multiplate) sera réalisée. La génération de thrombine sera également caractérisée par la mesure de l'ETP et des Fragments 1+2 produits par le clivage de la pro-thrombine par le facteur Xa.

V.3 Partie 2 : Conclusion

L'ensemble des données cliniques obtenues à ce stade de notre étude soutient l'hypothèse que l'ACC phosphorylée pourrait être un nouveau biomarqueur permettant l'évaluation simultanée de la coagulation sanguine et de l'activation plaquettaire chez le patient.

Aux soins intensifs cardiaques, la coagulation et la fonction plaquettaire des patients qui présentent des complications hémorragiques post-chirurgicales est actuellement évaluée à l'aide de mesures standardisées sur Rotem® et Analyseur Multiplate®, respectivement. Ces outils fournissent des informations indispensables à la prise de décision thérapeutique des médecins qui doivent déterminer rapidement la cause de l'hémorragie et discriminer un défaut d'hémostase chirurgical d'un défaut de la coagulation ou de la fonction plaquettaire.

Ces tests sont cependant réalisés *ex vivo*, sur le plasma et les plaquettes isolées des patients et le résultat obtenu ne reflète pas de façon systématique la situation réelle dans la circulation du patient. L'évaluation de la phosphorylation de l'ACC des plaquettes pourrait, en un seul test, constituer un indicateur *in vivo* de la capacité qu'a le patient à produire de la thrombine et à y répondre en terme d'activation plaquettaire (figure 52).

Jusqu'à présent, nous avons utilisé la technique du Western blot pour évaluer la phosphorylation de l'ACC dans les extraits protéiques plaquettaires. La durée de cette méthodologie (24-48h) et son aspect semi-quantitatif sont deux limitations importantes qui ne sont pas en faveur de son utilisation dans un contexte clinique.

D'autres méthodes alternatives comme la cytométrie de flux seront examinées dans le futur au laboratoire.

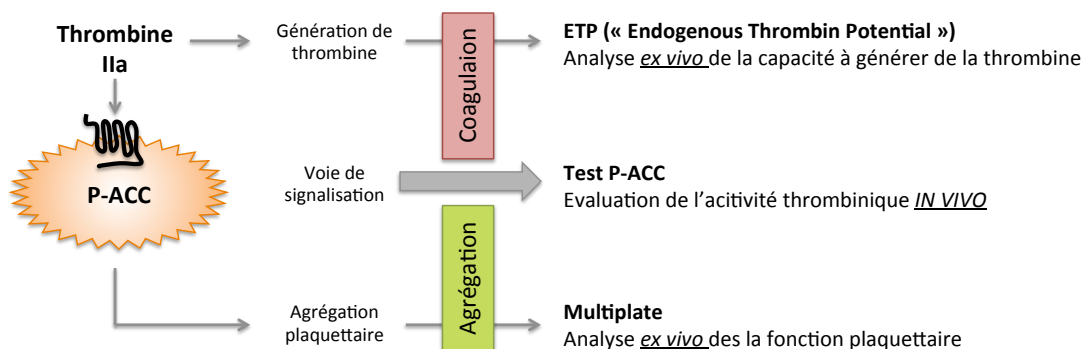


Figure 52. Synthèse de l'utilisation de la pACC comme un marqueur de l'activation plaquettaire et de la coagulation *in vivo* chez le patient.

DISCUSSION

VI. DISCUSSION

L'hémostase primaire est initiée par l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale, un phénomène qui conduit à leur activation et stimule un grand nombre de voies de signalisation [257]. La mobilisation de calcium à partir des réserves intracellulaires constitue un des événements les plus précoces de l'activation plaquettaire. Le complexe qu'il forme avec la calmoduline peut lier de nombreuses protéines et stimuler leur activité. La MLCK est une de ses cibles. La phosphorylation des MLC contribue au réarrangement du cytosquelette d'actine qui sous-tend le changement de forme drastique que subissent les plaquettes tout au long du processus d'activation.

La CamKK β est une autre protéine stimulée par le complexe calcium/calmoduline. Une fois active, elle phosphoryle et active l'AMPK, un protéine kinase généralement décrite comme un senseur énergétique dont l'activité peut être stimulée de façon allostérique par sa liaison à l'AMP.

A l'époque où nous avons entamé cette étude, peu d'information était disponible sur le rôle de la signalisation AMPK dans le contrôle de la fonction plaquettaire. Une étude publiée en 2003 avait démontré une activation de la NOS endothéliale (eNOS) par l'AMPK en réponse à l'insuline [252]. Ce paradigme a été récemment corroboré par l'équipe de Liu et al, clamant que les activateurs de l'AMPK exercent une action anti-agrégante via l'activation de eNOS et la production de cGMP [258]. Néanmoins, la présence de eNOS ou de la NOS inducible (iNOS) dans les plaquettes est un sujet controversé. En effet, des résultats contradictoires ont été obtenus en 2008 par Gambaryan et al qui démontrent, à l'aide de plaquettes humaines purifiées ou isolées de souris NOS-knockout, que ces protéines ne sont présentes ni dans les plaquettes humaines, ni dans les plaquettes de souris [253].

Nous avons utilisé la même approche expérimentale que Gambaryan et al (plaquettes humaines purifiées ou isolées de souris AMPK-knockout) pour examiner le rôle de l'AMPK dans le contrôle de la fonction plaquettaire. Cette approche nous a permis de mettre en évidence la présence de la CamKK β et de l'AMPK α 1 dans les plaquettes humaines. Nous avons également démontré que l'inhibition ou l'absence de cette signalisation dans les

plaquettes humaines et murines, est associée à une altération de la polymérisation et de l'organisation du cytosquelette d'actine, et par conséquent à une dysfonction des processus dépendant du cytosquelette comme la sécrétion des granules, l'agrégation et la rétraction du clou plaquettaire.

Expression des isoformes catalytiques de l'AMPK dans les plaquettes.

La nature de l'isoforme catalytique de l'AMPK présent dans les plaquettes humaines est également un sujet de controverse. Nos résultats démontrent que seul l'isoforme $\alpha 1$ de l'AMPK est présent dans les plaquettes humaines. Ces données sont en contradiction avec une étude publiée au cours de la réalisation de cette thèse, clamant que c'est la phosphorylation de l'isoforme $\alpha 2$ de l'AMPK qui joue un rôle prépondérant dans les plaquettes humaines et murines, en stimulant la phosphorylation de la kinase Fyn [259]. Les auteurs démontrent que l'absence d'AMPK $\alpha 2$ dans les plaquettes murines est associée à une diminution de la phosphorylation de Fyn et par conséquent, une diminution de la phosphorylation de son substrat, la chaîne $\beta 3$ de l'intégrine GPIIb/IIIa, ce qui affecte la stabilité du clou plaquettaire [259]. Nous ne pouvons évidemment pas exclure que les deux isoformes catalytiques de l'AMPK ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) contribuent à la fonction des plaquettes de souris, en phosphorylant des cibles différentes. Cependant, seul l'isoforme $\alpha 1$ de l'AMPK a été détecté dans des plaquettes humaines purifiées en suivant le protocole de préparation Optiprep®. La sous-unité $\alpha 1$ est d'ailleurs aussi l'isoforme prédominante dans d'autres cellules hématopoïétiques comme les globules rouges [260], les lymphocytes [261] ou les macrophages [262]. Par ailleurs, nos résultats sont confortés par une étude transcriptomique récente visant à identifier les ARN messagers présents dans les plaquettes humaines et murines. En accord avec nos données, alors que les ARN messagers AMPK $\alpha 1$ et AMPK $\alpha 2$ sont détectés dans les plaquettes de souris, seul l'ARN messager correspondant à l'isoforme $\alpha 1$ est présent dans les plaquettes humaines [132]. Cette observation soutient le concept mis en évidence par nos résultats, que les événements de signalisation observés dans les plaquettes de souris peuvent être différents de ceux mis en évidence dans les plaquettes humaines.

Activation de l'AMPK dans les plaquettes : rôle de la CamKK β et spécificité du signal.

Une autre différence importante entre plaquettes humaines et murines concerne la nature des récepteurs de la thrombine présents à la surface membranaire. Dans les plaquettes humaines, la réponse induite par la thrombine implique les récepteurs PAR1 et PAR4. Cependant, nous avons observé que la concentration du peptide activateur spécifique de PAR4 nécessaire pour induire phosphorylation maximale de l'ACC est 1000 fois supérieure à celle de PAR1. Ces données confirment que PAR1 est le récepteur principalement responsable des effets de la thrombine dans les plaquettes humaines [263]. Les plaquettes de souris n'expriment pas PAR1, mais PAR4 et PAR3. Ce dernier agissant plutôt comme un co-facteur de PAR4 et n'induisant pas son propre signal en réponse à la thrombine (Nakanishi-Marsui et al, 2000), PAR4 devient le principal récepteur de la thrombine dans les plaquettes de souris. Les plaquettes de souris PAR4-knockout ne sont d'ailleurs pas capables de répondre à la thrombine, malgré la présence de PAR3 [264]. Cette différence dans la nature des récepteurs PAR présents à la surface des plaquettes humaines et murines pourrait expliquer la spécificité des effets de la thrombine dans les plaquettes humaines. En effet, il est important de noter que, bien que la plupart des récepteurs plaquettaire (PAR, Tp, P2Y) soient couplés à des protéines G similaires, ils n'induisent pas nécessairement des signalisations identiques. Leur activation entraîne le recrutement et l'activation spatio-temporelle de complexes multiprotéiques spécifiques. Les radeaux lipidiques (« lipid rafts ») jouent un rôle crucial dans ce contexte [265, 266]. Ils servent de plateformes de signalisation recrutant certaines protéines alors que d'autres en sont exclues. Leur rôle dans la signalisation induite par la thrombine a déjà été démontré [265] et pourrait expliquer, au moins en partie, pourquoi le composé U46619, malgré le fait qu'il induise une augmentation de calcium similaire à celle induite par la thrombine, n'entraîne pas l'activation de la voie CaMKK β /AMPK. D'autre part, bien que la concentration en calcium soit un facteur déterminant dans la stimulation de la CaMKK β , celle-ci pourrait être régulée par des mécanismes indépendants du calcium, impliquant par exemple un changement de son état de phosphorylation [233]. Il serait certainement intéressant d'investiguer la phosphorylation de la CaMKK β en réponse aux différents agonistes plaquettaire, et surtout l'impact de cette phosphorylation potentielle sur l'activité de la kinase.

Dans ce travail, l'implication de la CaMKK β dans l'activation de l'AMPK induite par la thrombine a été démontrée de façon pharmacologique, grâce à l'utilisation d'un inhibiteur spécifique. Une fois encore, ces résultats sont en contradiction avec l'étude de Randriamboavonjy et al qui concluent que c'est LKB1 qui est responsable de l'activation de l'AMPK dans les plaquettes stimulées par la thrombine. Pour démontrer l'activation de LKB1, les auteurs examinent sa phosphorylation sur le site Thr189. Cependant, aucun site de phosphorylation n'est actuellement reconnu comme pouvant servir de « read-out » de l'activité LKB1. Elle est décrite comme une enzyme constitutivement active dont l'activité est tributaire de la présence de deux partenaires avec lesquels elle forme un complexe : STRAD2 et MO25. Nous avons mesuré, dans les plaquettes humaines, l'activité de ce complexe 1après co-immunoprécipitation. Nos résultats montrent clairement que la thrombine ne modifie pas l'activité de LKB1, appuyant l'importance du rôle de la CaMKK β .

La régulation du cytosquelette d'actine : mécanismes moléculaires responsables.

La signalisation CaMKK β /AMPK α 1 contrôle le remodelage du cytosquelette d'actine dans des cellules épithéliales soumises à choc hyperosmotique. Les mécanismes moléculaires impliquent l'activation de la GTPase RhoA qui résulte en la phosphorylation des MLC et de la cofiline [203]. Dans les plaquettes, cette signalisation est activée en réponse à la thrombine [147, 161, 201]. Il est dès lors tentant de spéculer que l'AMPK α 1 pourrait réguler indirectement la phosphorylation des MLC et de la cofiline dans les plaquettes en régulant l'activité de RhoA. Dans une expérience préliminaire, nous avons testé l'effet du STO-609 sur l'activation de RhoA induite par la thrombine dans les plaquettes humaines. Par une technique qui détecte en western blot la forme liée au GTP de RhoA, nous montrons que la proportion de RhoA-GTP est diminuée dans les plaquettes traitées en présence de STO-609 (figure 53). Ce résultat devra être répété et confirmé en utilisant l'activateur pharmacologique de l'AMPK, le composé A-769662. L'activité de RhoA ainsi que la phosphorylation des cibles du cytosquelette seront également investiguées.

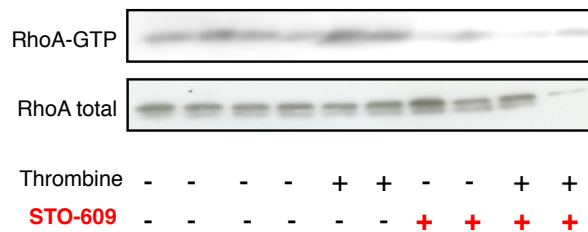


Figure 53. Effet du STO-609 sur l'activation de la GTPase RhoA induite par la thrombine.

Des plaquettes humaines isolées ont été traitées en présence ou en absence de STO-609 (10 μ M, 2 min) avant d'être stimulées avec de la thrombine (0.1 U/ml) pendant 2min.

A côté de RhoA, l'activation de la GTPase Rac1 en réponse à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire induite par la thrombine, contribue à l'activation rapide et transitoire de la cofiline, via sa déphosphorylation par la phosphatase Slh1 [166]. Néanmoins, cette déphosphorylation rapide n'est pas observée en réponse à de faibles concentrations de thrombine (jusqu'à 1U/ml). Elle est par contre suivie d'une phase de re-phosphorylation de la cofiline par la LIMK1. La régulation de la voie Rac1/PAK/LIMK1 par l'AMPK α 1 pourrait constituer un second mécanisme potentiel capable de contribuer à l'augmentation de la phosphorylation de la cofiline en réponse à la thrombine. La régulation de Rac1 par l'AMPK a d'ailleurs déjà été démontrée dans différents modèles cellulaires [245, 267, 268]. L'analyse préliminaire des effets du STO-609 sur l'activation de Rac1 montre que l'inhibition de la voie CaMKK β /AMPK α 1 réduit la proportion de Rac1-GTP dans les plaquettes humaines stimulées par la thrombine (figure 54).

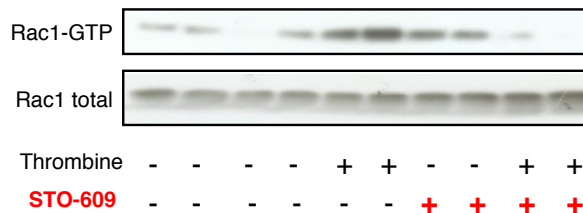


Figure 54. Effet du STO-609 sur l'activation de la GTPase Rac1 induite par la thrombine.

Des plaquettes humaines isolées ont été traitées en présence ou en absence de STO-609 (10 μ M, 2 min) avant d'être stimulées avec de la thrombine (0.1 U/ml) pendant 2 min.

Comme pour RhoA, la régulation de Rac1 par l'AMPK α 1 devra être confirmée. La phosphorylation directe de GEFs ou de GAPs (TIAM-1, GBF-1, AS160) sera également examinée.

Il n'est pas exclu que la régulation de la phosphorylation des MLC et de la cofiline par l'AMPK α 1 soit un mécanisme régulateur qui n'implique pas les GTPases RhoA ou Rac1. En effet, Banko *et al* ont récemment identifié MYPT1 et MBS85, deux sous-unités régulatrices de la MLC phosphatase, comme des substrats directs de l'AMPK [249]. La phosphorylation du site Ser472 favorise la liaison entre cette sous-unité régulatrice avec la protéine 14-3-3, ce qui empêche la formation du complexe phosphatase (comme le fait ROCK en phosphorylant la Ser696). Les auteurs de cette étude ont également montré que l'AMPK pouvait phosphoryler directement la Ser20 de PAK2 et l'activer. Il est généralement admis que l'activation des petites GTPases Rac ou Cdc42 mène à la phosphorylation et à l'activation de PAK. Les membres de cette famille, en phosphorylant des protéines telles que la LIMK, la MLCK, MYPT-1, la cofiline et les MLC, jouent un rôle crucial dans la régulation du cytosquelette d'actine [250]. A nouveau, la phosphorylation de la Ser20 de PAK2 semble affectée par la présence du STO-609 (figure 55).

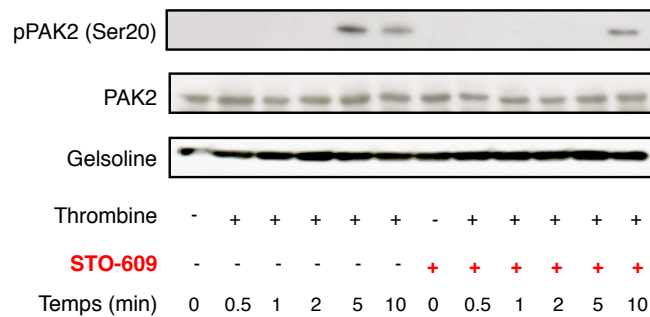


Figure 55. Effet du STO-609 sur la phosphorylation de la Ser20 de PAK2.

Des plaquettes humaines isolées ont été traitées en présence ou en absence de STO-609 (10 μ M, 2 min) avant d'être stimulées avec de la thrombine (0.1 U/ml).

L'AMPK a également été décrite comme une des enzymes responsables de la phosphorylation de la protéine VASP sur la Thr278 et la Ser322 [193, 194]. La phosphorylation de VASP régule sa localisation et sa fonction cellulaire. Dans différents types cellulaires, elle joue un rôle important dans la formation des filopodes et des adhésions focales. En protégeant les filaments d'actine des protéines de coiffe, elle favorise leur polymérisation et la mobilité cellulaire. Dans les cellules endothéliales, la phosphorylation de VASP par l'AMPK altère l'accumulation des filaments d'actine.

Lorsque les plaquettes sont activées, l'élongation rapide et transitoire des filopodes est rapidement supplantée par l'apparition des lamellipodes, nécessaire à l'étalement plaquettaire au cours de l'adhésion. La phosphorylation rapide de VASP sur les Ser278 et 322 pourrait donc jouer un rôle crucial dans la régulation temporelle et hautement dynamique de ces structures d'actine. Nos résultats montrent d'ailleurs que le pourcentage de plaquettes présentant des lamellipodes est significativement réduit dans les plaquettes de souris déficientes pour l'AMPK α 1 stimulées avec de la thrombine, après étalement sur des lames couvertes de fibrinogène.

Importance *in vivo* du rôle de l'AMPK plaquettaire.

L'ensemble des résultats acquis au cours de ce travail a été obtenu sur des plaquettes traitées *ex vivo* par des agonistes. Il serait évidemment intéressant d'investiguer l'importance de l'AMPK α 1 dans les processus hémostatiques, *in vivo*. De façon surprenante, le temps de saignement des souris AMPK α 1 KO n'est pas différent de celui des souris WT contrôles [259]. Cela pourrait s'expliquer par l'augmentation du nombre de plaquettes (environ 2 fois) mise en évidence dans le sang des souris KO par rapport aux souris WT (figure 53). Cette différence n'est pas démontrée pour les souris AMPK α 2KO (figure 56). Ce résultat suggère que l'AMPK α 1 pourrait réguler le cytosquelette d'actine des mégacaryocytes et jouer ainsi un rôle dans la régulation de la production de plaquettes.

De plus, la méthode de mesure du temps de saignement consiste en une entaille au niveau de la queue de la souris. Or, nous savons que le processus hémostatique qui se déroule en circulation veineuse, fait plutôt intervenir la coagulation sanguine et les globules rouges plutôt que les plaquettes.

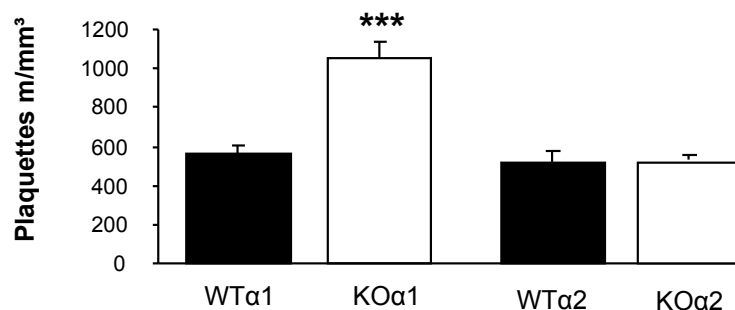


Figure 56. Analyse du nombre de plaquettes dans le sang des souris AMPK α 1 et AMPK α 2 knockout et des souris contrôles correspondantes.

Le résultat est une moyenne (n= 5 souris par conditions) \pm SEM, avec ***p-value < 0,001 pour la différence entre le WT α 1 et le KO α 1

L'étude *in vivo* des fonctions plaquettaires implique généralement les analyses suivantes:

- 1) la formation d'un thrombus après une lésion créée mécaniquement (par compression ou ligature d'un vaisseau), physiquement (par laser) ou chimiquement (à l'aide de FeCl₃), et visualisée en microscopie intravitale.
- 2) le thromboembolisme induit par l'injection d'un mélange de collagène et d'épinéphrine ou de thromborel S.

Etant donné le rôle central joué par l'isoforme α 1 de l'AMPK dans le contrôle de la fonction endothéliale [269], la perméabilité vasculaire [270] et l'inflammation [271], la production de souris dans lesquelles le gène de l'AMPK α 1 a été spécifiquement invalidé dans les plaquettes sanguines devrait constituer un pré-requis pour mener de telles analyses.

A ce stade, nos résultats indiquent que l'AMPK α 1 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique intracellulaire potentielle, visant à réduire les évènements thrombotiques. Cependant, chez les patients diabétiques caractérisés par une hyperactivité plaquettaire, le traitement par la metformine, un activateur pharmacologique de l'AMPK, diminue la réactivité plaquettaire et l'athérosclérose [272, 273]. Les effets anti-athérogènes de la

metformine sont dus en partie à une diminution des niveaux de cholestérol, des marqueurs inflammatoires et des molécules d'adhésion vasculaire. Une étude plus récente montre qu'ils impliquent aussi une diminution du volume plaquettaire [274]. Les mécanismes moléculaires par lesquels la metformine contrôle le volume plaquettaire doivent encore être élucidés.

L'AMPK, un marqueur de la coagulation et de l'activation plaquettaire par la thrombine : applications cliniques potentielles et perspectives.

En accord avec les données obtenues *ex vivo*, la phosphorylation de l'ACC dans les plaquettes humaines est également détectable *in vivo*, notamment au cours de circonstances cliniques où on assiste à une activation importante de la cascade de coagulation (et donc à une production importante de thrombine), comme en situation post-opératoire d'une chirurgie majeure. Une corrélation entre le niveau de phosphorylation de l'ACC des plaquettes de ces patients et leur potentiel thrombinique a également été établie.

Ce monitoring *in vivo* de la coagulation sanguine et de la réponse plaquettaire pourrait être à la base de deux applications potentielles faisant l'objet d'une reconnaissance par un brevet (WO 2013/076157):

- Discriminer un défaut d'hémostase chirurgical d'un désordre de la coagulation chez des patients soumis à un saignement post-chirurgical sévère.
- Evaluer la sensibilité des plaquettes aux nouveaux agents anti-plaquettaires ciblant le récepteur PAR1 (Vorapaxar, Atopaxar) ou anticoagulants oraux inhibant l'activation du facteur X ou de la thrombine (comme le Rivoraxaban, l'Apixaban ou le Dabigatran) chez des patients ayant subi un accident thrombotique (par analogie au test P-VASP/S157 qui est actuellement utilisé en routine pour évaluer la sensibilité des patients au Clopidogrel, un antagoniste du récepteur P2Y12).

Bien que les molécules pharmacologiques visant PAR1 soient encore en phase d'étude clinique, certains NOAC (« new oral anticoagulant ») sont déjà utilisés en Europe. Comme pour tous les anticoagulants, l'utilisation des NOAC est associée à un risque d'hémorragie, parfois grave, surtout important en présence de comorbidités ou chez la population âgée. Etant donnée l'absence actuelle de tests efficaces permettant le suivi de l'efficacité de ces

médicaments, une adaptation de la dose en fonction du degré d'anticoagulation n'est pas encore possible [275].

Enfin, notre objectif futur sera d'étudier si une phosphorylation de l'ACC plaquettaire peut être détectée en dehors de la situation extrême du saignement post-chirurgical. Nous posons l'hypothèse que la phosphorylation de l'ACC plaquettaire pourrait être détectée chez des patients à haut risque d'événement thrombotique artériel, compte tenu du rôle clé de l'activation plaquettaire dans cette pathologie. Des résultats préliminaires supportent notre hypothèse et montrent que l'état de phosphorylation de l'ACC est augmenté chez les patients présentant une maladie coronaire démontrée par un examen angiographique (figure 57).

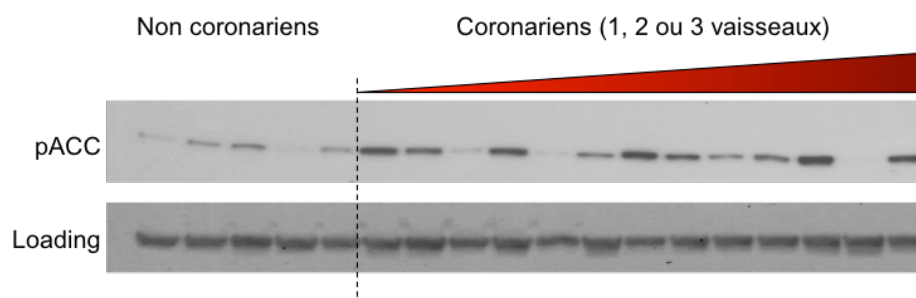


Figure 57. Etat de phosphorylation de l'ACC chez des patients coronariens.

Des prélèvements de sang ont été effectués sur 18 patients au cours d'un examen coronarographique diagnostique, après la mise en place de l'introducteur. Les plaquettes ont été isolées, lysées et analysées en western blot avec un anticorps anti-phosphoACC (Ser79). Les échantillons ont été déposés sur le gel en fonction de la sévérité de la maladie athéromateuse (0, 1, 2 ou 3 vaisseaux).

REFERENCES

1. Ribatti, D. and E. Crivellato, *Giulio Bizzozero and the discovery of platelets*. Leuk Res, 2007. **31**(10): p. 1339-41.
2. Riedl, J., I. Pabinger, and C. Ay, *Platelets in cancer and thrombosis*. Hamostaseologie, 2014. **34**(1): p. 54-62.
3. Nichols, T.C., *Bad cholesterol breaking really bad*. Blood, 2013. **122**(22): p. 3551-3.
4. van Hinsbergh, V.W., *Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(1): p. 93-106.
5. Versteeg, H.H., et al., *New fundamentals in hemostasis*. Physiol Rev, 2013. **93**(1): p. 327-58.
6. Mackman, N., R.E. Tilley, and N.S. Key, *Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(8): p. 1687-93.
7. Chen, V.M. and P.J. Hogg, *Encryption and decryption of tissue factor*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 277-84.
8. Tanaka, K.A., N.S. Key, and J.H. Levy, *Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation*. Anesth Analg, 2009. **108**(5): p. 1433-46.
9. McMichael, M., *New models of hemostasis*. Top Companion Anim Med, 2012. **27**(2): p. 40-5.
10. Geddings, J.E. and N. Mackman, *New players in haemostasis and thrombosis*. Thromb Haemost, 2014. **111**(4): p. 570-4.
11. Renne, T., et al., *Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 271-81.
12. Cheng, Q., et al., *A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3981-9.
13. Matafonov, A., et al., *Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate thrombosis model*. Blood, 2014. **123**(11): p. 1739-46.
14. Cesari, M., M. Pahor, and R.A. Incalzi, *Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions*. Cardiovasc Ther, 2010. **28**(5): p. e72-91.
15. Mackman, N., *Triggers, targets and treatments for thrombosis*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 914-8.
16. Jackson, S.P., *Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1423-36.
17. Michelson, A.D., *Platelets (Third Edition)*. Vol. 3. 2012, 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK: Academic Press 1398.
18. Patel, S.R., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3348-54.
19. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelets: production, morphology and ultrastructure*. Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 3-22.
20. Machlus, K.R. and J.E. Italiano, Jr., *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation*. J Cell Biol, 2013. **201**(6): p. 785-96.
21. Tablin, F., M. Castro, and R.M. Leven, *Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation*. J Cell Sci, 1990. **97 (Pt 1)**: p. 59-70.
22. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelet formation*. Semin Hematol, 2010. **47**(3): p. 220-6.

23. Thon, J.N. and J.E. Italiano, Jr., *Does size matter in platelet production?* Blood, 2012. **120**(8): p. 1552-61.
24. Coppinger, J.A. and P.B. Maguire, *Insights into the platelet releasate.* Curr Pharm Des, 2007. **13**(26): p. 2640-6.
25. Whiteheart, S.W., *Platelet granules: surprise packages.* Blood, 2011. **118**(5): p. 1190-1.
26. Italiano, J.E., Jr., et al., *Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released.* Blood, 2008. **111**(3): p. 1227-33.
27. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates.* Blood Rev, 2009. **23**(4): p. 177-89.
28. Koseoglu, S. and R. Flaumenhaft, *Advances in platelet granule biology.* Curr Opin Hematol, 2013. **20**(5): p. 464-71.
29. Fitch-Tewfik, J.L. and R. Flaumenhaft, *Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells.* Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 77.
30. Kramer, P.A., et al., *A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers.* Redox Biol, 2014. **2**: p. 206-10.
31. Cerecedo, D., *Platelet cytoskeleton and its hemostatic role.* Blood Coagul Fibrinolysis, 2013. **24**(8): p. 798-808.
32. Schwer, H.D., et al., *A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets.* Curr Biol, 2001. **11**(8): p. 579-86.
33. Patel, S.R., et al., *Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes.* Blood, 2005. **106**(13): p. 4076-85.
34. Richardson, J.L., et al., *Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production.* Blood, 2005. **106**(13): p. 4066-75.
35. Freson, K., et al., *The TUBB1 Q43P functional polymorphism reduces the risk of cardiovascular disease in men by modulating platelet function and structure.* Blood, 2005. **106**(7): p. 2356-62.
36. Hartwig, J.H., *The platelet: form and function.* Semin Hematol, 2006. **43**(1 Suppl 1): p. S94-100.
37. Hartwig, J.H. and M. DeSisto, *The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments.* J Cell Biol, 1991. **112**(3): p. 407-25.
38. Lanza, F., et al., *Signalisation via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire.* Hématologie revue, 2008. **14**(4): p. 273-84.
39. Kanaji, T., et al., *GPIbalpha regulates platelet size by controlling the subcellular localization of filamin.* Blood, 2012. **119**(12): p. 2906-13.
40. Patel-Hett, S., et al., *The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation.* Blood, 2011. **118**(6): p. 1641-52.
41. Schade, A.J., et al., *Cytoplasmic truncation of glycoprotein Ib alpha weakens its interaction with von Willebrand factor and impairs cell adhesion.* Biochemistry, 2003. **42**(7): p. 2245-51.
42. Ware, J., S. Russell, and Z.M. Ruggeri, *Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2803-8.
43. Cimmino, G. and P. Golino, *Platelet biology and receptor pathways.* J Cardiovasc Transl Res, 2013. **6**(3): p. 299-309.

44. Oakhill, J.S., et al., *beta-Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(45): p. 19237-41.
45. Lillicrap, D., *von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy*. Blood, 2013. **122**(23): p. 3735-40.
46. Rivera, J., et al., *Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation*. Haematologica, 2009. **94**(5): p. 700-11.
47. Stegner, D. and B. Nieswandt, *Platelet receptor signaling in thrombus formation*. J Mol Med (Berl), 2011. **89**(2): p. 109-21.
48. Schaff, M., et al., *Integrin alpha6beta1 is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis*. Circulation, 2013. **128**(5): p. 541-52.
49. Suzuki-Inoue, K., et al., *Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets*. J Biol Chem, 2010. **285**(32): p. 24494-507.
50. Navarro-Nunez, L., et al., *The physiological and pathophysiological roles of platelet CLEC-2*. Thromb Haemost, 2013. **109**(6): p. 991-8.
51. Munday, A.D., K. Gaus, and J.A. Lopez, *The platelet glycoprotein Ib-IX-V complex anchors lipid rafts to the membrane skeleton: implications for activation-dependent cytoskeletal translocation of signaling molecules*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(1): p. 163-72.
52. Suzuki-Inoue, K., et al., *Glycoproteins VI and Ib-IX-V stimulate tyrosine phosphorylation of tyrosine kinase Syk and phospholipase Cgamma2 at distinct sites*. Biochem J, 2004. **378**(Pt 3): p. 1023-9.
53. Kasirer-Friede, A., et al., *Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors*. Blood, 2004. **103**(9): p. 3403-11.
54. Delaney, M.K., et al., *The role of Rac1 in glycoprotein Ib-IX-mediated signal transduction and integrin activation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(11): p. 2761-8.
55. Gardiner, E.E., et al., *Role of calmodulin in platelet receptor function*. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, 2005. **3**(4): p. 283-7.
56. De Candia, E., *Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history*. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 250-6.
57. Kahn, M.L., et al., *Glycoprotein V-deficient platelets have undiminished thrombin responsiveness and Do not exhibit a Bernard-Soulier phenotype*. Blood, 1999. **94**(12): p. 4112-21.
58. Adam, F., M.C. Guillin, and M. Jandrot-Perrus, *Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin*. Eur J Biochem, 2003. **270**(14): p. 2959-70.
59. Jung, S.M., et al., *Constitutive dimerization of glycoprotein VI (GPVI) in resting platelets is essential for binding to collagen and activation in flowing blood*. J Biol Chem, 2012. **287**(35): p. 30000-13.
60. Severin, S., et al., *Distinct and overlapping functional roles of Src family kinases in mouse platelets*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(8): p. 1631-45.
61. Gilio, K., 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**(49): p. 33750-62.
62. Stefanini, L., et al., *Rap1-Rac1 circuits potentiate platelet activation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(2): p. 434-41.

63. Watson, S.P., J.M. Herbert, and A.Y. Pollitt, *GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(7): p. 1456-67.
64. Jackson, S.P., W.S. Nesbitt, and S. Kulkarni, *Signaling events underlying thrombus formation*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1602-12.
65. Fredriksson, R., et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1256-72.
66. Bockaert, J., *[G-protein-coupled receptors: general features and activation mechanisms]*. Bull Acad Natl Med, 2012. **196**(9): p. 1765-75.
67. Cordeaux, Y. and S.J. Hill, *Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors*. Neurosignals, 2002. **11**(1): p. 45-57.
68. Hur, E.M. and K.T. Kim, *G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity*. Cell Signal, 2002. **14**(5): p. 397-405.
69. Soh, U.J., et al., *Signal transduction by protease-activated receptors*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(2): p. 191-203.
70. Lova, P., et al., *Thrombin induces platelet activation in the absence of functional protease activated receptors 1 and 4 and glycoprotein Ib-IX-V*. Cell Signal, 2010. **22**(11): p. 1681-7.
71. Angiolillo, D.J., D. Capodanno, and S. Goto, *Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis*. Eur Heart J, 2010. **31**(1): p. 17-28.
72. Gratacap, M.P., et al., *Regulation and roles of PI3Kbeta, a major actor in platelet signaling and functions*. Adv Enzyme Regul, 2011. **51**(1): p. 106-16.
73. Siehler, S., *Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(1): p. 41-9.
74. Kim, S., et al., *Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G(i) signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G(i) signaling*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3629-36.
75. Lova, P., et al., *Contribution of protease-activated receptors 1 and 4 and glycoprotein Ib-IX-V in the G(i)-independent activation of platelet Rap1B by thrombin*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25299-306.
76. Voss, B., et al., *PAR1, but not PAR4, activates human platelets through a Gi/o/phosphoinositide-3 kinase signaling axis*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(5): p. 1399-406.
77. Ungerer, M. and G. Munch, *Novel antiplatelet drugs in clinical development*. Thromb Haemost, 2013. **110**(5): p. 868-75.
78. Storey, R.F., L.J. Newby, and S. Heptinstall, *Effects of P2Y(1) and P2Y(12) receptor antagonists on platelet aggregation induced by different agonists in human whole blood*. Platelets, 2001. **12**(7): p. 443-7.
79. Secco, G.G., et al., *P2Y12 inhibitors: pharmacologic mechanism and clinical relevance*. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2013. **11**(2): p. 101-5.
80. Hechler, B. and C. Gachet, *P2 receptors and platelet function*. Purinergic Signal, 2011. **7**(3): p. 293-303.
81. Leon, C., et al., *Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice*. J Clin Invest, 1999. **104**(12): p. 1731-7.
82. Erhardt, J.A., et al., *P2X1 stimulation promotes thrombin receptor-mediated platelet aggregation*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(4): p. 882-90.
83. Moore, S.F., et al., *Dysfunction of the PI3 kinase/Rap1/integrin alpha(IIb)beta(3) pathway underlies ex vivo platelet hypoactivity in essential thrombocythemia*. Blood, 2013. **121**(7): p. 1209-19.

84. Michelson, A.D., *Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(2): p. 154-69.
85. Giannarelli, C., M.U. Zafar, and J.J. Badimon, *Prostanoid and TP-receptors in atherothrombosis: is there a role for their antagonism?* Thromb Haemost, 2010. **104**(5): p. 949-54.
86. Cattaneo, M., et al., *Adenosine diphosphate(ADP) does not induce thromboxane A2 generation in human platelets*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3868-9; author reply 3869-70.
87. Ting, H.J. and F.T. Khasawneh, *Platelet function and Isoprostane biology. Should isoprostanes be the newest member of the orphan-ligand family?* J Biomed Sci, 2010. **17**(1): p. 24.
88. Patrono, C., *The PGH-synthase system and isozyme-selective inhibition*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47 Suppl 1**: p. S1-6.
89. Habib, A., G.A. FitzGerald, and J. Maclouf, *Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets*. J Biol Chem, 1999. **274**(5): p. 2645-51.
90. Nurden, P., et al., *Immunolocalization of P2Y1 and TPalpha receptors in platelets showed a major pool associated with the membranes of alpha -granules and the open canalicular system*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1400-8.
91. Varga-Szabo, D., A. Braun, and B. Nieswandt, *Calcium signaling in platelets*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(7): p. 1057-66.
92. Rosado, J.A., *Acidic Ca(2+) stores in platelets*. Cell Calcium, 2011. **50**(2): p. 168-74.
93. Varga-Szabo, D., A. Braun, and B. Nieswandt, *STIM and Orai in platelet function*. Cell Calcium, 2011. **50**(3): p. 270-8.
94. Lang, F., et al., *Regulation of STIM1/Orai1-dependent Ca2+ signalling in platelets*. Thromb Haemost, 2013. **110**(5): p. 925-30.
95. Varga-Szabo, D., et al., *The calcium sensor STIM1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1583-91.
96. Braun, A., et al., *Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation*. Blood, 2009. **113**(9): p. 2056-63.
97. Baba, Y., et al., *Coupling of STIM1 to store-operated Ca2+ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16704-9.
98. Prakriya, M., *Store-operated Orai channels: structure and function*. Curr Top Membr, 2013. **71**: p. 1-32.
99. Bergmeier, W., et al., *R93W mutation in Orai1 causes impaired calcium influx in platelets*. Blood, 2009. **113**(3): p. 675-8.
100. Coxon, C.H., et al., *NAADP regulates human platelet function*. Biochem J, 2012. **441**(1): p. 435-42.
101. Lopez, J.J., et al., *Two distinct Ca2+ compartments show differential sensitivity to thrombin, ADP and vasopressin in human platelets*. Cell Signal, 2006. **18**(3): p. 373-81.
102. Toth-Zsamboki, E., et al., *P2X1-mediated ERK2 activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46661-7.
103. Oury, C., et al., *The ATP-gated P2X1 ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen*. Thromb Haemost, 2001. **86**(5): p. 1264-71.
104. Mahaut-Smith, M.P., S. Jones, and R.J. Evans, *The P2X1 receptor and platelet function*. Purinergic Signal, 2011. **7**(3): p. 341-56.
105. Hechler, B., et al., *A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 661-7.

106. Oury, C., et al., *ATP augments von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation through Ca²⁺-calmodulin and myosin light chain kinase activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26266-73.
107. Oury, C., et al., *Overexpression of the platelet P2X1 ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype*. Blood, 2003. **101**(10): p. 3969-76.
108. Jones, S., R.J. Evans, and M.P. Mahaut-Smith, *Ca²⁺ Influx through P2X1 Receptors Amplifies P2Y1 Receptor-Evoked Ca²⁺ Signaling and ADP-Evoked Platelet Aggregation*. Mol Pharmacol, 2014. **86**(3): p. 243-51.
109. Crittenden, J.R., et al., *CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 982-6.
110. Johnson, G.J., et al., *The critical role of myosin IIA in platelet internal contraction*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(7): p. 1516-29.
111. Painter, R.G. and M.H. Ginsberg, *Centripetal myosin redistribution in thrombin-stimulated platelets. Relationship to platelet Factor 4 secretion*. Exp Cell Res, 1984. **155**(1): p. 198-212.
112. Ren, Q., S. Ye, and S.W. Whiteheart, *The platelet release reaction: just when you thought platelet secretion was simple*. Curr Opin Hematol, 2008. **15**(5): p. 537-41.
113. Boswell, K.L., et al., *Munc13-4 reconstitutes calcium-dependent SNARE-mediated membrane fusion*. J Cell Biol, 2012. **197**(2): p. 301-12.
114. Latham, C.F. and F.A. Meunier, *Munc18a: Munc-y business in mediating exocytosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(9): p. 1576-81.
115. Graham, G.J., et al., *Endobrevin/VAMP-8-dependent dense granule release mediates thrombus formation in vivo*. Blood, 2009. **114**(5): p. 1083-90.
116. Ren, Q., et al., *Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(1): p. 24-33.
117. Ye, S., et al., *Syntaxin-11, but not syntaxin-2 or syntaxin-4, is required for platelet secretion*. Blood, 2012. **120**(12): p. 2484-92.
118. Chen, D., et al., *Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release*. Blood, 2000. **95**(3): p. 921-9.
119. Chen, D., et al., *Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1782-8.
120. Lemons, P.P., D. Chen, and S.W. Whiteheart, *Molecular mechanisms of platelet exocytosis: requirements for alpha-granule release*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**(3): p. 875-80.
121. Wagner, C.L., et al., *Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets*. Blood, 1996. **88**(3): p. 907-14.
122. Banno, A. and M.H. Ginsberg, *Integrin activation*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 2): p. 229-34.
123. Katagiri, K. and T. Kinashi, *Rap1 and integrin inside-out signaling*. Methods Mol Biol, 2012. **757**: p. 279-96.
124. Chrzanowska-Wodnicka, M., et al., *Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 680-7.
125. Cifuni, S.M., D.D. Wagner, and W. Bergmeier, *CalDAG-GEFI and protein kinase C represent alternative pathways leading to activation of integrin alphaIIb beta3 in platelets*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1696-703.
126. Kinashi, T., et al., *LAD-III, a leukocyte adhesion deficiency syndrome associated with defective Rap1 activation and impaired stabilization of integrin bonds*. Blood, 2004. **103**(3): p. 1033-6.
127. Goult, B.T., et al., *RIAM and vinculin binding to talin are mutually exclusive and regulate adhesion assembly and turnover*. J Biol Chem, 2013. **288**(12): p. 8238-49.

128. Tadokoro, S., et al., *Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation*. *Science*, 2003. **302**(5642): p. 103-6.
129. Watanabe, N., et al., *Mechanisms and consequences of agonist-induced talin recruitment to platelet integrin alphaIIb beta3*. *J Cell Biol*, 2008. **181**(7): p. 1211-22.
130. Das, M., et al., *Mechanisms of talin-dependent integrin signaling and crosstalk*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1838**(2): p. 579-88.
131. Monkley, S.J., C.A. Pritchard, and D.R. Critchley, *Analysis of the mammalian talin2 gene TLN2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **286**(5): p. 880-5.
132. Rowley, J.W., et al., *Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes*. *Blood*, 2011. **118**(14): p. e101-11.
133. Haling, J.R., et al., *Talin-dependent integrin activation is required for fibrin clot retraction by platelets*. *Blood*, 2011. **117**(5): p. 1719-22.
134. Nieswandt, B., et al., *Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo*. *J Exp Med*, 2007. **204**(13): p. 3113-8.
135. Song, X., et al., *A novel membrane-dependent on/off switch mechanism of talin FERM domain at sites of cell adhesion*. *Cell Res*, 2012. **22**(11): p. 1533-45.
136. Ratnikov, B.I., A.W. Partridge, and M.H. Ginsberg, *Integrin activation by talin*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(8): p. 1783-90.
137. Critchley, D.R. and A.R. Gingras, *Talin at a glance*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 9): p. 1345-7.
138. Ma, Y.Q., et al., *Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins*. *J Cell Biol*, 2008. **181**(3): p. 439-46.
139. Siegel, D.H., et al., *Loss of kindlin-1, a human homolog of the Caenorhabditis elegans actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome*. *Am J Hum Genet*, 2003. **73**(1): p. 174-87.
140. Ussar, S., et al., *The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(16): p. 3142-51.
141. Larjava, H., E.F. Plow, and C. Wu, *Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion*. *EMBO Rep*, 2008. **9**(12): p. 1203-8.
142. Harburger, D.S., M. Bouaouina, and D.A. Calderwood, *Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(17): p. 11485-97.
143. Kruger, M., et al., *SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function*. *Cell*, 2008. **134**(2): p. 353-64.
144. Moser, M., et al., *Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation*. *Nat Med*, 2008. **14**(3): p. 325-30.
145. Mory, A., et al., *Kindlin-3: a new gene involved in the pathogenesis of LAD-III*. *Blood*, 2008. **112**(6): p. 2591.
146. Shen, Y.M., et al., *Rare deletion from the fibrinogen Bbeta gene in a patient with a provoked venous thrombotic event*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2011. **22**(7): p. 613-5.
147. Pleines, I., et al., *Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis*. *Blood*, 2012. **119**(4): p. 1054-63.
148. Flevaris, P., et al., *Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway*. *Blood*, 2009. **113**(4): p. 893-901.
149. Egot, M., et al., *Biphasic myosin II light chain activation during clot retraction*. *Thromb Haemost*, 2013. **110**(6): p. 1215-22.

150. Cipolla, L., et al., *The proline-rich tyrosine kinase Pyk2 regulates platelet integrin α IIb β 3 outside-in signaling*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(2): p. 345-56.
151. Bustelo, X.R., *Regulatory and signaling properties of the Vav family*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(5): p. 1461-77.
152. Obergefell, A., et al., *Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]II\beta[\beta]3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton*. J Cell Biol, 2002. **157**(2): p. 265-75.
153. Barkalow, K.L., et al., *Alpha-adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation*. J Cell Biol, 2003. **161**(3): p. 557-70.
154. Tamaru, S., et al., *Rho-kinase induces association of adducin with the cytoskeleton in platelet activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(2): p. 347-51.
155. McGough, A.M., et al., *The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions*. FEBS Lett, 2003. **552**(2-3): p. 75-81.
156. Witke, W., et al., *Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin*. Cell, 1995. **81**(1): p. 41-51.
157. Vartiainen, M.K., et al., *The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): p. 183-94.
158. McCullough, B.R., et al., *Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics*. J Mol Biol, 2008. **381**(3): p. 550-8.
159. Le Clainche, C. and M.F. Carrier, *Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration*. Physiol Rev, 2008. **88**(2): p. 489-513.
160. Andrianantoandro, E. and T.D. Pollard, *Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin*. Mol Cell, 2006. **24**(1): p. 13-23.
161. Van Troys, M., et al., *Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(8-9): p. 649-67.
162. Frantz, C., et al., *Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding*. J Cell Biol, 2008. **183**(5): p. 865-79.
163. Goyal, P., et al., *Cofilin oligomer formation occurs in vivo and is regulated by cofilin phosphorylation*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71769.
164. Bender, M., et al., *ADF/n-cofilin-dependent actin turnover determines platelet formation and sizing*. Blood, 2010. **116**(10): p. 1767-75.
165. Pandey, D., et al., *Regulation of LIM-kinase 1 and cofilin in thrombin-stimulated platelets*. Blood, 2006. **107**(2): p. 575-83.
166. Pandey, D., et al., *Unraveling a novel Rac1-mediated signaling pathway that regulates cofilin dephosphorylation and secretion in thrombin-stimulated platelets*. Blood, 2009. **114**(2): p. 415-24.
167. Falet, H., et al., *Integrin α (IIb) β 3 signals lead cofilin to accelerate platelet actin dynamics*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(4): p. C819-25.
168. Small, J.V. and G.P. Resch, *The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 517-23.
169. Svitkina, T.M. and G.G. Borisy, *Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia*. J Cell Biol, 1999. **145**(5): p. 1009-26.
170. Svitkina, T.M., et al., *Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation*. J Cell Biol, 1997. **139**(2): p. 397-415.
171. Suraneni, P., et al., *The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration*. J Cell Biol, 2012. **197**(2): p. 239-51.

172. Wu, C., et al., *Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis*. Cell, 2012. **148**(5): p. 973-87.
173. McCarty, O.J., et al., *Rac1 is essential for platelet lamellipodia formation and aggregate stability under flow*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39474-84.
174. Falet, H., et al., *Normal Arp2/3 complex activation in platelets lacking WASp*. Blood, 2002. **100**(6): p. 2113-22.
175. Falet, H., et al., *Importance of free actin filament barbed ends for Arp2/3 complex function in platelets and fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16782-7.
176. Gross, B.S., et al., *Regulation and function of WASp in platelets by the collagen receptor, glycoprotein VI*. Blood, 1999. **94**(12): p. 4166-76.
177. Schirenbeck, A., et al., *Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 6): p. 1256-9.
178. Schirenbeck, A., et al., *The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7694-9.
179. Krause, M., et al., *Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 541-64.
180. Bear, J.E. and F.B. Gertler, *Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 12): p. 1947-53.
181. Pula, G. and M. Krause, *Role of Ena/VASP proteins in homeostasis and disease*. Handb Exp Pharmacol, 2008(186): p. 39-65.
182. Barzik, M., et al., *Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins*. J Biol Chem, 2005. **280**(31): p. 28653-62.
183. Massberg, S., et al., *Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice*. Blood, 2004. **103**(1): p. 136-42.
184. Aszodi, A., et al., *The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function*. EMBO J, 1999. **18**(1): p. 37-48.
185. Eliautou, S., et al., *Normal filopodia extension in VASP-deficient platelets upon activation by adhesive matrices or soluble agonists*. Thromb Haemost, 2009. **102**(4): p. 792-4.
186. Maruoka, M., et al., *Abl-1-bridged tyrosine phosphorylation of VASP by Abelson kinase impairs association of VASP to focal adhesions and regulates leukaemic cell adhesion*. Biochem J, 2012. **441**(3): p. 889-99.
187. Lambrechts, A., et al., *cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36143-51.
188. Loureiro, J.J., et al., *Critical roles of phosphorylation and actin binding motifs, but not the central proline-rich region, for Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) function during cell migration*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(7): p. 2533-46.
189. Zuzga, D.S., et al., *Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein Ser239 suppresses filopodia and invadopodia in colon cancer*. Int J Cancer, 2012. **130**(11): p. 2539-48.
190. Doppler, H. and P. Storz, *Regulation of VASP by phosphorylation: consequences for cell migration*. Cell Adh Migr, 2013. **7**(6): p. 482-6.
191. Doppler, H.R., et al., *Protein kinase D1-mediated phosphorylations regulate vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) localization and cell migration*. J Biol Chem, 2013. **288**(34): p. 24382-93.

192. Chen, X., et al., *PDK1 regulates platelet activation and arterial thrombosis*. Blood, 2013. **121**(18): p. 3718-26.
193. Blume, C., et al., *AMP-activated protein kinase impairs endothelial actin cytoskeleton assembly by phosphorylating vasodilator-stimulated phosphoprotein*. J Biol Chem, 2007. **282**(7): p. 4601-12.
194. Thomson, D.M., et al., *Phosphorylation of VASP by AMPK alters actin binding and occurs at a novel site*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **414**(1): p. 215-9.
195. Harper, M.T., et al., *Absence of platelet phenotype in mice lacking the motor protein myosin Va*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53239.
196. Leon, C., et al., *Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion*. Blood, 2007. **110**(9): p. 3183-91.
197. Althaus, K., J. Najm, and A. Greinacher, *MYH9 related platelet disorders - often unknown and misdiagnosed*. Klin Padiatr, 2011. **223**(3): p. 120-5.
198. Pertuy, F., et al., *Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets*. Blood, 2014. **123**(8): p. 1261-9.
199. Canobbio, I., et al., *Altered cytoskeleton organization in platelets from patients with MYH9-related disease*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(5): p. 1026-35.
200. Vicente-Manzanares, M., et al., *Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(11): p. 778-90.
201. Getz, T.M., et al., *Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional implications in platelets*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(10): p. 2283-93.
202. Mihaylova, M.M. and R.J. Shaw, *The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(9): p. 1016-23.
203. Miranda, L., et al., *AMP-activated protein kinase induces actin cytoskeleton reorganization in epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(3): p. 656-61.
204. Nakano, A. and S. Takashima, *LKB1 and AMP-activated protein kinase: regulators of cell polarity*. Genes Cells, 2012. **17**(9): p. 737-47.
205. Stapleton, D., et al., *Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 611-4.
206. Suter, M., et al., *Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32207-16.
207. Woods, A., et al., *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade*. Curr Biol, 2003. **13**(22): p. 2004-8.
208. Pang, T., et al., *Conserved alpha-helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase alpha subunits*. J Biol Chem, 2007. **282**(1): p. 495-506.
209. Horman, S., et al., *Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5335-40.
210. Hurley, R.L., et al., *Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 36662-72.
211. Steinberg, G.R. and B.E. Kemp, *AMPK in Health and Disease*. Physiol Rev, 2009. **89**(3): p. 1025-78.
212. Thornton, C., M.A. Snowden, and D. Carling, *Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle*. J Biol Chem, 1998. **273**(20): p. 12443-50.

213. Warden, S.M., et al., *Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization*. *Biochem J*, 2001. **354**(Pt 2): p. 275-83.
214. Pinter, K., et al., *Embryonic expression of AMPK gamma subunits and the identification of a novel gamma2 transcript variant in adult heart*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **53**(3): p. 342-9.
215. Bateman, A., *The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein*. *Trends Biochem Sci*, 1997. **22**(1): p. 12-3.
216. Scott, J.W., et al., *CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(2): p. 274-84.
217. Xiao, B., et al., *Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP*. *Nature*, 2011. **472**(7342): p. 230-3.
218. Oakhill, J.S., J.W. Scott, and B.E. Kemp, *Structure and function of AMP-activated protein kinase*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009. **196**(1): p. 3-14.
219. Oakhill, J.S., et al., *AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase*. *Science*, 2011. **332**(6036): p. 1433-5.
220. Davies, S.P., et al., *5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC*. *FEBS Lett*, 1995. **377**(3): p. 421-5.
221. Gowans, G.J. and D.G. Hardie, *AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP*. *Biochem Soc Trans*, 2014. **42**(1): p. 71-5.
222. Momcilovic, M., S.P. Hong, and M. Carlson, *Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(35): p. 25336-43.
223. Alessi, D.R., K. Sakamoto, and J.R. Bayascas, *LKB1-dependent signaling pathways*. *Annu Rev Biochem*, 2006. **75**: p. 137-63.
224. Boudeau, J., G. Sapkota, and D.R. Alessi, *LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity*. *FEBS Lett*, 2003. **546**(1): p. 159-65.
225. Sakamoto, K., et al., *Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **287**(2): p. E310-7.
226. Denison, F.C., et al., *Characterization of an alternative splice variant of LKB1*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(1): p. 67-76.
227. Denison, F.C., et al., *LKB1 is an essential regulator of spermatozoa release during spermiation in the mammalian testis*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28306.
228. Dorfman, J. and I.G. Macara, *STRADalpha regulates LKB1 localization by blocking access to importin-alpha, and by association with Crm1 and exportin-7*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(4): p. 1614-26.
229. Collins, S.P., et al., *LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo*. *Biochem J*, 2000. **345 Pt 3**: p. 673-80.
230. Fogarty, S. and D.G. Hardie, *C-terminal phosphorylation of LKB1 is not required for regulation of AMP-activated protein kinase, BRSK1, BRSK2, or cell cycle arrest*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(1): p. 77-84.
231. Zhu, H., et al., *Phosphorylation of serine 399 in LKB1 protein short form by protein kinase Czeta is required for its nucleocytoplasmic transport and consequent AMP-activated protein kinase (AMPK) activation*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(23): p. 16495-505.

232. Davare, M.A., et al., *Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase by protein 14-3-3*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52191-9.
233. Green, M.F., et al., *Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase kinase beta is regulated by multisite phosphorylation*. J Biol Chem, 2011. **286**(32): p. 28066-79.
234. Li, D., S. August, and D.S. Woulfe, *GSK3beta is a negative regulator of platelet function and thrombosis*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3522-30.
235. Fogarty, S., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca²⁺ and AMP*. Biochem J, 2010. **426**(1): p. 109-18.
236. Hawley, S.A., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase*. Cell Metab, 2005. **2**(1): p. 9-19.
237. Racioppi, L. and A.R. Means, *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology*. J Biol Chem, 2012. **287**(38): p. 31658-65.
238. Weekes, J., et al., *Specificity determinants for the AMP-activated protein kinase and its plant homologue analysed using synthetic peptides*. FEBS Lett, 1993. **334**(3): p. 335-9.
239. Towler, M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 328-41.
240. Ohsawa, M., et al., *TSC1 controls distribution of actin fibers through its effect on function of Rho family of small GTPases and regulates cell migration and polarity*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54503.
241. Aslan, J.E., et al., *Characterization of the Rac guanine nucleotide exchange factor P-Rex1 in platelets*. J Mol Signal, 2011. **6**: p. 11.
242. Gandhi, G.R., et al., *Insulin sensitization via partial agonism of PPARgamma and glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway by embelin in type 2 diabetic rats*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(1): p. 2243-55.
243. Treebak, J.T., et al., *AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits*. Diabetes, 2006. **55**(7): p. 2051-8.
244. Gayard, M., et al., *AMPK alpha 1-induced RhoA phosphorylation mediates vasoprotective effect of estradiol*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(11): p. 2634-42.
245. You, G.Y., et al., *Tiam-1, a GEF for Rac1, plays a critical role in metformin-mediated glucose uptake in C2C12 cells*. Cell Signal, 2013. **25**(12): p. 2558-65.
246. Mao, L., et al., *AMPK phosphorylates GBF1 for mitotic Golgi disassembly*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 6): p. 1498-505.
247. Choi, W., Z.A. Karim, and S.W. Whiteheart, *Arf6 plays an early role in platelet activation by collagen and convulxin*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3145-52.
248. Karim, Z.A., W. Choi, and S.W. Whiteheart, *Primary platelet signaling cascades and integrin-mediated signaling control ADP-ribosylation factor (Arf) 6-GTP levels during platelet activation and aggregation*. J Biol Chem, 2008. **283**(18): p. 11995-2003.
249. Banko, M.R., et al., *Chemical genetic screen for AMPKalpha2 substrates uncovers a network of proteins involved in mitosis*. Mol Cell, 2011. **44**(6): p. 878-92.
250. Coniglio, S.J., S. Zavarella, and M.H. Symons, *Pak1 and Pak2 mediate tumor cell invasion through distinct signaling mechanisms*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(12): p. 4162-72.

251. Moon, S., et al., *Interactome analysis of AMP-activated protein kinase (AMPK)-alpha1 and -beta1 in INS-1 pancreatic beta-cells by affinity purification-mass spectrometry*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 4376.
252. Fleming, I., et al., *AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates the insulin-induced activation of the nitric oxide synthase in human platelets*. Thromb Haemost, 2003. **90**(5): p. 863-71.
253. Gambaryan, S., et al., *NO-synthase-/NO-independent regulation of human and murine platelet soluble guanylyl cyclase activity*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(8): p. 1376-84.
254. Hunter, R.W. and I. Hers, *Insulin/IGF-1 hybrid receptor expression on human platelets: consequences for the effect of insulin on platelet function*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(12): p. 2123-30.
255. Stahmann, N., et al., *Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(16): p. 5933-45.
256. Stone, J.D., et al., *AMP-activated protein kinase inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration and vascular remodeling following injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **304**(3): p. H369-81.
257. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
258. Liu, Y., et al., *Antiplatelet effect of AMP-activated protein kinase activator and its potentiation by the phosphodiesterase inhibitor dipyridamole*. Biochem Pharmacol, 2013. **86**(7): p. 914-25.
259. Randriamboavonjy, V., et al., *AMPK alpha2 subunit is involved in platelet signaling, clot retraction, and thrombus stability*. Blood, 2010. **116**(12): p. 2134-40.
260. Zelenak, C., et al., *Proteome analysis of erythrocytes lacking AMP-activated protein kinase reveals a role of PAK2 kinase in eryptosis*. J Proteome Res, 2011. **10**(4): p. 1690-7.
261. Bhavsar, S.K., et al., *AMPKalpha1-sensitivity of Orai1 and Ca(2+) entry in T-lymphocytes*. Cell Physiol Biochem, 2013. **32**(3): p. 687-98.
262. Sag, D., et al., *Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8633-41.
263. Alberelli, M.A. and E. De Candia, *Functional role of protease activated receptors in vascular biology*. Vascul Pharmacol, 2014. **62**(2): p. 72-81.
264. Coughlin, S.R., *Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1800-14.
265. Bodin, S., et al., *Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 4): p. 759-69.
266. Bodin, S., H. Tronchere, and B. Payraastre, *Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1610**(2): p. 247-57.
267. Bae, H.B., et al., *AMP-activated protein kinase enhances the phagocytic ability of macrophages and neutrophils*. FASEB J, 2011. **25**(12): p. 4358-68.
268. Lee, Y.M., et al., *Retinoic acid leads to cytoskeletal rearrangement through AMPK-Rac1 and stimulates glucose uptake through AMPK-p38 MAPK in skeletal muscle cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(49): p. 33969-74.
269. Enkhjargal, B., et al., *Endothelial AMP-activated protein kinase regulates blood pressure and coronary flow responses through hyperpolarization mechanism in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(7): p. 1505-13.

270. Castanares-Zapatero, D., et al., *Connection between cardiac vascular permeability, myocardial edema, and inflammation during sepsis: role of the alpha1AMP-activated protein kinase isoform*. Crit Care Med, 2013. **41**(12): p. e411-22.
271. Mounier, R., et al., *AMPKalpha1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration*. Cell Metab, 2013. **18**(2): p. 251-64.
272. Formoso, G., et al., *Decreased in vivo oxidative stress and decreased platelet activation following metformin treatment in newly diagnosed type 2 diabetic subjects*. Diabetes Metab Res Rev, 2008. **24**(3): p. 231-7.
273. Grant, P.J., *Beneficial effects of metformin on haemostasis and vascular function in man*. Diabetes Metab, 2003. **29**(4 Pt 2): p. 6S44-52.
274. Dolasik, I., et al., *The effect of metformin on mean platelet volume in diabetic patients*. Platelets, 2013. **24**(2): p. 118-21.
275. Stollberger, C. and J. Finsterer, *New oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation*. Lancet, 2014. **384**(9937): p. 23.

ANNEXES

IN FOCUS

The Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase β -AMP-activated protein kinase- α 1 pathway regulates phosphorylation of cytoskeletal targets in thrombin-stimulated human platelets

M.-B. ONSELAER,* C. OURY,† R. W. HUNTER,‡ S. EECKHOUDT,§ N. BARILE,* C. LECUT,† N. MOREL,¶ B. VIOLLET,**†‡§ L.-M. JACQUET,§§ L. BERTRAND,* K. SAKAMOTO,‡ J.-L. VANOVERSCHELDE,*¶¶ C. BEAULOYE*§§¶¶ and S. HORMAN*

*Institut de Recherche Expérimentale et Clinique (IREC), Pôle de Recherche Cardiovasculaire, Université catholique de Louvain, Brussels; †Human Genetics Unit, GIGA-Research, Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Université de Liège, Liège, Belgium; ‡Nestlé Institute of Health Sciences SA, Campus EPFL, Lausanne, Switzerland; §Department of Hematology, Cliniques universitaires Saint-Luc, Université catholique de Louvain; ¶Institute of Neuroscience, Laboratory of Cell Physiology, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium; **Institut Cochin, INSERM U1016; ††CNRS, UMR8104; ‡‡Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; §§Cliniques Universitaires Saint-Luc, Cardiovascular Intensive Care, Université catholique de Louvain; and ¶¶Division of Cardiology, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium

To cite this article: Onselae MB, Oury C, Hunter RW, Eeckhoudt S, Barile N, Lecut C, Morel N, Viollet B, Jacquet LM, Bertrand L, Sakamoto K, Vanoverschelde JL, Beauloye C, Horman S. The Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase β -AMP-activated protein kinase- α 1 pathway regulates phosphorylation of cytoskeletal targets in thrombin-stimulated human platelets. *J Thromb Haemost* 2014; **12**: 973–86.

See also Randriamboavonjy V, Fleming I. Energy and motion: AMPK α 1 and its role in platelet activation. This issue, pp 970–2.

Summary. *Background:* Platelet activation requires sweeping morphologic changes, supported by contraction and remodeling of the platelet actin cytoskeleton. In various other cell types, AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the phosphorylation state of cytoskeletal targets. *Objective:* To determine whether AMPK is activated during platelet aggregation and contributes to the control of cytoskeletal targets. *Results:* We found that AMPK- α 1 was mainly activated by thrombin, and not by other platelet agonists, in purified human platelets. Thrombin activated AMPK- α 1 *ex vivo* via a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase β (CaMKK β)-dependent pathway. Pharmacologic inhibition of CaMKK β blocked thrombin-induced platelet aggregation and counteracted thrombin-induced phosphorylation of several cytoskeletal proteins, namely, regulatory myosin light chains (MLCs), cofilin, and vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), three key elements involved in actin cytoskeletal contraction and polymerization. Plate-

lets isolated from mice lacking AMPK- α 1 showed reduced aggregation in response to thrombin, and this was associated with defects in MLC, cofilin and VASP phosphorylation and actin polymerization. More importantly, we show, for the first time, that the AMPK pathway is activated in platelets of patients undergoing major cardiac surgery, in a heparin-sensitive manner. *Conclusion:* AMPK- α 1 is activated by thrombin in human platelets. It controls the phosphorylation of key cytoskeletal targets and actin cytoskeletal remodeling during platelet aggregation.

Keywords: AMP-activated protein kinase; cytoskeleton; platelet aggregation; signal transduction; thrombin.

Correspondence: Christophe Beauloye, Avenue Hippocrate, 55 CARD5550, 1200 Brussels, Belgium.
Tel.: +32 2 764 5566; fax: +32 2 764 5536.
E-mail: christophe.beauloye@uclouvain.be

Received 23 September 2013

Manuscript handled by: S. Watson

Final decision: P. H. Reitsma, 11 March 2014

Introduction

Within seconds after activation, resting, discoid platelets are transformed into relatively spheroidal cells with filopodial extensions that are rapidly superseded by sustained lamellipodia characteristic of platelet spreading [1]. These morphologic changes are supported exclusively by contraction and remodeling of the platelet actin cytoskeleton [2,3]. Myosin IIA (encoded by the *MYH9* gene), the sole non-muscle myosin isoform present in platelets, interacts with actin to form contractile filaments. Its activity is regulated by reversible phosphorylation of

its regulatory myosin light chains (MLCs) on Thr18 or Ser19 [4]. MLC phosphorylation is critical for triggering platelet shape change and the centralization of secretory granules [2]. Centralization of granules may accelerate granule–granule fusion and connection to channels of the open canalicular system, to promote the secretion of granule products. Cofilin and vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) are regulators of lamellipodia and filopodia, respectively [5,6]. Cofilin is a small, actin-dynamizing protein that regulates actin turnover in all species. Its phosphorylation at Ser3 inhibits its filamentous actin (F-actin) binding, severing and depolymerizing activities [5]. During secretion/aggregation, cofilin is characterized by cyclic dephosphorylation/phosphorylation behavior that promotes actin remodeling and the generation of free barbed ends for lamellipodium assembly during platelet activation. VASP is a regulator of actin polymerization. Its anticapping activity promotes filopodial formation, and contributes critically to the platelet aggregation response [7]. The localization and/or anticapping activity of the protein depend on its phosphorylation state [8]. Four main phosphorylation sites have been identified [8,9].

Ca²⁺/calmodulin (CaM)-dependent kinase kinase β (CaMKK β) is a CaM-binding protein whose activity is enhanced by thrombin in endothelial cells [10]. The serine/threonine kinase AMP-activated protein kinase (AMPK) has been identified as a substrate of CaMKK β [11]. It is a heterotrimer consisting of a catalytic α -subunit ($\alpha 1$ or $\alpha 2$) and two regulatory subunits, β and γ . AMPK can be activated via an increase in Ca²⁺ concentration [10]. Acetyl-CoA carboxylase (ACC) is a genuine AMPK substrate, and its phosphorylation state is used to evaluate AMPK activation. In kidney epithelial cells, the CaMKK β –AMPK– $\alpha 1$ pathway controls actin cytoskeletal contraction and organization via the indirect phosphorylation of MLCs and cofilin [12]. VASP has also been described as a direct substrate of AMPK [9,13].

As the CaMKK β –AMPK– $\alpha 1$ pathway is a key factor in cytoskeletal organization, we hypothesized that it regulates platelet activation and aggregation by controlling the phosphorylation and activity of cytoskeletal proteins, namely MLCs, cofilin, and VASP. In this study, we established that thrombin activated the CaMKK β –AMPK– $\alpha 1$ axis in human platelets. Pharmacologic or genetic inhibition of this pathway decreased platelet aggregation, modified MLC, VASP and cofilin phosphorylation states, and altered actin polymerization upon thrombin stimulation. Interestingly, the AMPK pathway was activated *in vivo* in platelets from patients undergoing major surgery.

Materials and methods

Materials are given in the supporting information (Part S1).

Approval of human and animal studies

Animal procedures and protocols were approved by local authorities (Comité d'éthique facultaire pour l'expérimentation animale, UCL/MD/2007/049 and 2012/UCL/MD/003) and performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Human studies were authorized by the 'Commission d'Éthique Biomédicale Hospitalo-Facultaire de l'Université catholique de Louvain'. All human participants gave written, informed consent.

Platelet isolation and lysis

Human platelets Venous blood from healthy volunteers was collected in a 1 : 10 blood volume of 3.8% sodium citrate as anticoagulant (S-monovette). Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by 15 min of centrifugation at $330 \times g$. For the measurement of intracellular Ca²⁺, thromboxane A₂ (TXA₂) formation, platelet aggregation, secretion, and F-actin content, platelets were isolated from PRP by centrifugation at $800 \times g$ in the presence of $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ prostaglandin E₁ and 0.5 U mL^{-1} apyrase. The pellet was washed in modified Tyrode's buffer (135 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 2.9 mM KCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 5 mM D-glucose, 10 mM Hepes, 0.35% bovine serum albumin [BSA], pH 7.4, 37 °C) containing $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ prostaglandin E₁ and 0.5 U mL^{-1} apyrase. After centrifugation, platelets were resuspended to a density of 2.5×10^5 platelets μL^{-1} in modified Tyrode's buffer. For western blot analysis and immunoprecipitation experiments, platelets were purified from PRP in the presence of $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ eptifibatid and 0.5 U mL^{-1} apyrase, with a density barrier of iodixanol (Optiprep Density Gradient Medium; Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium), and resuspended to a density of 2.5×10^5 platelets μL^{-1} in modified Tyrode's buffer before treatment and lysis. For AMPK assays on immunoprecipitates and immunoblotting, extracts were prepared as previously described [14].

Murine platelets AMPK– $\alpha 1$ knockout (KO) mice were generated as previously described [15]. Males aged 8–12 weeks were bled under sodium pentobarbital anesthesia ($25\text{--}35 \text{ mg kg}^{-1}$) from the retro-orbital plexus. Blood was collected in 1 : 6 acid–citrate–dextrose (ACD) solution with 1 U mL^{-1} apyrase. PRP was obtained by centrifugation at $800 \times g$ for 5 s, followed by 5 min at $100 \times g$. PRP from three mice was pooled and washed by adding two volumes of ACD. Platelets were pelleted for 10 min at $800 \times g$, and resuspended to a density of 2.5×10^5 platelets μL^{-1} in modified Tyrode's buffer for the measurement of platelet aggregation, activation, and F-actin content, and for western blot analysis and immunoprecipitation experiments. At least three independent experiments were performed on washed platelets from different pools.

Measurement of platelet aggregation and ATP secretion analyses

Light transmission during thrombin-induced aggregation in washed human and murine platelets was recorded at 37 °C, with constant stirring (1200 r.p.m.), in an aggregometer (Chrono-Log Stago, Leiden, The Netherlands). ATP secretion was monitored in washed platelets in parallel with platelet aggregation by adding firefly luciferase and luciferin and comparing the luminescence generated by platelet ATP release with an ATP standard (Chrono-Lume; Stago, Leiden, The Netherlands). At least three independent experiments were performed on platelets from different individuals.

Detection of CD62P and PAC1/JON/A by flow cytometry, western blotting, cytosolic Ca²⁺ measurement, measurement of thromboxane B₂ (TXB₂) formation, and quantitation of F-actin

Please see the supporting information Part S1.

Enzyme assays

AMPK activity was measured as previously described after immunoprecipitation of 50 µg of platelet extracts with 10 µg of AMPK- α 1 or AMPK- α 2 antibodies [14].

Liver kinase B1 (LKB1) was immunoprecipitated from platelet lysate protein (1 mg) incubated at 4 °C for 1 h on a shaking platform with 5 µL of protein G–Sepharose covalently conjugated to 2 µg of human LKB1 antibody or preimmune IgG. LKB1 activity was measured with LKBtide, as previously described [16].

Microscopic analysis of platelet spreading

Glass coverslips were coated overnight with fibrinogen (100 µg mL⁻¹), and this was followed by surface blocking with BSA (5 mg mL⁻¹ in phosphate-buffered saline [PBS]). Washed platelets in Hepes/Tyrode buffer (20 × 10³ platelets µL⁻¹) were stimulated or not stimulated with thrombin (0.05 U mL⁻¹) in the presence of CaCl₂ (2 mM) just before being exposed to the surface at 37 °C. After 1 h, non-adherent platelets were discarded, and surface-bound platelets were washed three times with PBS. Coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde, washed with PBS, and permeabilized with blocking buffer (PBS, 0.1% SDS + 1% BSA) containing tetramethylrhodamine isothiocyanate–phalloidin (1 : 100) for 1 h in the dark. Coverslips were mounted with Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) on glass slides, and visualized with a Zeiss (× 100 oil immersion) fluorescent microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with ApoTome (Axio Imager).

Clot retraction assay

PRP (adjusted to 6 × 10⁵ platelets µL⁻¹ for murine platelets, 300 µL) was obtained by centrifugation of whole

blood at 800 × g for 5 s, followed by 5 min at 100 × g. Clot formation was initiated by the addition of 300 µL of a solution containing thrombin (1 U mL⁻¹, final concentration) in the presence of CaCl₂ (2 mM, final concentration). The clots were allowed to retract for up to 1 h at 37 °C, and were photographed at different time points. The extent of retraction was quantified by the Image J program (Version 1.440; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), and retraction was expressed as a percentage ([final clot size/initial clot size] × 100).

Study population

Six consecutive patients scheduled for elective cardiopulmonary bypass (CPB) surgery were recruited. None of them received antiplatelet agents for at least 5 days before surgery. Patients who had suffered from acute coronary syndrome or another thrombotic process in a period of 6 months before surgery were also excluded. A first blood sample was drawn during CPB surgery, after bolus administration of unfractionated heparin (UFH) (to achieve an activated clotting time [ACT] of > 450 s). A second blood sample was taken 4 h after surgery in the intensive care unit (ICU) and after blood coagulation correction. Thrombin time (TT) (Thromboclotin; Siemens, Saint-Denis, France) and activated partial thromboplastin time (APPT) (Platelin L; bioMérieux, Craonne, France) were measured in a tube containing 0.129 M trisodium citrate in a coagulation device (MDA 2; bioMérieux).

In addition, multiplate analysis was performed in the postoperative setting (4 h) to exclude patients showing platelet dysfunction after CBP surgery.

Statistics

The mean and standard error of the mean were calculated for all experimental groups. The significance of differences between the mean values of different groups was determined with GRAPH PAD PRISM (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), by the use of a two-tailed unpaired Student's test and analysis of variance (ANOVA), as appropriate. *P* < 0.05 was considered to be significant.

Results

CaMKK β -dependent AMPK- α 1 activation is induced by thrombin in human platelets

AMPK- α 1, but not AMPK- α 2, was detected in purified human platelets (Fig. 1A). AMPK- α 1 was activated three-fold upon stimulation with 0.1 U mL⁻¹ thrombin (Fig. 1B). AMPK- α 1 activation resulted in increased phosphorylation on Ser79 of ACC, the downstream substrate of AMPK (Fig. 1C). Dose–response curves for activating peptides for protease-activated receptor (PAR)1 (PAR1-

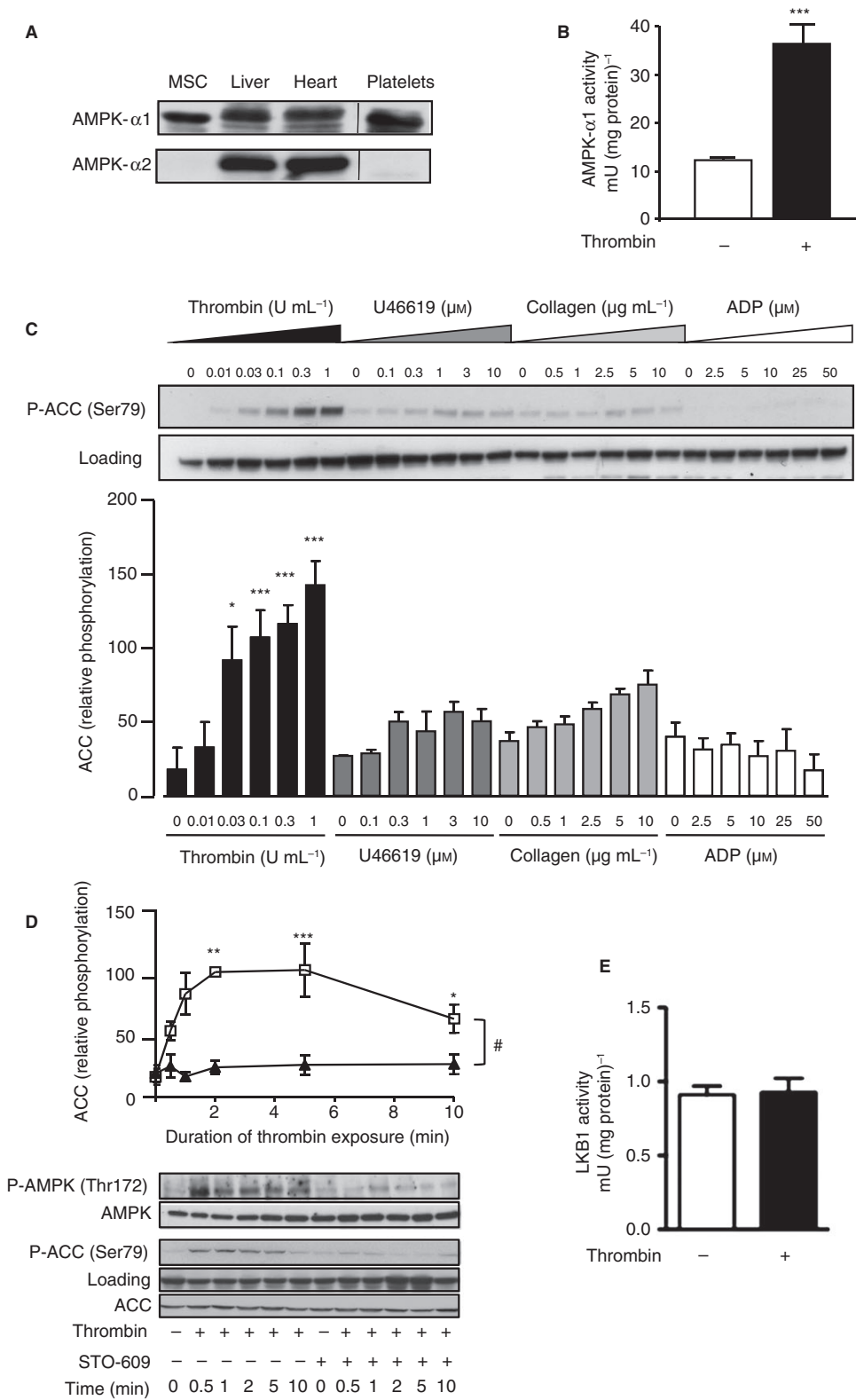


Fig. 1. Thrombin-induced AMP-activated protein kinase (AMPK)- $\alpha 1$ activation in human platelets. (A) Western blot analysis of AMPK- $\alpha 1$ and AMPK- $\alpha 2$ expression in extracts of mouse mesenchymal stem cells (MSCs), rat liver, rat heart, and human platelets. MSC (AMPK- $\alpha 1$ expression) and liver and heart (AMPK- $\alpha 1$ and AMPK- $\alpha 2$ expression) served as positive controls. A solid line is included to denote that samples were run on the same gel but were not contiguous. (B) Purified platelets were incubated with 0.1 U mL^{-1} thrombin for 1 min prior to cell lysis. Platelet lysates were immunoprecipitated with anti-AMPK- $\alpha 1$ antibody for AMPK assays. The data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of four independent experiments. $***P < 0.001$ as compared with controls without thrombin. (C) Acetyl-CoA carboxylase (ACC) phosphorylation in purified human platelets incubated with increasing doses of thrombin, U46619, collagen and ADP for 2 min prior to cell lysis. A representative blot is shown in the upper panel, and data quantification for phospho-ACC (P-ACC) is shown in the lower panel. The results are the mean \pm SEM of three separate experiments. $*P < 0.05$ and $***P < 0.001$ as compared with corresponding control values. (D) ACC phosphorylation in purified platelets incubated in the presence (\blacktriangle) or absence (\square) of $10 \mu\text{M}$ STO-609 for 2 min prior to stimulation with 0.1 U mL^{-1} thrombin for the indicated times. Representative blots of phospho-AMPK (P-AMPK) and P-ACC are shown in the lower panel, and data quantification for P-ACC is shown in the upper panel. The data are expressed as mean \pm SEM, $n = 7$. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ as compared with corresponding control values; $\#P < 0.05$ represents a statistical difference between the treatment with thrombin in the presence (\blacktriangle) and absence (\square) of STO-609. (E) Liver kinase B1 (LKB1) activity was determined in anti-LKB1 immune complexes isolated from 1 mg of platelet lysate after stimulation with 0.1 U mL^{-1} thrombin for 1 min prior to cell lysis. The data are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments.

AP) and for PAR4 (PAR4-AP) showed that maximal ACC phosphorylation was observed at concentrations of $0.3 \mu\text{M}$ PAR1-AP and $300 \mu\text{M}$ PAR4-AP, confirming that PAR1 is the main mediator of thrombin-induced signaling in human platelets (Fig. S1). Other platelet agonists – U46619, a potent and stable TXA₂ receptor agonist, collagen, and ADP – barely affected ACC phosphorylation as compared with thrombin (Fig. 1C). CaMKK β , an upstream kinase of AMPK, is an obvious candidate for mediating thrombin-induced AMPK activation in platelets. In human platelet extracts, anti-CaMKK β antibody recognized two bands at $\sim 65 \text{ kDa}$, probably corresponding to distinct isoforms encoded by splice variants (Fig. S2A). Moreover, the presence of this AMPK kinase in platelets is supported by the study of Rowley *et al.* [17] on mouse and human platelet transcriptomes. STO-609 ($10 \mu\text{M}$), a selective CaMKK β inhibitor, completely blocked AMPK activation by thrombin, as demonstrated by reduced AMPK and ACC phosphorylation on Thr172 and Ser79, respectively (Fig. 1D). In contrast, STO-609 did not prevent ACC phosphorylation when platelets were treated with A-769662, a specific pharmacologic activator of AMPK, making a direct inhibitory effect of STO-609 on AMPK unlikely (Fig. S2B). LKB1, the other AMPK kinase, was not activated in response to thrombin (Fig. 1E), and therefore cannot be responsible for the thrombin-induced AMPK activation and the subsequent ACC phosphorylation.

CaMKK β -dependent platelet aggregation is induced by thrombin in human platelets

STO-609 inhibited thrombin-induced platelet aggregation (Fig. 2A,B) but did not affect aggregation induced by low concentrations of U46619 (0.3 and $1 \mu\text{M}$), collagen (2.5 and $5 \mu\text{g mL}^{-1}$), or ADP (2.5 and $10 \mu\text{M}$) (Fig. S3). It also significantly suppressed PAC-1 binding in response to thrombin (Fig. 2C), indicating reduced activation of $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ integrin on the platelet surface. This might be attributable to a reduction in secretion. Therefore, α -granule and dense granule release were evaluated by measur-

ing P-selectin (CD62P) on the platelet surface and ATP secretion, respectively. STO-609 significantly inhibited CD62P exposure on platelets and ATP secretion after stimulation with thrombin (Fig. 2D,E), but not in response to other agonists (Fig. S3). This inhibitory effect did not result from an alteration of Ca²⁺ signaling. Indeed, this compound did not modify the increase in Ca²⁺ concentration in response to thrombin (Fig. S4A). Moreover, STO-609 did not affect thrombin-induced TXB₂ production (Fig. S4B).

CaMKK β -dependent phosphorylation of MLCs, VASP and cofilin in human platelets is stimulated by thrombin

The CaMKK β -AMPK- $\alpha 1$ pathway tightly regulates actin cytoskeletal contraction and organization. The latter is crucial for platelet aggregation. Accordingly, the phosphorylation state of cytoskeletal targets downstream of CaMKK β -AMPK, namely, MLCs, cofilin, and VASP, was studied after stimulation with thrombin. MLC phosphorylation on Ser19 was detected at 30 s, and reached a maximum 2 min after thrombin addition (Fig. 3A). STO-609 significantly reduced MLC Ser19 phosphorylation (Fig. 3A). In endothelial cells treated with thrombin, AMPK controls VASP by phosphorylating Thr278 [13]. In purified human thrombin-stimulated platelets, VASP Thr278 phosphorylation increased transiently from 30 s until 2 min, and returned to control values after 10 min (Fig. 3B). This phosphorylation was significantly reduced in the presence of STO-609 (Fig. 3B). Finally, Fig. 3C shows that thrombin led to increased cofilin phosphorylation on Ser3, which persisted for 10 min. A decrease in cofilin phosphorylation was observed in the presence of STO-609 (Fig. 3C). Taken together, these findings show that the phosphorylation state of cytoskeletal targets was clearly affected by pharmacologic inhibition of CaMKK β -AMPK- $\alpha 1$.

Actin cytoskeletal rearrangements upon thrombin stimulation include actin polymerization. To investigate the influence of CaMKK β on actin polymerization, we measured the F-actin/free globular actin ratio in platelets

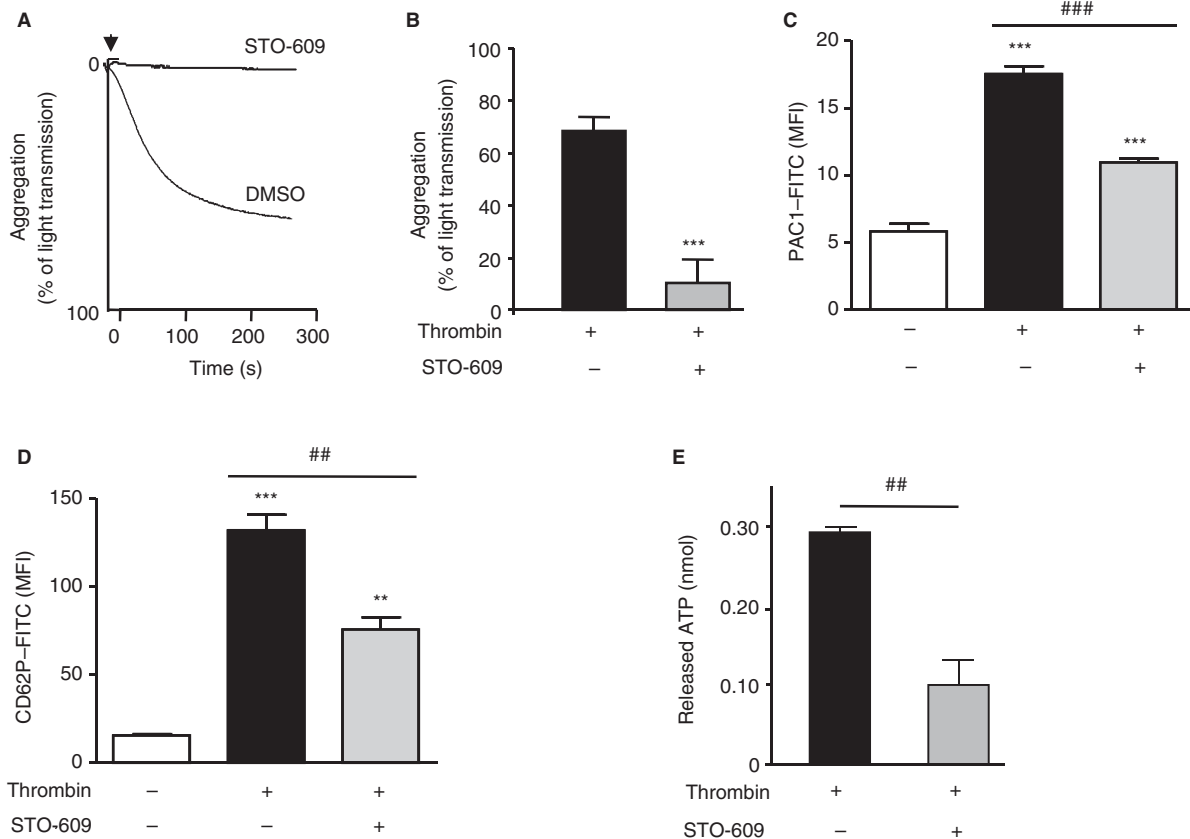


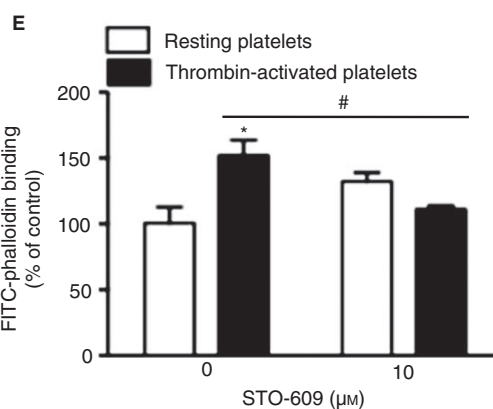
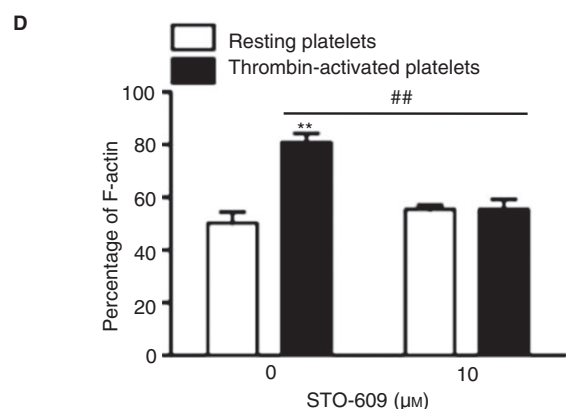
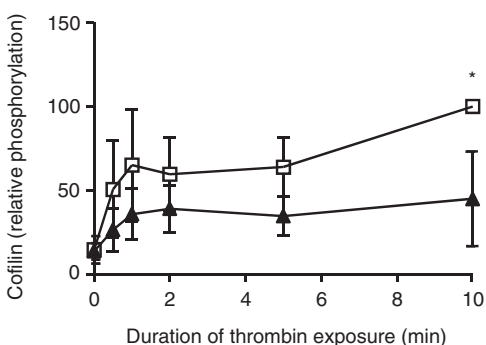
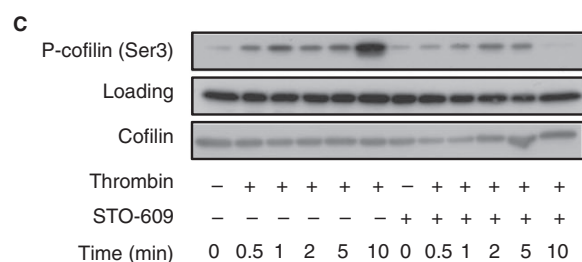
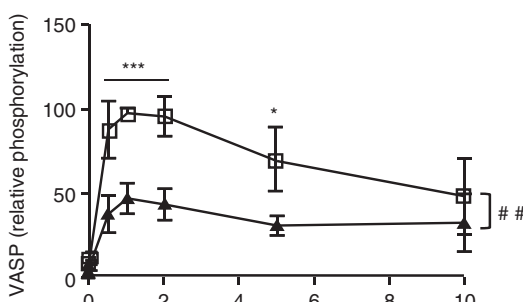
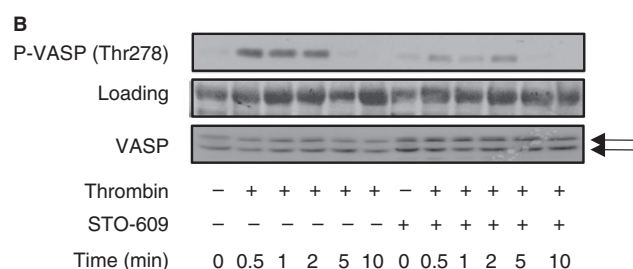
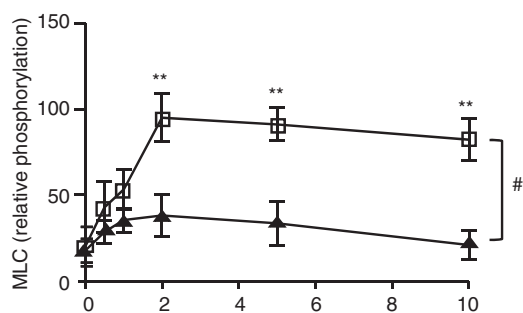
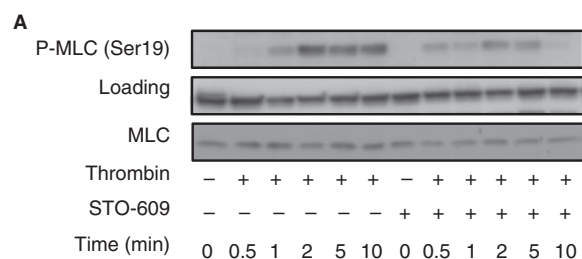
Fig. 2. The Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase kinase β -AMP-activated protein kinase- $\alpha 1$ pathway regulates thrombin-induced human platelet aggregation and secretion. (A) Washed platelets were incubated for 2 min with $10 \mu M$ STO-609, prior to thrombin stimulation ($0.03 U mL^{-1}$). Percentage of light transmission was measured by aggregometry (Chrono-Log). (B) Quantification of data from 10 independent experiments, expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). $***P < 0.001$ as compared with corresponding control values. (C–E) Effect of STO-609 on thrombin-induced $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation (C), α -granule secretion (D), and ATP secretion (E). Washed platelets were incubated with $10 \mu M$ STO-609 for 2 min prior to stimulation with $0.03 U mL^{-1}$ thrombin. The results are the mean \pm SEM, $n = 5$. $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ as compared with corresponding control values; $##P < 0.01$ and $###P < 0.001$ represent a statistical difference between the treatment with thrombin in the presence and absence of STO-609. DMSO, dimethylsulfoxide; FITC, fluorescein isothiocyanate; MFI, mean fluorescence units.

treated with thrombin in the presence or absence of STO-609. Figure 3D shows that inhibition of CaMKK β prevented the increase in F-actin induced by thrombin stimulation. These results were confirmed by detecting F-actin with flow cytometry (Fig. 3E).

Reduced aggregation of AMPK- $\alpha 1$ -deficient murine platelets

Both catalytic subunits of AMPK, namely AMPK- $\alpha 1$ and AMPK- $\alpha 2$, are expressed in murine platelets, as described previously [18] (Fig. 4A). ACC was phosphorylated upon

Fig. 3. The Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase kinase β -AMP-activated protein kinase- $\alpha 1$ pathway contributes to thrombin-induced phosphorylation of cytoskeletal proteins and actin polymerization in human platelets. Purified platelets were incubated with $0.1 U mL^{-1}$ thrombin in the presence (\blacktriangle) or absence (\square) of $10 \mu M$ STO-609, and lysates were harvested for western blotting. (A–C) Representative blots showing myosin light chain (MLC) (A), vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) (B) and cofilin (C) phosphorylation states are shown in the left panels. Quantitative results are shown in the right panels. The data are mean \pm standard error of the mean (SEM), $n = 6$. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ as compared with corresponding control values. $\#P < 0.05$ and $##P < 0.01$ represent a statistical difference between the treatment with thrombin in the presence and absence of STO-609). (D) Globular actin and filamentous actin (F-actin) were detected with actin antibody, and the percentage of F-actin was quantified. Bars represent mean \pm SEM, $n = 4$. $**P < 0.01$ as compared with corresponding control values. $##P < 0.01$ represents a statistical difference between the treatment with thrombin in the presence and absence of STO-609). (E) Platelets were stained with $10 \mu M$ fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin and analyzed with flow cytometry. Data are expressed as percentage of control of resting platelets that were incubated with vehicle alone. Bars represent mean \pm SEM, $n = 4$. $*P < 0.05$ as compared with corresponding control values. $\#P < 0.05$ represents a statistical difference between the treatment with thrombin in the presence and absence of STO-609). P-cofilin, phospho-cofilin; P-MLC, phospho-MLC; P-VASP, phospho-VASP.



thrombin stimulation (Fig. 4B). In contrast to what was seen in human platelets, thrombin, TXA₂ and collagen led to similar levels of ACC phosphorylation (Fig. 4C). The isoform's contribution to AMPK activation of thrombin-stimulated murine platelets was determined by

measuring ACC phosphorylation in platelets from AMPK-α1 KO and AMPK-α2 KO mice as compared with their wild-type (WT) littermates. AMPK-α1 made a major contribution to mediating ACC phosphorylation in response to thrombin and to other platelet agonists as

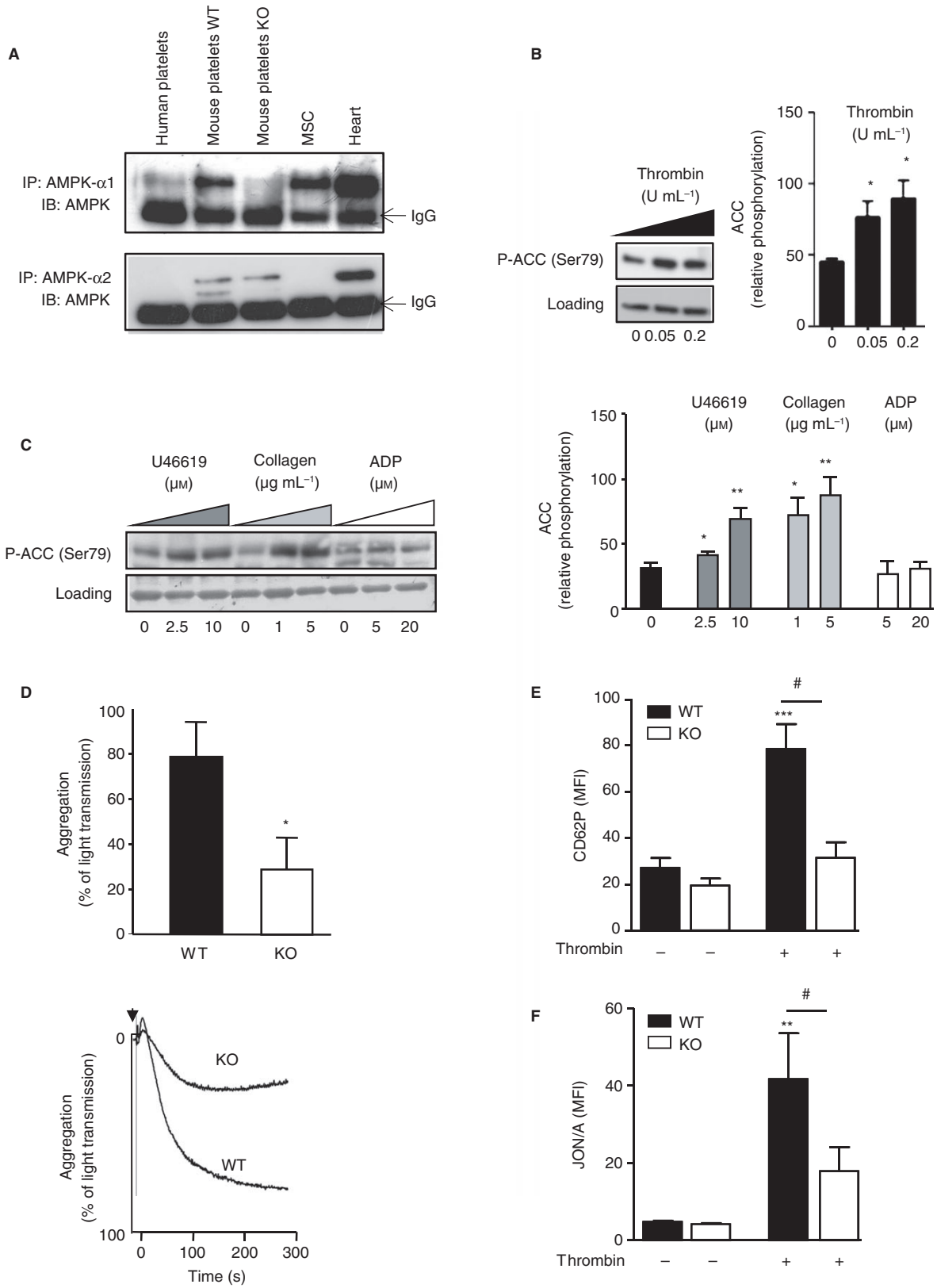


Fig. 4. Role of AMP-activated protein kinase (AMPK)- $\alpha 1$ in murine platelet aggregation and secretion. (A) Platelet lysates from wild-type (WT) and AMPK- $\alpha 1$ knockout (KO) mice were immunoprecipitated with anti-AMPK- $\alpha 1$ and anti-AMPK- $\alpha 2$ antibodies, and analyzed by western blotting with total anti-AMPK antibody. Human platelets, mouse mesenchymal stem cells (MSCs) and rat heart extracts were positive controls for the detection of AMPK- $\alpha 1$ and AMPK- $\alpha 2$, respectively. (B, C) Washed murine platelets were incubated with increasing doses of (B) thrombin (0.05; 0.2 U mL⁻¹) or (C) U46619 (2.5; 10 μ M), collagen (1; 5 μ g mL⁻¹) and ADP (5; 20 μ M) for 2 min prior to cell lysis and western blot analysis for acetyl-CoA carboxylase (ACC) phosphorylated on Ser79. Representative blots are shown in the left panel, and data quantification for phospho-ACC (P-ACC) is shown in the right panel. The results are the mean \pm standard error of the mean (SEM) of six separate experiments. * P < 0.05 as compared with control values. (C) Washed platelets were stimulated with thrombin (0.05 U mL⁻¹) before measurement of aggregation. A representative aggregation tracing is shown in the lower panel. The results are represented as mean \pm SEM, n = 4. * P < 0.05 as compared with the WT value. (D, E) α -Granule secretion (D) and $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation (E). Washed platelets were incubated for 5 min with thrombin (0.05 U mL⁻¹) before analysis with flow cytometry. Quantification of the respective data is presented as mean \pm SEM, n = 5. ** P < 0.01 and *** P < 0.001 as compared with control WT values. # P < 0.05 represents a statistical difference between platelets from WT and AMPK- $\alpha 1$ KO mice treated with thrombin. IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitation.

compared with AMPK- $\alpha 2$ (Fig. S5). On the basis of this observation and on our demonstration that AMPK- $\alpha 1$ accounted for all of the AMPK in human platelets, we measured thrombin-induced platelet aggregation and secretion in AMPK- $\alpha 1$ KO mice. At 0.05 U mL⁻¹ thrombin, platelets from KO mice had a clear aggregation defect, implicating the $\alpha 1$ catalytic subunit in platelet function (Fig. 4D). AMPK- $\alpha 1$ deficiency inhibited platelet secretion after thrombin stimulation (Fig. 4E) and reduced the amount of activated $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fig. 4F). A slight aggregation defect was detected upon U46619 and collagen stimulation in platelets from AMPK- $\alpha 1$ KO mice (Fig. S6A,B), and was associated with a decrease in ATP secretion (Fig. S6C). However, after stimulation with 5 μ M U46619 and 2.5 μ g mL⁻¹ collagen, α -granule secretion and subsequent P-selectin exposure on the platelet surface were not sufficiently increased under static conditions for a difference between WT and KO platelets to be detected (Fig. S6D).

Regulation of MLC, VASP and cofilin phosphorylation by AMPK- $\alpha 1$ and its impact on actin polymerization in thrombin-stimulated murine platelets

The experiment illustrated in Fig. 5A shows that the increase in thrombin-induced ACC phosphorylation was reduced by $\sim 75\%$ in platelets from AMPK- $\alpha 1$ KO mice as compared with those from WT mice, meaning that the residual phosphorylation resulted from AMPK- $\alpha 2$ activation. Altered function of platelets isolated from KO mice was associated with changes in MLC, VASP and/or cofilin phosphorylation. As in human platelets, 0.05 U mL⁻¹ thrombin induced increases in MLC, VASP and cofilin phosphorylation in mouse platelets. The phosphorylation was significantly reduced in platelets from AMPK- $\alpha 1$ KO littermates (Fig. 5B–D), and was associated with abrogation of thrombin-dependent F-actin formation, as demonstrated by flow cytometry (Fig. S7). Platelet spreading and fibrin clot retraction are both dependent on the actin cytoskeleton. We therefore examined the mean area covered by the adhering platelets and the formation of filopodia and lamellipodia after immobilization on fibrinogen-coated coverslips and stimulation with throm-

bin for 60 min. Whereas the surface areas of the spread WT and KO platelets were similar at this time point, the percentage of platelets able to form lamellipodia was significantly reduced in the absence of AMPK- $\alpha 1$ (Fig. 5E–G), indicating altered cytoskeletal reorganization in spread KO platelets. More importantly, clot retraction was slower and less effective in KO platelets (Fig. 5H).

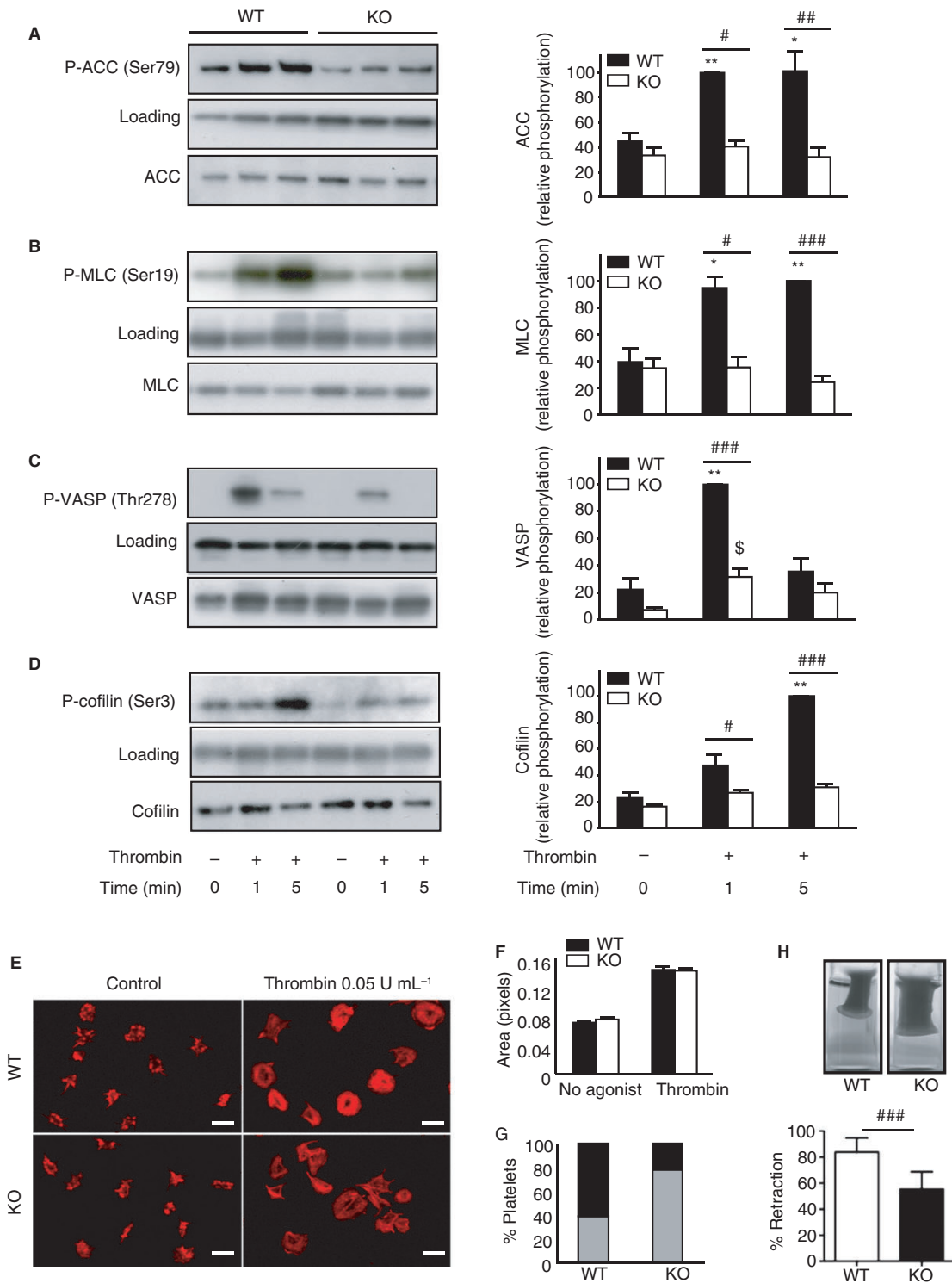
In vivo activation of the AMPK pathway by thrombin in human platelets from patients undergoing major surgery

In order to determine whether the AMPK pathway was also activated *in vivo* by thrombin, we studied ACC phosphorylation in platelets from patients undergoing major cardiac surgery. Under these conditions, the coagulation cascade is fully activated. During cardiac surgery, patients were subjected to CPB requiring heparin administration to block thrombin generation. This gave us a unique opportunity to assess ACC phosphorylation in the same patients, under two extreme conditions, in terms of thrombin generation: CPB (in the presence of heparin), and postsurgery in the ICU (normal coagulation). During CPB, the mean ACT was 568 ± 65 s, and the APTT and TT were over 180 s and 120 s, respectively. The ability to coagulate was restored 4 h after surgery (APTT, 30 ± 2 s; TT, 25 ± 3 s). The International Normalized Ratio and fibrinogen level were normal (not shown), and the platelet count was $> 10^5$ mm⁻³ for each patient. ACC phosphorylation increased significantly postsurgery (with normal coagulation) as compared with during CPB (under high-dose UFH) (Fig. 6A,B).

Discussion

With pharmacologic and genetic approaches, our study demonstrates that inhibition of the CaMKK β -AMPK- $\alpha 1$ pathway in both mice and humans is associated with altered platelet aggregation in response to thrombin.

This pathway controls the phosphorylation of cytoskeletal targets and actin polymerization, which are known to be crucial in platelet contraction and shape change. More importantly, we show, for the first time, that the AMPK pathway is activated in human platelets.



In human platelets, PAR1 and PAR4 mediate most of the response to thrombin. However, the concentration of PAR4-AP necessary to induce ACC phosphorylation was 300-fold higher than that of PAR1-AP (Fig. S1), confirm-

ing that PAR1 is the main receptor for thrombin in human platelets. In contrast, mouse platelets express PAR3 and PAR4. Activation of mouse platelets by thrombin completely depends on PAR4, as demonstrated

Fig. 5. The AMP-activated protein kinase- $\alpha 1$ pathway contributes to thrombin-induced phosphorylation of cytoskeletal proteins, actin polymerization, spreading and clot retraction in murine platelets. (A–D) Washed platelets were incubated with 0.05 U mL^{-1} thrombin for the indicated times. Representative blots of phospho-acetyl-CoA carboxylase (P-ACC) (A), phospho-myosin light chain (P-MLC) (B), phospho-vasodilator-stimulated phosphoprotein (P-VASP) (C) and phospho-cofilin (P)-cofilin (D) are shown in the left panels. Quantitative results are plotted in histograms (right panels). The data are mean \pm standard error of the mean (SEM), $n = 5$. $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ as compared with control wild-type (WT) values. $^{\$}P < 0.05$ as compared with control knockout (KO) values. $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$ and $\#\#\#P < 0.001$ represent a statistical difference between platelets from WT and AMPK- $\alpha 1$ KO mice treated with thrombin. (E–G) Washed platelets were plated on fibrinogen-coated coverslips for 60 min, in the presence or absence of 0.05 U mL^{-1} thrombin. (E) Cells were fixed, permeabilized, and stained with rhodamine-phalloidin to visualize actin. Scale bar: $5 \mu\text{m}$. (F) Quantification of platelet surface area outlined by computer analysis. (G) The percentage of platelets showing lamellipodia (black bar) and/or filopodia (gray bar). Histograms represent the mean values from 250 platelets. (H) Clot retraction assessed at 1 h after addition of thrombin. The images in upper panel show a representative result. Data are presented as mean \pm SEM, $n = 3$. $\#\#\#P < 0.001$ represents a statistical difference between platelets from WT and AMPK- $\alpha 1$ KO mice treated with thrombin.

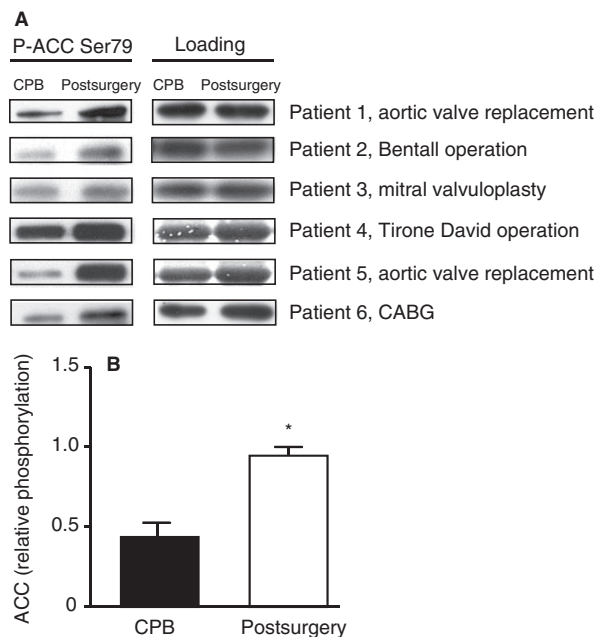


Fig. 6. Clinical evidence of AMP-activated protein kinase activation in human platelets after major cardiac surgery. Blood samples were drawn from six patients during cardiopulmonary bypass (CPB) surgery and 4 h after surgery. Human platelet lysates were analyzed by western blotting with antibody against phospho-acetyl-CoA carboxylase (P-ACC) (Ser79) (A) and quantified by densitometry after normalization to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression (B). The data are expressed as mean \pm standard error of the mean, $n = 6$. $*P < 0.05$ as compared with CPB values. CABG, coronary artery bypass graft.

by the absence of response to thrombin of platelets from *PAR4 KO* mice, despite the presence of *PAR3* [19]. This could explain, at least in part, the different responses to agonists in human and mouse platelets.

The hypothesis that AMPK is involved in platelet function has been advanced in a previous study [18]. The authors reported that AMPK- $\alpha 2$ appears to be more important than AMPK- $\alpha 1$ in the regulation of platelet function. We cannot exclude the possibility that both AMPK catalytic isoforms control platelet aggregation in mice by acting on different targets. However, only AMPK- $\alpha 1$ was detected in highly purified human platelets

according to the Optiprep protocol. More importantly, our finding is strongly supported by Rowley, who identified both conserved and differential expression patterns in human and mouse platelet transcriptomes [17]. This study indicates that the gene encoding AMPK- $\alpha 2$, *PRKAA2*, belongs to the list of genes expressed in mouse platelet samples, but is not expressed in human platelets. We have thus confirmed that AMPK- $\alpha 2$ is not present in human platelets. This observation supports the concept that signaling events taking place in mouse platelets can diverge from those in human platelets.

LKB1 was proposed to be the main AMPK kinase in platelets [18]. Phosphorylation on Thr189 was indeed increased upon thrombin stimulation. However, LKB1 is a constitutively active kinase whose activity is set in cells by the relative levels of its two partners, STRAD and MO25 [16]. We measured LKB1 activity after coimmunoprecipitation of the enzymatic complex from platelet extracts. Our data show that there is no LKB1 activation after thrombin stimulation. Therefore, we used the STO-609 inhibitor to demonstrate that CaMKK β is the main AMPK kinase involved in AMPK activation in this condition. Several studies on platelet signaling have shown that short preincubation periods (60 s to 5 min) are mostly sufficient for maximal inhibition of kinases by pharmacologic inhibitors [20,21]. Indeed, a 2-min preincubation with $10 \mu\text{M}$ STO-609 completely blocked the thrombin-induced ACC phosphorylation and platelet aggregation. Again, these data are in disagreement with those of Randriamboavonjy *et al.* [18], who showed that STO-609 even tended to potentiate the thrombin-induced aggregation of human platelets. However, the duration of preincubation with the inhibitor before thrombin stimulation differed between our respective studies (2 min vs. 30 min). We have verified that a 30-min period of preincubation with STO-609 does not inhibit platelet aggregation (data not shown).

It was surprising to find that AMPK- $\alpha 1$ was mainly activated downstream of thrombin in human platelets, whereas the other agonists also induced an increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration. Although the Ca^{2+} level is obviously a determinant factor for CaMKK β activation, there should be additional Ca^{2+} -independent mechanisms involved in its regulation. In this respect, Green *et al.* [22]

recently reported a novel type of regulation of CaMKK β activity, i.e. by multisite phosphorylation. Further investigations should therefore consider the phosphorylation status of this AMPK kinase, in order to obtain a better understanding of its regulation in response to the different platelet agonists, and particularly in response to thrombin, in addition to the classic CaM binding.

We have already reported that the CaMKK β -AMPK- α 1 pathway triggers actin cytoskeletal remodeling in epithelial cells via indirect MLC and cofilin phosphorylation [12]. In platelets, RhoA signaling causes MLC phosphorylation. The molecular mechanism involves phosphorylation and inhibition of myosin phosphatase-targeting subunit-1 (MYPT1) by Rho kinase [23]. It is tempting to speculate that AMPK could indirectly regulate MLC phosphorylation in platelets by stimulating RhoA or via direct inhibition of MYPT1, a protein from the PPP1R12 family of protein phosphatase regulatory subunits. The latter hypothesis is supported by the work of Banko *et al.* [24], who identified MYPT1 and MBS85 as direct *in vivo* substrates of AMPK. In the same study, p21-activated protein kinase 2 (PAK2) was also described as a direct substrate of AMPK that is able to regulate MLC phosphorylation. The involvement of MBS85/MYPT1 and PAK2 in AMPK-dependent MLC phosphorylation in thrombin-treated platelets remains to be elucidated.

Besides RhoA, Ca²⁺-dependent Rac1 activation has been implicated in regulating aggregation in human platelets treated with thrombin, notably by stimulating rapid cofilin dephosphorylation/activation through a cofilin phosphatase [5,25]. This rapid first phase of cofilin dephosphorylation can only be detected from 0.2 U mL⁻¹ thrombin, and is followed by a second phase of LIM domain kinase 1 (LIMK1)-mediated slow cofilin rephosphorylation/inactivation [5]. Regulation of Rac1/LIMK1 by AMPK could explain the significant increase in cofilin phosphorylation that we observed upon thrombin stimulation. Supporting this hypothesis, Rac1 activation downstream of AMPK has already been described in various cell types [26,27]. Very recently, AMPK was shown to activate Tiam-1, a Rac guanine nucleotide exchange factor, in C2C12 cells [28]. As preincubation with STO-609 did not completely abolish the phosphorylation of cytoskeletal targets in human platelets, we cannot exclude the possibility that AMPK-independent pathways might also play a role in this regulation.

AMPK has also been recognized as a VASP kinase responsible for Thr278 and Ser322 phosphorylation [9,13]. VASP phosphorylation regulates VASP-driven actin filament formation and subcellular targeting of the protein *in vivo* [8]. In this regard, AMPK-mediated VASP phosphorylation on Thr278 and Ser322 interferes with F-actin accumulation, but has a minor impact on subcellular targeting. When platelets are activated, the extension

of filopodia is a rapid and transient phenomenon that is quickly superseded by the formation of lamellipodia, resulting in platelet spreading. Phosphorylation and rapid inhibition of VASP anticapping activity by AMPK might be crucial for the regulation of these dynamic structures in an adequate time range. Our results demonstrating that the percentage of platelets showing lamellipodia was significantly reduced in thrombin-stimulated KO platelets, after spreading on fibrinogen-coated coverslips, support this hypothesis. In consequence, it was not surprising to find that this altered cytoskeletal response was associated with slower and less effective clot retraction in KO platelets. However, we have to mention that Randriamboavonjy *et al.* [18] failed to show a significant difference in thrombin-induced clot retraction between platelets from AMPK- α 1 KO and WT mice.

Finally, we took advantage of the specific action of thrombin on ACC phosphorylation to demonstrate that the AMPK pathway was activated *in vivo* in platelets from patients undergoing cardiac surgery, a clinical situation associated with thrombin generation. Our preliminary clinical data clearly indicate that ACC phosphorylation is a potential indicator of thrombin response *in vivo*.

In conclusion, we have delineated a CaMKK β -AMPK- α 1-dependent pathway contributing to murine and human platelet aggregation upon thrombin stimulation, via MLC, VASP and cofilin phosphorylation and cytoskeletal reorganization. This pathway is activated in a heparin-sensitive manner in platelets of patients undergoing major cardiac surgery.

Addendum

S. Horman and C. Beauloye designed the study and wrote the paper. M. B. Onselae performed the experiments. C. Oury, J. L. Vanovershelde, and L. Bertrand contributed to the analysis and interpretation of data. S. Eeckhoudt participated in aggregation studies on human platelets. C. Lecut helped with the aggregation studies on murine platelets. N. Morel participated in Ca²⁺ measurements. N. Barile and L. M. Jacquet contributed to blood sampling in patients in the ICU.

Acknowledgements

This work was made possible by grants from Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS), Belgium. M.-B. Onselae was supported by a grant from Fonds Spéciaux de Recherche (FSR), by a Bourse du Patrimoine, Université catholique de Louvain, and by the Salus Sanguinis Foundation, Belgium. S. Horman, L. Bertrand and C. Oury are Research Associates of FNRS, and C. Beauloye is an MD postdoctoral fellow, FNRS, Belgium. We thank N. Marquet for his expert technical assistance.

Disclosure of Conflict of Interests

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:

Part S1: Supplemental Materials and Methods.

Part S2: Supplemental data.

Fig. S1. Effect of activating peptides for PAR1 and PAR4 on ACC phosphorylation in human platelets.

Fig. S2. (A) Western blot analysis of CaMKK β expression in extracts from human platelets. (B) Lack of effect of STO-609 on ACC phosphorylation induced by A-769662 treatment in human platelets.

Fig. S3. Aggregation and ATP secretion analyses.

Fig. S4. (A) Assessment of Ca²⁺ release in response to various agonists in the presence or absence of STO-609. (B) Assessment of TXB₂ levels in platelet supernatants.

Fig. S5. AMPK- α 1 regulates thrombin-induced, U46619-induced and collagen-induced ACC phosphorylation in murine platelets.

Fig. S6. Role of AMPK- α 1 in murine platelet aggregation and secretion, in response to various agonists.

Fig. S7. Role of AMPK- α 1 in thrombin-dependent F-actin formation.

References

- Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; **109**: 5087–95.
- Johnson GJ, Leis LA, Krumwiede MD, White JG. The critical role of myosin IIA in platelet internal contraction. *J Thromb Haemost* 2007; **5**: 1516–29.
- Fox JE. Regulation of platelet function by the cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol* 1993; **344**: 175–85.
- Getz TM, Dangelmaier CA, Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional implications in platelets. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 2283–93.
- Pandey D, Goyal P, Dwivedi S, Siess W. Unraveling a novel Rac1-mediated signaling pathway that regulates cofilin dephosphorylation and secretion in thrombin-stimulated platelets. *Blood* 2009; **114**: 415–24.
- Hansen SD, Mullins RD. VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *J Cell Biol* 2010; **191**: 571–84.
- Pula G, Schuh K, Nakayama K, Nakayama KI, Walter U, Poole AW. PKC δ regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation. *Blood* 2006; **108**: 4035–44.
- Benz PM, Blume C, Seifert S, Wilhelm S, Waschke J, Schuh K, Gertler F, Munzel T, Renne T. Differential VASP phosphorylation controls remodeling of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2009; **122**: 3954–65.
- Thomson DM, Ascione MP, Grange J, Nelson C, Hansen MD. Phosphorylation of VASP by AMPK alters actin binding and occurs at a novel site. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **414**: 215–19.
- Stahmann N, Woods A, Carling D, Heller R. Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 5933–45.
- Witters LA, Kemp BE, Means AR. Chutes and ladders: the search for protein kinases that act on AMPK. *Trends Biochem Sci* 2006; **31**: 13–16.
- Miranda L, Carpentier S, Platek A, Hussain N, Gueuning MA, Vertommen D, Ozkan Y, Sid B, Hue L, Courtoy PJ, Rider MH, Horman S. AMP-activated protein kinase induces actin cytoskeleton reorganization in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **396**: 656–61.
- Blume C, Benz PM, Walter U, Ha J, Kemp BE, Renne T. AMP-activated protein kinase impairs endothelial actin cytoskeleton assembly by phosphorylating vasodilator-stimulated phosphoprotein. *J Biol Chem* 2007; **282**: 4601–12.
- Horman S, Morel N, Vertommen D, Hussain N, Neumann D, Beauloye C, El Najjar N, Forcet C, Viollet B, Walsh MP, Hue L, Rider MH. AMP-activated protein kinase phosphorylates and desensitizes smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 2008; **283**: 18505–12.
- Jorgensen SB, Viollet B, Andreelli F, Frosig C, Birk JB, Schjerling P, Vaulont S, Richter EA, Wojtaszewski JF. Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1070–9.
- Sakamoto K, Goransson O, Hardie DG, Alessi DR. Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **287**: E310–17.
- Rowley JW, Oler AJ, Tolley ND, Hunter BN, Low EN, Nix DA, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS. Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* 2011; **118**: e101–11.
- Randriamboavonjy V, Isaak J, Fromel T, Viollet B, Fisslthaler B, Preissner KT, Fleming I. AMPK alpha2 subunit is involved in platelet signaling, clot retraction, and thrombus stability. *Blood* 2010; **116**: 2134–40.
- Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 1800–14.
- 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.
- Xiang B, Zhang G, Stefanini L, Bergmeier W, Gartner TK, Whiteheart SW, Li Z. The Src family kinases and protein kinase C synergize to mediate Gq-dependent platelet activation. *J Biol Chem* 2012; **287**: 41277–87.
- Green MF, Scott JW, Steel R, Oakhill JS, Kemp BE, Means AR. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta is regulated by multisite phosphorylation. *J Biol Chem* 2011; **286**: 28066–79.
- Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* 1999; **147**: 1023–38.
- Banko MR, Allen JJ, Schaffer BE, Wilker EW, Tsou P, White JL, Villen J, Wang B, Kim SR, Sakamoto K, Gygi SP, Cantley LC, Yaffe MB, Shokat KM, Brunet A. Chemical genetic screen for AMPKalpha2 substrates uncovers a network of proteins involved in mitosis. *Mol Cell* 2011; **44**: 878–92.
- Aslan JE, McCarty OJ. Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost* 2013; **11**: 35–46.
- Lee YM, Lee JO, Jung JH, Kim JH, Park SH, Park JM, Kim EK, Suh PG, Kim HS. Retinoic acid leads to cytoskeletal rearrangement through AMPK-Rac1 and stimulates glucose uptake

- through AMPK-p38 MAPK in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 2008; **283**: 33969–74.
- 27 Bae HB, Zmijewski JW, Deshane JS, Tadie JM, Chaplin DD, Takashima S, Abraham E. AMP-activated protein kinase enhances the phagocytic ability of macrophages and neutrophils. *FASEB J* 2011; **25**: 4358–68.
- 28 You GY, Lee JO, Kim JH, Kim N, Lee SK, Moon JW, Jie S, Lee HJ, Kim SJ, Park SH, Kim HS. Tiam-1, a GEF for Rac1, plays a critical role in metformin-mediated glucose uptake in C2C12 cells. *Cell Signal* 2013; **12**: 2558–65.

Supporting Information

Phosphorylation of cytoskeletal targets by CAMKK β /AMPK- α 1 in thrombin-stimulated human platelets

Materials

Human α -thrombin, AMP, ADP, ectonucleotidase apyrase (grade I), probenecid, Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated phalloidin, Optiprep®, PAR1 (SFLLRN) and PAR4 (AYPGKF) selective activating peptides (Sigma-Aldrich), Collagen (Nycomed), STO-609 and U46619 (Tocris), [γ ³²P]MgATP (Perkin Elmer), eptifibatide (Integrilin, GlaxoSmithKline), Protease and phosphatase inhibitor cocktail (ThermoFisher) and fluo-3/acetoxymethyl ester (Santa Cruz Biotechnology) were procured from the suppliers indicated. Thromboxane B2 (TXB2) immunoassay kit was purchased from GE Healthcare. The G-actin/F-actin *in vivo* assay kit was from Cytoskeleton. The antibodies used were: AMPK- α 1/ α 2 (Kinasource); phospho-VASP (Thr 278) (ECM Bioscience); ACC, phospho-ACC (Ser 79) (ThermoFisher Perbio); MLC, cofilin, phospho-cofilin (Ser 3), p38, phospho-p38 and GAPDH (Cell Signaling); phospho-MLC (Ser 19) (Sigma-Aldrich); CaMKK β , β -actin, and gelsolin (Santa Cruz Biotechnology); FITC-conjugated anti-human or anti-mouse P-selectin antibody (CD62P) and anti-human α IIb β 3 (PAC1) (BD Biosciences), Phycoerythryn (PE)-labelled anti-mouse α IIb β 3 (JON/A) (Emfret Analytics) were from the suppliers indicated. The LKB1 antibody used for immunoprecipitation was from Dr K. Sakamoto (Nestlé Institute of Health Sciences SA, Lausanne, Switzerland) and was raised in sheep against full length human LKB1.

Methods

Detection of CD62P and PAC1/JON/A by flow cytometry

Washed platelets (2.5×10^5 platelets/ μl) were stimulated with thrombin for 5 min in the presence of CD62P-FITC or PAC1-FITC for human platelets and CD62P-FITC or JON/A-PE for murine platelets. The samples were fixed in 1% paraformaldehyde for 30 min at 4°C and analyzed by flow cytometry. Platelets were also incubated with nonimmune IgG, IgM or IgK isotype control antibodies. An average of 20,000 platelet events per sample was collected and analyzed for PAC-1/JON/A and CD62P mean fluorescence intensity (MFI).

Western blotting

Proteins were separated [12]. The membranes were probed with following antibodies: phospho-ACC (Ser79) 1:1,000, phospho-MLC (Ser19) 1:10,000, phospho-VASP (Thr278) 1:2,000, phospho-cofilin (Ser3) 1:2,000, phospho-p38 (Thr180/Tyr182) 1:1,000, AMPK- α 1 1:1,000, AMPK- α 2 1:1,000, ACC 1:1,000, MLC 1:5,000, VASP 1:2,000, cofilin 1:1,000, p38 1:1,000, CaMKK β 1:1,000, β -actin 1:50,000, GAPDH 1:10,000, gelsolin 1:2,000. Band intensities obtained with anti-phospho antibodies were normalized relative to those of a loading control on the same gel. The different loading controls used were anti- β -actin, anti-gelsolin or anti-GAPDH antibody. Immunoblotting with respective anti-total antibodies was performed on a different gel.

Measurement of TXB2 formation

Because TXA2 is very unstable and converts rapidly to TXB2, a more stable metabolite, we measured the latter instead of the former. After 2-min pre-incubation with 10 μ M STO-609 or DMSO, washed platelets were treated with 0.1 U/ml thrombin for 5 min. Negative controls corresponded to platelets activated by thrombin in the presence of 1 mM acetylsalicylic acid (ASA). Platelet suspensions were pelleted (quick speed), and TXB2 in the supernatants was assayed according to the manufacturer.

Cytosolic Ca²⁺ measurement

Washed platelets (2.5×10^5 platelets/ μ l) were incubated for 30 min at 37°C in the dark with fluo-3 AM (10 μ M). The samples were treated for 2 min in the presence or the absence of STO-609 10 μ M prior to be stimulated with thrombin 0.1 U/ml, U46619 1 μ M, Collagen 10 μ g/ml or ADP 10 μ M and directly analyzed by flow cytometry in presence of CaCl₂ (2 mM). Data points in each plot represent mean values (n=3) of fluo-3 fluorescence ratios (Rfluo-3 = agonist-stimulated platelet mean fluorescence / unstimulated platelet mean baseline fluorescence) for each analysis region defined in the time axis of the corresponding histogram.

Quantitation of F-actin

The amount of globular (G-actin) and filamentous actin (F-actin) in human platelets was determined using a G-actin/F-actin *in vivo* assay kit, according to the instructions of the manufacturer. Alternatively, FITC-phalloidin was used to quantify F-actin content in human and in murine platelets. After 5 min treatment, platelets at 2.5×10^5 cells/ml were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 37°C and permeabilized

with 0.1 volume of 1% Triton X-100 containing 10 μ M FITC-phalloidin for 1 h at 25°C. Samples were subsequently analyzed for fluorescence using flow cytometry. Data were expressed as percentage of control of resting platelets.

Figure S1

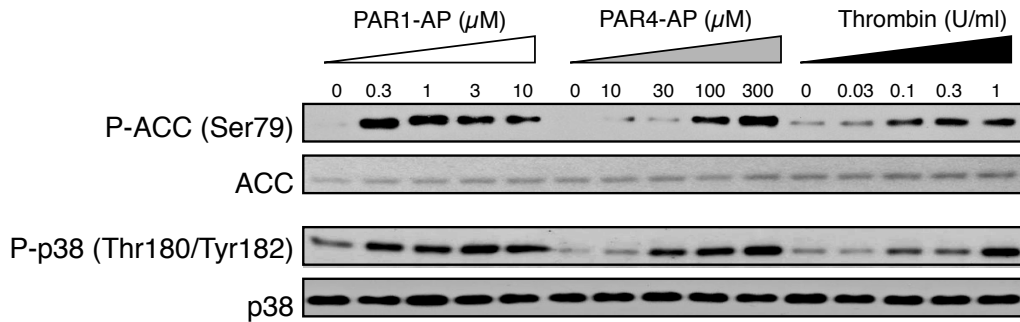


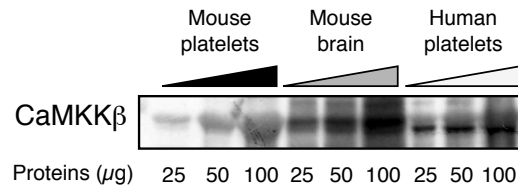
Figure S1.

Effect of activating peptides for PAR1 and PAR4 on ACC phosphorylation in human platelets.

Purified human platelets were incubated with increasing doses of activating peptide for PAR1 (PAR1-AP; SFLLRN), activating peptide for PAR4 (PAR4-AP; AYPGKF) or thrombin for 2 min prior to cell lysis and Western blot analysis for Ser79 ACC and Thr180/Tyr182 p38 (positive control for the response to agonists). Blots were probed with anti-total corresponding antibodies as loading controls.

Figure S2

A



B

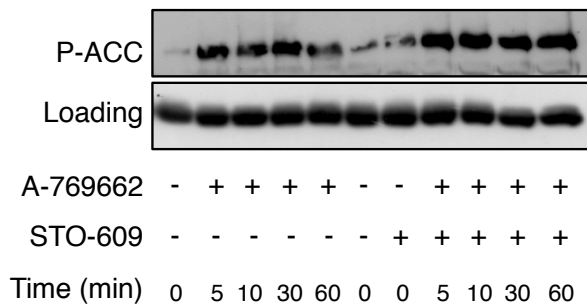


Figure S2.

(A) Western blot analysis of CaMKKβ expression in extracts from human platelets. Increasing concentrations of platelet lysate (25, 50 and 100 μg) were probed with a polyclonal anti-CaMKKβ antibody. Mouse brain extracts served as a positive control to identify CaMKKβ. The antibody recognized two bands around 65 kDa, corresponding probably to distinct isoforms encoded by splice variants.

(B) Lack of effect of STO-609 on ACC phosphorylation induced by A-769662 treatment in human platelets. Western blot analysis of ACC phosphorylation in purified platelets incubated in the presence or absence of STO-609 10 μM for 2 min prior to stimulation by 100 μM A-769662 for the indicated times.

Figure S3

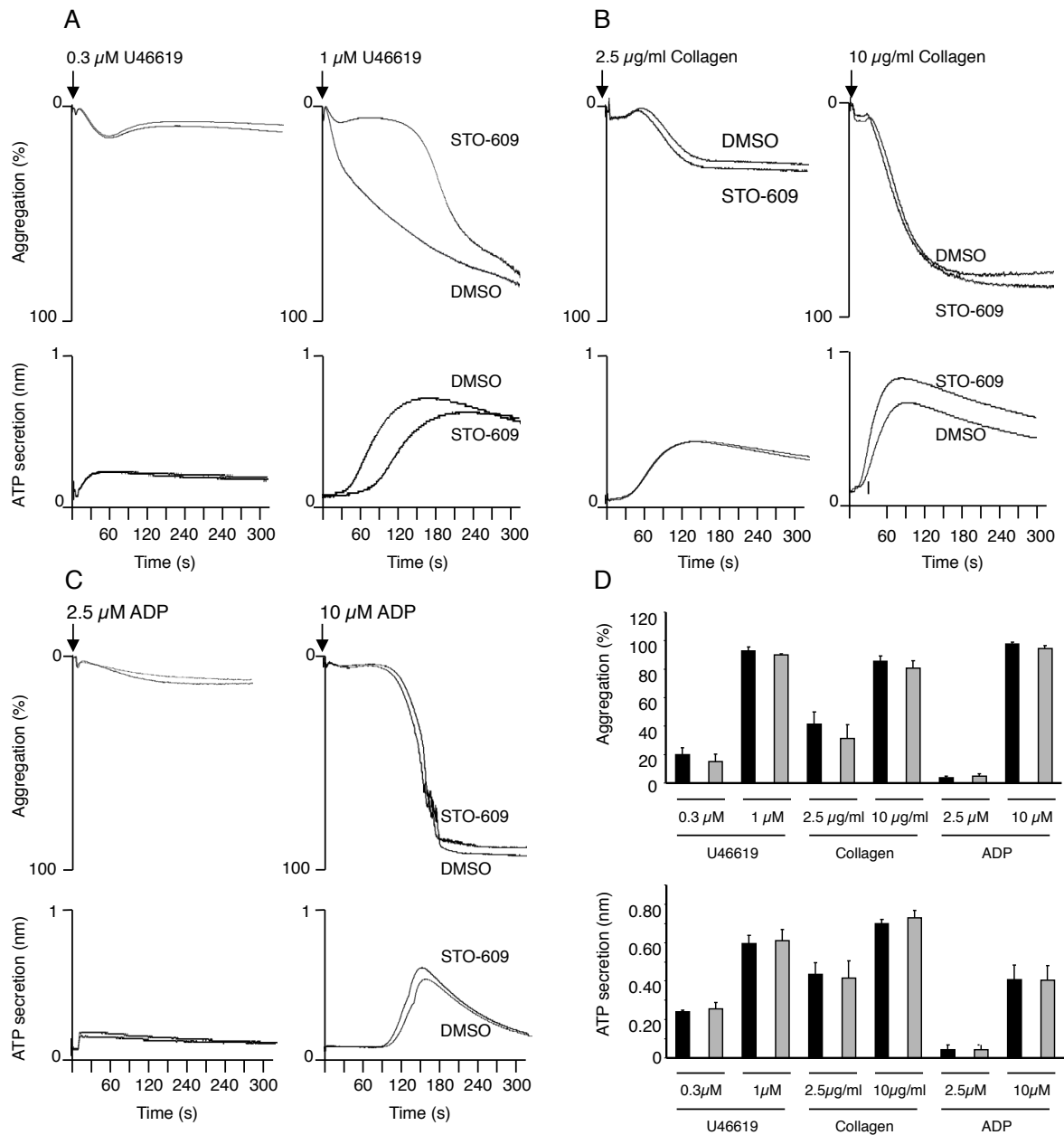


Figure S3: Aggregation and ATP secretion analyses.

Platelets were incubated in presence (grey bar) or in absence (black bar) of 10 μ M STO-609 for 2 min at 37°C prior to treatment with U46619 at 0.3 μ M and 1 μ M (A), collagen at 2.5 μ g/ml and 10 μ g/ml (B) or ADP at 2.5 μ M and 10 μ M (C). The agonist-induced ATP secretion was measured in parallel by comparing the change in luminescence in each sample to a 2-nmoles ATP standard. (D) Quantified data for 3 experiments are expressed as mean \pm SEM.

Figure S4

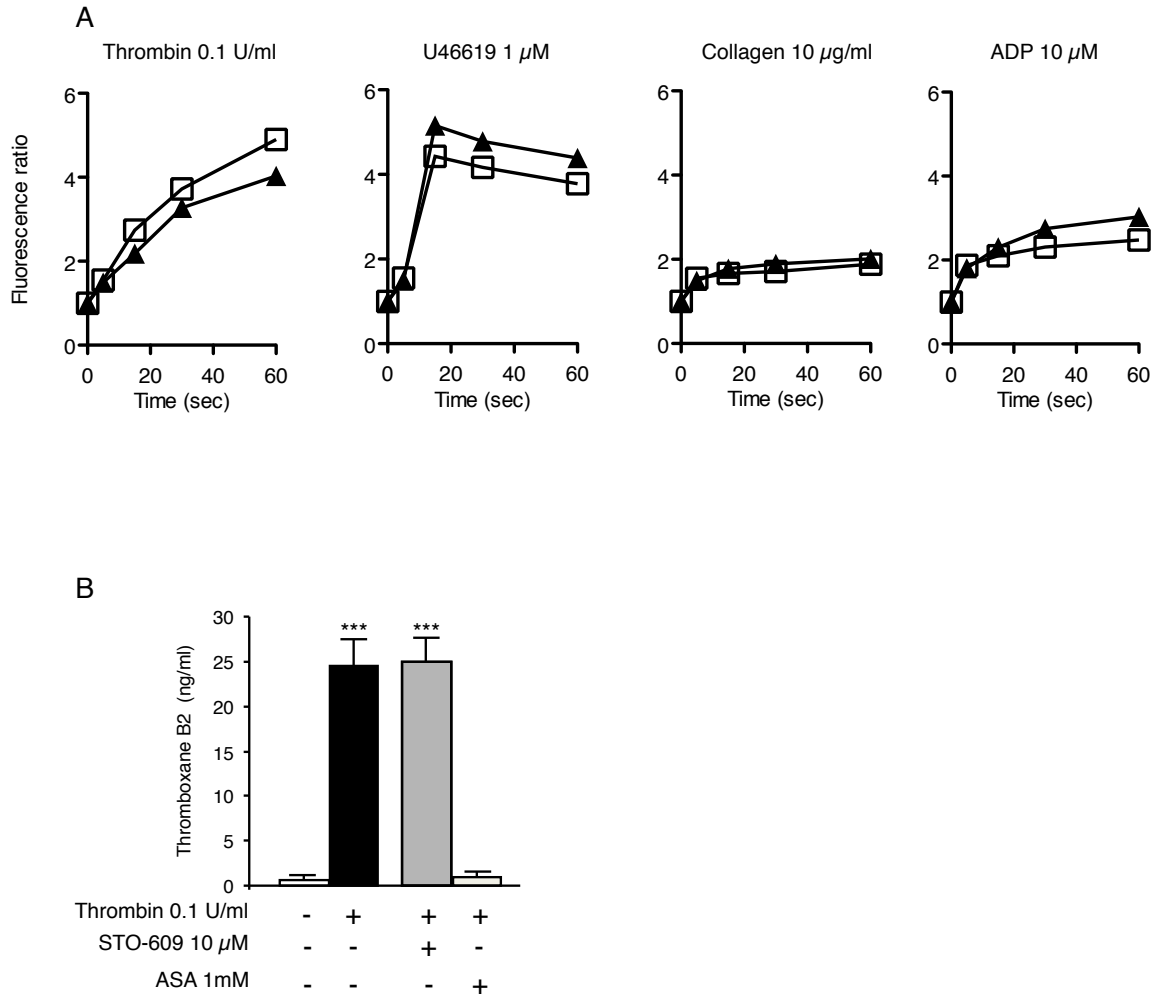


Figure S4.

(A) Assessment of Ca²⁺ release in response to various agonists in the presence or absence of STO-609. The kinetics of intracellular Ca²⁺ was followed in fluo-3/acetoxymethyl ester -loaded platelets using flow cytometry. Platelets were incubated in presence or in absence of 10 μM STO-609 for 2 min at 37°C prior to treatment with thrombin (0.1 U/ml), U46619 (1 μM), collagen (10 μg/ml) or ADP (10 μM) and the real-time changes in fluo-3 fluorescence were analyzed.

(B) Assessment of TXB2 levels in platelet supernatants. ASA, considered as a control in TXB2 assay, completely blunted thrombin-induced TXB2 generation. Similar results were obtained in 3 separate experiments. The data are expressed as mean ± SEM (**P*<0.05 and ****P*<0.001 compared to corresponding control values).

Figure S5

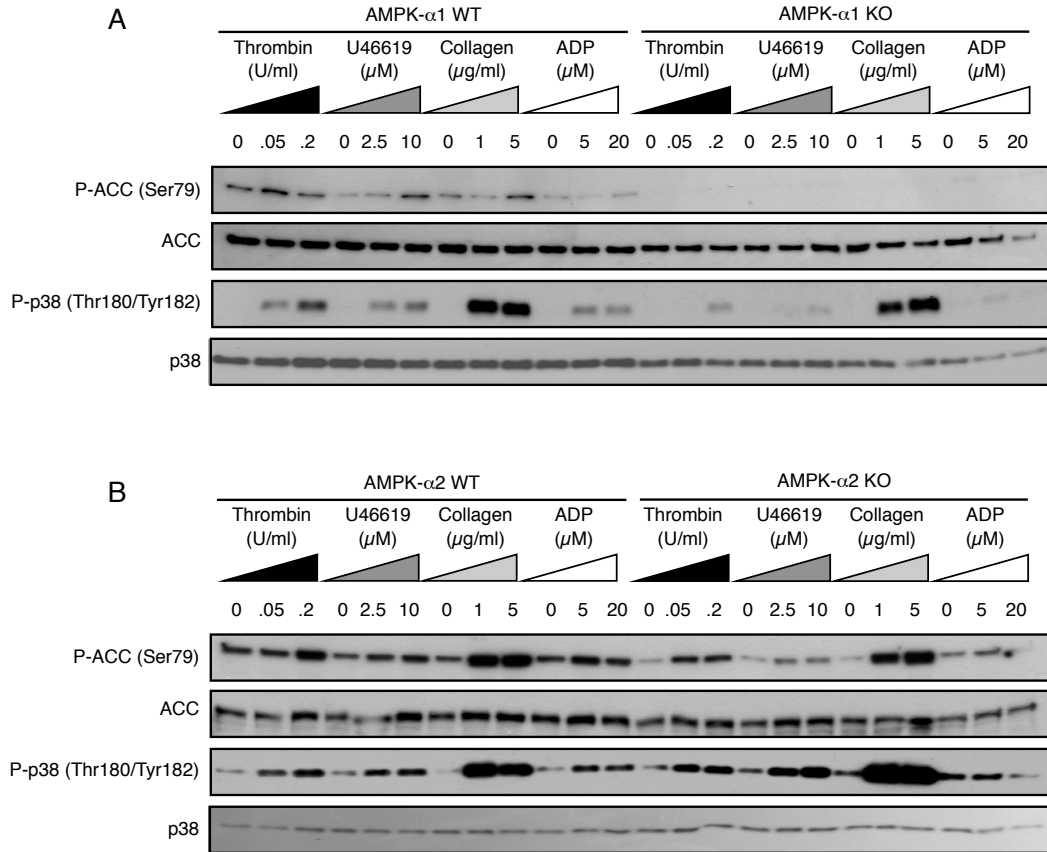


Figure S5.

AMPK- α 1 regulates thrombin, U46619 and collagen -induced ACC phosphorylation in murine platelets. Platelet suspensions from (A) AMPK- α 1 KO mice, (B) AMPK- α 2 KO mice and their WT littermates were stimulated with increasing doses of thrombin (0.05; 0.2 U/ml), U46619 (2.5; 10 μ M), collagen (1; 5 μ g/ml) and ADP (5; 20 μ M) for 2 min prior to cell lysis and Western blot analysis for Ser79 ACC and Thr180/Tyr182 p38 (positive control for the response to agonists). Blots were probed with anti-total corresponding antibodies as loading controls.

Figure S6

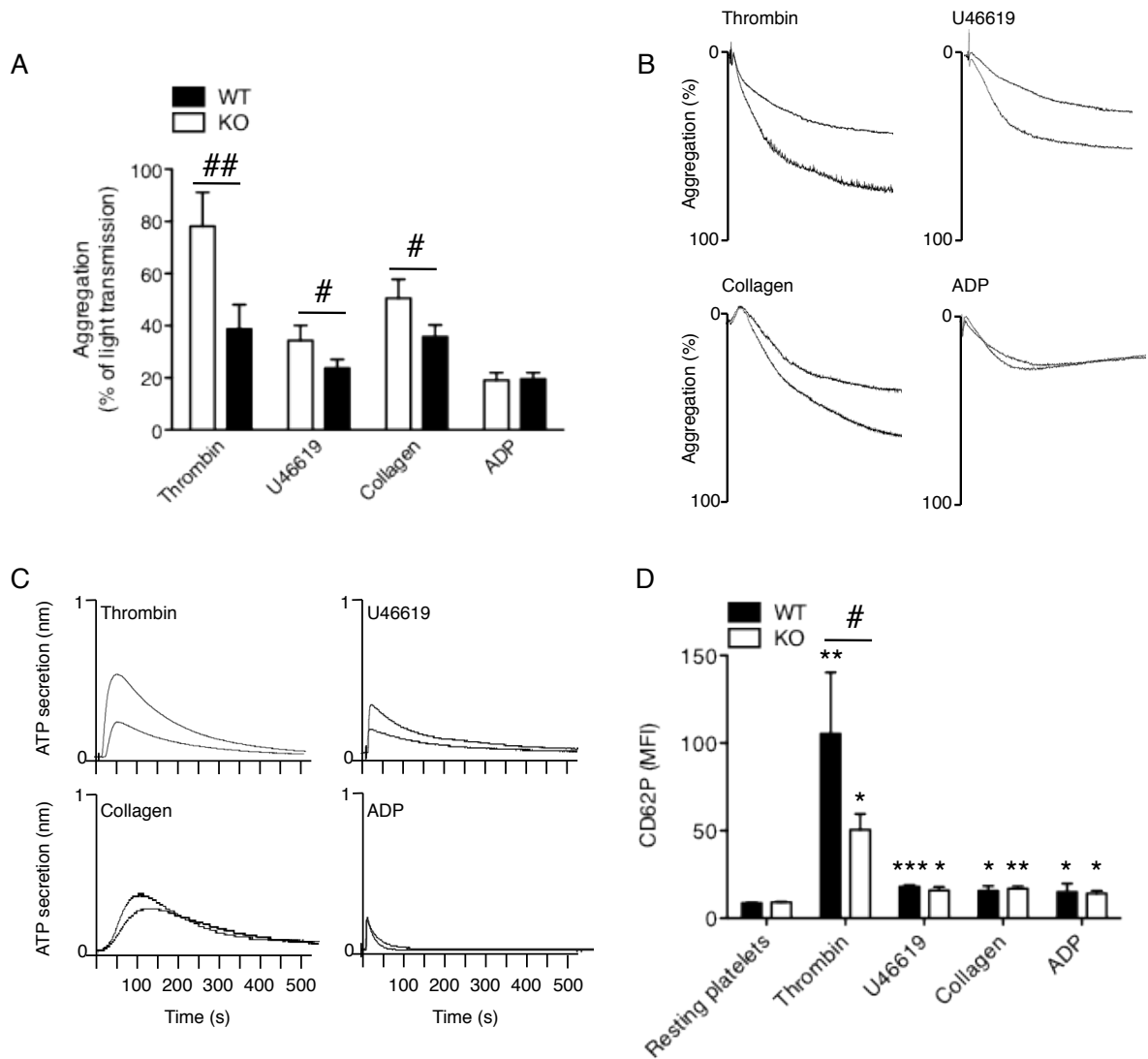


Figure S6.

Role of AMPK- α 1 in murine platelet aggregation and secretion, in response to various agonists.

(A) Platelet suspensions from WT and AMPK- α 1 KO mice were stimulated with 0.05 U/ml thrombin, 5 μ M U46619, 2.5 μ g/ml collagen or 10 μ M ADP. Aggregation, expressed as percentage of light transmission, was measured by aggregometry (Chrono-Log). The data are expressed as mean \pm SEM ($\#P < 0.05$ and $\#\#\#P < 0.01$ compared to corresponding WT values). (B) Representative aggregation tracings of platelets from WT and AMPK- α 1 KO mice induced by thrombin, U46619, collagen or ADP, as indicated; (C) ATP secretion and (D) α -granule secretion; Washed platelets were incubated for 5 min with 0.05 U/ml thrombin, 5 μ M U46619, 2.5 μ g/ml collagen or 10 μ M ADP. Quantification of data is presented as mean \pm SEM ($n = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ compared to control value in WT; $\#P < 0.05$ represents a statistical difference between platelets from WT and AMPK- α 1 KO mice).

Figure S7

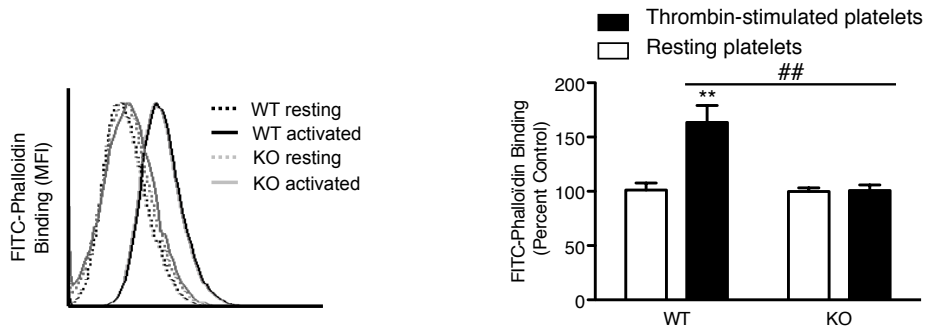


Figure S7.

Role of AMPK- α 1 in thrombin-dependent F-actin formation. Platelets were stained with 10 μ M FITC-phalloidin; Samples were analyzed using flow cytometry. Representative overlay plots are presented (left panel) as the number of events over the log of associated fluorescence (baselines refer to groups without thrombin stimulation). In the right panel, data are expressed as percentage of control of resting platelets in respective groups. Bars represent mean \pm SEM (n=5, ** P <0.01 compared to corresponding control value) (n=4, ** P <0.01 compared with WT control value, and ## P <0.01 represents a statistical difference between platelets from WT and AMPK- α 1 KO mice treated with thrombin).

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 May 2013 (30.05.2013)

(10) International Publication Number
WO 2013/076157 A1

- (51) **International Patent Classification:**
C12Q 1/00 (2006.01) *G01N 33/86* (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/EP2012/073263
- (22) **International Filing Date:**
21 November 2012 (21.11.2012)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
PCT/EP2011/070721
22 November 2011 (22.11.2011) EP
- (71) **Applicant:** UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN [BE/BE]; Place de l'Université, 1, B-1348 Louvain-la-Neuve (BE).
- (72) **Inventors:** HORMAN, Sandrine; 38, rue des Frères Poels, B-1325 Dion-Valmont (BE). BEAULOYE, Christophe; 38, rue des Frères Poels, B-1325 Dion-Valmont (BE). ONSLAER, Marie-Blanche; 9b, rue de Lille, B-7730 Saint-Léger (BE). BERTRAND, Luc; 129, rue Trémouroux, B-1360 Orbais (BE). VANOVERSCHELDE, Jean-Louis; 11, Groenhof, B-1970 Wezembeek-Oppem (BE).
- (74) **Agents:** MICHALÍK, Andrej et al.; De Clercq & Partners, E. Gevaertdreef 10a, B-9830 Sint-Martens-Latem (BE).
- (81) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:**
— of inventorship (Rule 4.17(iv))
- Published:**
— with international search report (Art. 21(3))



WO 2013/076157 A1

(54) **Title:** MARKER FOR BLOOD COAGULATION

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of phosphorylated Acetyl-CoA carboxylase (ACC) in platelets from a subject as a biomarker for blood coagulation, preferably blood coagulation in the subject, preferably encompassing activation of the coagulation cascade as well as platelet activation, preferably thrombin-induced platelet activation. The invention encompasses uses and methods for the diagnosis or the monitoring of blood coagulation in the subject. The invention further relates to uses and methods for screening for anti-coagulants or pro-coagulants.

MARKER FOR BLOOD COAGULATION

FIELD OF THE INVENTION

The invention pertains to the field of biomarkers, particularly markers useful for the evaluation of processes involved in blood coagulation. The invention more particularly relates to uses and methods for the diagnosis or monitoring of blood coagulation in subjects, including screening assays for anti-coagulants or pro-coagulants.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Blood coagulation is a complex process by which blood clots. It is an important part of haemostasis, the process that controls the flow of blood following vascular injury and that includes blood clotting and the subsequent dissolution of the clot following repair of the injured tissue.

Platelet activation and subsequent degranulation and aggregation (clumping together) are known to play a pivotal role in blood coagulation. Platelets become activated through binding to subendothelial proteins such as collagen that are exposed to the bloodstream when the endothelial layer is injured. Activated platelets release the contents of stored granules including, e.g., adenosine diphosphate (ADP) and thromboxane A₂ (TXA₂) into the blood plasma. This in turn activates additional platelets which then aggregate to form a platelet aggregate.

Little is known about a role of adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) in the regulation of platelet function. Fleming et al (2003. *Thromb Haemost.* 90: 863-867) reported the presence of AMPK in washed human platelets and its activation by insulin. Randriamboavonjy et al. (2010 *Blood* 116: 2134-2140) have advanced a role for AMPK in the regulation of platelet function *in vitro*. In particular, they hypothesised that the $\alpha 2$ AMPK isoform, by affecting Fyn phosphorylation and activity, plays a role in platelet α IIb β 3 integrin signalling, leading to clot retraction and thrombus stability.

Platelets are also activated by thrombin. Thrombin is a serine protease that acts on platelets by activation of a unique class of cell-surface protease activated receptors (PARs) that are members of the large family of G protein-coupled seven transmembrane domain receptors (GPCRs). The prevailing view is that human platelets utilise PAR1 and PAR4 which are coupled to heterotrimeric G_q and G₁₂₋₁₃ proteins to initiate signalling cascades leading to increases in cytosolic calcium (Ca²⁺), secretion of autocrine activators, and drastic shape change, which all promote platelet aggregation resulting primarily from activation of the α IIb β 3 fibrinogen receptor. Thrombin also catalyses the last

step of the coagulation cascade responsible for the formation of fibrin. Thrombin itself is produced in the coagulation cascade by the enzymatic cleavage of two sites on prothrombin by activated Factor X (Xa).

The coagulation cascade represents the second component of the blood coagulation process. The coagulation cascade involves a series (i.e., cascade) of reactions, in which a zymogen (inactive enzyme precursor) is activated to become an active enzyme that then catalyzes the next reaction in the reaction cascade, ultimately resulting in the formation of a fibrin clot, which strengthens the platelet aggregate. The zymogens are also known as coagulation factors or clotting factors.

A reliable evaluation of the capacity of a subject's blood to coagulate in a timely and effective fashion is crucial to various surgical and medical procedures, such as for example cardiac surgery. Moreover, dependable detection of abnormal blood coagulation can inform the selection of appropriate treatment of patients suffering from haemostasis disorders, including clotting and bleeding disorders. In this connection, it is for example crucial for clinicians to discriminate bleeding related to a haemostasis disorder and bleeding due to a surgical procedure itself.

Whereas several tests are currently available to evaluate the function of the coagulation system, there remains a continuing interest in and need for further alternative and/or improved tests for blood coagulation processes. Moreover, the currently available tests are informative only as to one aspect of the coagulation system, in particular platelet aggregation or coagulation cascade, but do not simultaneously assess platelet activation and activation of the coagulation cascade. In addition, existing tests are performed *ex vivo*, i.e., after stimulation of a blood sample removed from a subject by a coagulation agonist. Therefore, although the available tests can allow to evaluate for example the capacity of a subject's platelets to respond to a coagulation stimulus *in vitro*, they generally do not allow to measure the occurrence of actual platelet activation in the subject (i.e., *in vivo*). Besides the measurement of thromboxane, which, however, is secreted from platelets and is not detected in platelets, there exists no marker allowing to readily evaluate the platelet response in the subject. Furthermore, most available tests do not allow to evaluate agonist-specific platelet activation, e.g., thrombin-induced platelet activation.

Consequently, there exists a continuous need for additional and preferably improved tests that assess the function of the coagulation system. In particular, there remains a need in the art for reliable and simple tests that assess platelet activation, and preferably that can simultaneously assess platelet activation and activation of the coagulation cascade. Also

particularly wanted are tests that characterise *in vivo* platelet activation, in particular thrombin-specific *in vivo* platelet activation.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention addresses one or more of the above discussed needs in the art.

5 As shown in the experimental section, the inventors have realised that inhibition of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase beta (CaMKKbeta) blocked platelet aggregation induced by thrombin, but not adenosine diphosphate (ADP)-induced platelet aggregation. CaMKKbeta inhibition also prevented platelet activation as manifested by the prevention of integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ activation and the prevention of α -granules secretion
10 following inhibition of CaMKKbeta. Furthermore, it was shown that thrombin unexpectedly increased Acetyl-CoA carboxylase (ACC) phosphorylation, which could be prevented by inhibiting CaMKKbeta. Said increased ACC phosphorylation in platelets was not observed with the platelet agonists ADP, the thromboxane A2 receptor agonist U46619 or collagen. These *in vitro* results demonstrate a clear correlation between platelet activation and
15 subsequent platelet degranulation and aggregation specifically induced by thrombin (or specifically induced through activation of thrombin receptor(s) on the surface of platelets) and ACC phosphorylation in platelets.

ACC is a substrate of AMP-activated protein kinase (AMPK) and it is known to be involved in the metabolism of fatty acids by catalysing the carboxylation of Acetyl-CoA to produce malonyl-CoA. Little is known about a role of AMPK beyond metabolism in platelets and a
20 role of ACC beyond metabolism has not been described before in platelets. The usefulness of ACC as a biomarker for platelet aggregation and blood coagulation *in vitro* is therefore entirely unexpected.

Moreover, the inventors surprisingly found that ACC phosphorylation also represents a
25 valuable biomarker for platelet aggregation and blood coagulation *in vivo*. Indeed, as also shown in the experimental section, the inventors have found that ACC phosphorylation in platelets from a subject demonstrably correlates with blood coagulation *in* the subject. This correlation with *in vivo* coagulation status could not be predicted from the aforementioned *in vitro* observations, among others because (1) the *in vitro* studies have
30 been performed with isolated and washed platelets (i.e., substantially without confounding factors), whereas in the *in vivo* situation interactions with leukocytes, endothelium and the coagulation cascade have to be taken into account and (2) a pharmacological dose of thrombin was applied to the platelets in the *in vitro* studies, whereas the level of thrombin that is produced in the circulation of a subject (e.g., during post-surgical bleeding) is not

predetermined but has to be prognosticated. The inventors have also found that ACC phosphorylation in platelets from a subject demonstrably correlates with thrombin generation in the subject.

5 The invention thus allows to characterise the platelet response and more generally blood coagulation occurring in the patient, which can be conveniently denoted as *in vivo*. The invention also allows to characterise thrombin generation and more generally activation of the coagulation cascade *in vivo*.

Hence, phosphorylated ACC represents a useful blood coagulation marker, more particularly a marker for platelet activation specifically by thrombin (or platelet activation
10 specifically induced through activation of thrombin receptor(s) on the surface of the platelets) to be applied for example in pathophysiology studies and in evaluating treatment or anticipating onset of bleeding complications. Phosphorylated ACC also seems useful as a biomarker for thrombin generation and more generally activation of the coagulation cascade.

15 Given the central role of thrombin in both platelet activation and coagulation cascade, the invention advantageously allows to evaluate platelet activation and activation of the coagulation cascade by a single marker (ACC phosphorylation).

Accordingly, in one aspect, the invention provides the use of phosphorylated Acetyl-coenzyme A carboxylase (Acetyl-CoA carboxylase, ACC) in platelets from a subject as a
20 biomarker for blood coagulation.

In preferred embodiments, the invention provides the use of phosphorylated ACC in platelets from a subject as a biomarker for blood coagulation in the subject. With the term "blood coagulation" is meant herein the process of blood clotting encompassing both platelet activation as well as activation of the coagulation cascade. The term particularly
25 encompasses both "*in vivo* blood coagulation", i.e., blood coagulation *in* (i.e., occurring or taking place inside or within) a subject, as well as "*in vitro* blood coagulation" or "*ex vivo* blood coagulation", i.e., blood coagulation out of (occurring or taking place outside or without) a subject, such as, for example, in a test tube. The phrase "blood coagulation in a subject" thus particularly denotes "*in vivo* blood coagulation".

30 In some embodiments, the invention provides the use of phosphorylated ACC in platelets from a subject for the diagnosis of blood coagulation in the subject.

In other embodiments, the invention provides the use of phosphorylated ACC in platelets from a subject for the monitoring of blood coagulation in the subject.

In a related aspect, the invention provides a method for determining blood coagulation comprising determining phosphorylated ACC in platelets from a subject.

In preferred embodiments, the invention provides a method for determining blood coagulation in a subject comprising determining phosphorylated ACC in platelets from the
5 subject.

With the phrase “determining phosphorylated ACC” is meant herein an at least qualitative evaluation of the phosphorylation status of ACC in platelets from a subject, such as detecting whether ACC is phosphorylated or not. The term may but need not further encompass measuring the level of phosphorylated ACC.

10 In further embodiments, the invention provides a method for determining blood coagulation, comprising measuring the level of phosphorylated ACC in platelets from a subject.

In preferred further embodiments, the invention provides a method for determining blood coagulation in a subject, comprising measuring the level of phosphorylated ACC in
15 platelets from the subject.

With the phrase “measuring phosphorylated ACC” is meant herein a quantitative evaluation of the phosphorylation status of ACC in platelets from a subject. Such quantification may without limitation denote relative quantification, e.g., determining the fraction of phosphorylated platelet ACC versus total platelet ACC in a sample, or
20 determining the relative amount of phosphorylated ACC in a given amount of platelets or platelet protein or platelet protein fraction from a sample compared to a predetermined control amount of phosphorylated ACC; and/or may denote absolute quantification, e.g., determining the absolute amount (e.g., weight, moles, enzymatic units) of phosphorylated ACC in a given amount of platelets or platelet protein or platelet protein fraction from a
25 sample.

In some embodiments, the invention provides a method for the diagnosis of blood coagulation in a subject comprising:

- (i) determining phosphorylated ACC in platelets from the subject;
- (ii) comparing phosphorylated ACC as determined in (i) with a reference value, said
30 reference value representing a known status of blood coagulation;
- (iii) finding a deviation or no deviation of phosphorylated ACC as determined in (i) from said reference value;

(iv) attributing said finding of deviation or no deviation to a particular diagnosis of blood coagulation in the subject.

Further embodiments of the invention relate to a system comprising:

- 5 - a computer data repository that comprises a reference value, said reference value representing a known status of blood coagulation; and
- a computer system programmed to access the data repository and to use information from the data repository in combination with information on phosphorylated ACC in platelets from a subject, to make a diagnosis of blood coagulation in the subject.

10 Related embodiments of the invention concern method for making a diagnosis of blood coagulation in a subject comprising:

- receiving data representative of values of phosphorylated ACC in platelets from the subject;
- accessing a data repository on a computer, said data repository comprising a reference value, said reference value representing a known status of blood coagulation; and
- 15 - comparing the data representative of values of phosphorylated ACC in platelets from the subject with the reference value in the data repository on the computer, thereby making a diagnosis of blood coagulation in the subject. In certain embodiments, the determination of what action is to be taken, e.g., by a clinician, in view of said diagnosis is performed by a
- 20 (the) computer.

In further embodiments of the methods for the diagnosis of blood coagulation in the subject as taught herein, the invention provides methods wherein in step (iv) higher phosphorylated ACC in platelets from the subject as compared to the reference value is attributed to increased blood coagulation compared to the blood coagulation status

25 represented by the reference value.

In other embodiments, the invention provides a method for the monitoring of blood coagulation in a subject comprising:

- (i) determining phosphorylated ACC in platelets from the subject from two or more successive time points;
- 30 (ii) comparing said phosphorylated ACC as determined in (i);
- (iii) finding a deviation or no deviation of said phosphorylated ACC as compared in (ii);

(iv) attributing said finding of deviation or no deviation to a particular change in blood coagulation in the subject between the two or more successive time points.

In further embodiments of the methods for the monitoring of blood coagulation in the subject as taught herein, the invention provides methods wherein in step (iv) higher or lower phosphorylated ACC in platelets at a later one of the two or more successive time points than at an earlier one of the two or more successive time points is attributed to increased or decreased, respectively, blood coagulation at the later time point compared to the earlier time point.

As noted, blood coagulation as used herein is meant to encompass platelet activation as well as activation of the blood coagulation cascade.

In preferred embodiments of the uses or methods as taught herein, the blood coagulation is mediated by an agonist of a platelet thrombin receptor, preferably protease activated receptor (PAR), more preferably PAR1 and/or PAR4.

In further preferred embodiments of the uses or methods as taught herein, the blood coagulation is mediated by thrombin. Thrombin also represents an exemplary agonist of a platelet thrombin receptor.

Whereas the term "mediate" is known per se, it is particularly intended herein to mean "being effected by", "acting through" or "involving". As used herein, an agent that mediates blood coagulation refers to an agent that exhibits a direct or indirect causation, connection to or relation with or that is involved in blood coagulation, e.g. by inducing, promoting or stimulating blood coagulation, and may include, for example, but without limitation, agents that induce, promote or stimulate platelet activation and agents that are produced in the blood coagulation cascade.

In preferred embodiments of the uses or methods as taught herein, the blood coagulation thus comprises thrombin production.

In other preferred embodiments of the uses or methods as taught herein, the blood coagulation comprises the activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4.

In yet other preferred embodiments of the uses or methods as taught herein, the blood coagulation comprises platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation.

In further preferred embodiments of the uses or methods as taught herein, the blood coagulation comprises platelet activation that results in platelet aggregation and/or platelet

degranulation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation that results in platelet aggregation and/or platelet degranulation, more preferably thrombin-induced platelet activation that results in platelet aggregation and/or platelet degranulation.

- 5 In particularly preferred embodiments of the uses or methods as taught herein, the blood coagulation comprises platelet aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced platelet aggregation.

Accordingly, phosphorylated ACC in platelets from a subject can be suitably used as a biomarker for thrombin production; or for activation of a platelet thrombin receptor,
10 preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or for platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or for platelet aggregation and/or platelet degranulation; preferably in the subject.

Likewise, methods comprising same steps as the respective methods disclosed above
15 aimed at determining of phosphorylated ACC in a subject could be suitably employed as methods for determining, diagnosing or monitoring thrombin production; or activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet
20 degranulation; preferably in the subject.

Accordingly, the present invention also provides the use of phosphorylated Acetyl-CoA carboxylase (ACC) in platelets from a subject as a biomarker: for thrombin production; or for activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or for platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated
25 platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or for platelet aggregation and/or platelet degranulation.

In certain embodiments, the invention also provides the use of phosphorylated Acetyl-CoA carboxylase (ACC) in platelets from a subject as a biomarker for thrombin production; or for activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1
30 and/or PAR4; or for platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or for platelet aggregation and/or platelet degranulation, in the subject.

In other embodiments, the invention also provides the use of phosphorylated ACC in platelets from a subject for the diagnosis or the monitoring of thrombin production; or

activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet degranulation, in the subject.

- 5 Further provided is a method for determining thrombin production; or activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet degranulation, comprising determining phosphorylated ACC in platelets from a subject,
10 preferably comprising measuring the level of phosphorylated ACC in the platelets from a subject.

In embodiments, the invention also provides a method for determining thrombin production; or activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated
15 platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet degranulation, in a subject comprising determining phosphorylated ACC in platelets from the subject, preferably comprising measuring the level of phosphorylated ACC in the platelets from the subject.

In certain embodiments, the invention provides a method for the diagnosis of thrombin
20 production; or activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet degranulation, in a subject comprising:

- (i) determining phosphorylated ACC in platelets from the subject;
- 25 (ii) comparing phosphorylated ACC as determined in (i) with a reference value, said reference value representing a known status of thrombin production; or activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or
30 platelet degranulation;
- (iii) finding a deviation or no deviation of phosphorylated ACC as determined in (i) from said reference value;
- (iv) attributing said finding of deviation or no deviation to a particular diagnosis of thrombin production; or activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR,

more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet degranulation, in the subject.

Further embodiments of the invention relate to a system comprising:

- 5 - a computer data repository that comprises a reference value, said reference value representing a known status of thrombin production; or of activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or of platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or of platelet aggregation and/or platelet degranulation; and
- 10
- a computer system programmed to access the data repository and to use information from the data repository in combination with information on phosphorylated ACC in platelets from a subject, to make a diagnosis of thrombin production; or of activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or of platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or of platelet aggregation and/or platelet degranulation, in the subject.
- 15

Related embodiments of the invention concern method for making a diagnosis of thrombin production; or of activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or of platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or of platelet aggregation and/or platelet degranulation, in a subject comprising:

20

- receiving data representative of values of phosphorylated ACC in platelets from the subject;
- 25
- accessing a data repository on a computer, said data repository comprising a reference value, said reference value representing a known status of thrombin production; or of activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or of platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or of platelet aggregation and/or platelet degranulation; and
- 30
- comparing the data representative of values of phosphorylated ACC in platelets from the subject with the reference value in the data repository on the computer, thereby making a diagnosis of thrombin production; or of activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or of platelet activation, preferably

platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or of platelet aggregation and/or platelet degranulation, in the subject. In certain embodiments, the determination of what action is to be taken, e.g., by a clinician, in view of said diagnosis is performed by a (the) computer.

- 5 In further embodiments of the methods for the diagnosis of thrombin production; or activation of a platelet thrombin receptor; or platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet degranulation as taught herein, the invention also provides a method wherein in step (iv) higher phosphorylated ACC in platelets from the subject as compared to the reference value is attributed to increased thrombin production; or activation of a
- 10 platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet degranulation compared to the status of thrombin production represented by the reference value.
- 15 In other embodiments, the invention also provides a method for the monitoring of thrombin production; or activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet degranulation, in a subject comprising:
- 20 (i) determining phosphorylated ACC in platelets from the subject from two or more successive time points;
- (ii) comparing said phosphorylated ACC as determined in (i);
- (iii) finding a deviation or no deviation of said phosphorylated ACC as compared in (ii);
- (iv) attributing said finding of deviation or no deviation to a particular change in
- 25 thrombin production; or activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet degranulation in the subject between the two or more successive time points.
- 30 In further embodiments of the methods for the monitoring of thrombin production; or activation of a platelet thrombin receptor; or platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet degranulation as taught herein, the invention provides methods wherein in step (iv) higher or lower phosphorylated ACC in platelets at a later one of the two or more successive time points than at an earlier one of the two or more successive time points is

attributed to increased or decreased, respectively, thrombin production; or activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet
5 degranulation at the later time point compared to the earlier time point.

Such activities may be studied or evaluated in contexts other than bleeding, such as for example but without limitation in sepsis or diabetes. Indeed, in diabetic patients, platelet dysfunction is commonly observed.

Accordingly, the present invention also provides the use of phosphorylated Acetyl-CoA
10 carboxylase (ACC) in platelets from a subject as a biomarker for platelet aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced platelet aggregation.

In certain embodiments, the invention also provides the use of phosphorylated Acetyl-CoA
15 carboxylase (ACC) in platelets from a subject as a biomarker for platelet aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced platelet aggregation, in the subject.

In other embodiments, the invention also provides the use of phosphorylated ACC in
20 platelets from a subject for the diagnosis or the monitoring of platelet aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced platelet aggregation, in the subject.

Further provided is a method for determining platelet aggregation, preferably platelet
thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced
platelet aggregation, comprising determining phosphorylated ACC in platelets from a
subject, preferably comprising measuring the level of phosphorylated ACC in the platelets
25 from a subject.

In embodiments, the invention also provides a method for determining platelet
aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more
preferably thrombin-induced platelet aggregation, in a subject comprising determining
phosphorylated ACC in platelets from the subject, preferably comprising measuring the
30 level of phosphorylated ACC in the platelets from the subject.

In certain embodiments, the invention provides a method for the diagnosis of platelet
aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more
preferably thrombin-induced platelet aggregation, in a subject comprising:

- (i) determining phosphorylated ACC in platelets from the subject;
- (ii) comparing phosphorylated ACC as determined in (i) with a reference value, said reference value representing a known status of platelet aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced platelet aggregation;
- 5 (iii) finding a deviation or no deviation of phosphorylated ACC as determined in (i) from said reference value;
- (iv) attributing said finding of deviation or no deviation to a particular diagnosis of platelet aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced platelet aggregation, in the subject.
- 10

In further embodiments of the methods for the diagnosis of platelet aggregation as taught herein, the invention also provides a method wherein in step (iv) higher phosphorylated ACC in platelets from the subject as compared to the reference value is attributed to increased platelet aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced platelet aggregation, compared to the status of platelet aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced platelet aggregation represented by the reference value.

15

In other embodiments, the invention also provides a method for the monitoring of platelet aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced platelet aggregation, in a subject comprising:

20

- (i) determining phosphorylated ACC in platelets from the subject from two or more successive time points;
- (ii) comparing said phosphorylated ACC as determined in (i);
- 25 (iii) finding a deviation or no deviation of said phosphorylated ACC as compared in (ii);
- (iv) attributing said finding of deviation or no deviation to a particular change in platelet aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced platelet aggregation, in the subject between the two or more successive time points.

In further embodiments of the methods for the monitoring of blood coagulation in the subject as taught herein, the invention provides methods wherein in step (iv) higher or lower phosphorylated ACC in platelets at a later one of the two or more successive time points than at an earlier one of the two or more successive time points is attributed to

30

increased or decreased, respectively, platelet aggregation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet aggregation, more preferably thrombin-induced platelet aggregation at the later time point compared to the earlier time point.

5 In certain embodiments of the uses or methods as taught herein, the subject has been administered an anti-coagulant or a pro-coagulant. Hereby, the present uses or methods may advantageously allow to test the effectiveness of such anti-coagulants or pro-coagulants in the subject, or test the responsiveness of the subject to such anti-coagulants or pro-coagulants.

10 In further embodiments of the uses or methods as taught herein, the subject has been administered an anti-coagulant selected from the group comprising or consisting of an inhibitor of thrombin production, an inhibitor of thrombin activity (e.g. a direct thrombin inhibitor), an inhibitor of binding of thrombin to a platelet thrombin receptor, a platelet thrombin receptor antagonist, inhibitor of platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation
15 or a pro-coagulant selected from the group comprising an activator of thrombin production or thrombin activity, thrombin, a platelet thrombin receptor agonist.

The uses or methods disclosed herein may be particularly useful for evaluating blood coagulation processes in patients which suffer from a coagulation disorder, e.g., a disorder causing inadequate or excessive blood coagulation.

20 Hence, in other embodiments of the uses or methods as taught herein, the subject is a patient with a blood coagulation disorder.

The invention further relates to uses and methods for screening for anti-coagulants or pro-coagulants.

25 In an aspect, the invention thus provides the use of phosphorylated ACC in platelets from a subject for screening of one or more test agents for a candidate anti-coagulant or pro-coagulant, wherein the subject has been administered the test agent.

30 In a related aspect, the invention provides a method for screening one or more test agents for a candidate anti-coagulant or pro-coagulant, comprising determining whether phosphorylated ACC is modulated in platelets from a subject, wherein the subject has been administered the test agent.

In preferred embodiments, the invention provides a method for screening one or more test agents for a candidate anti-coagulant or pro-coagulant comprising:

(i) contacting a test agent with platelets;

(ii) determining whether said test agent can modulate phosphorylated ACC in said platelets.

The terms “modulate” or “modulated” or derivatives thereof are used in their broadest sense herein, and may particularly denote changing or modifying in any direction and to any extent a process, property, function or variable, etc. that is said to be so modulated. For example, in respective contexts, modulating may carry the meanings of stimulating, inhibiting, preventing or providing, etc. The modulation may reflect qualitative and/or quantitative change(s), and specifically encompasses both: increase (e.g., activation or stimulation) or decrease (e.g., inhibition), of that which is being modulated.

In preferred embodiments of the uses or methods for screening the one or more test agents for a candidate anti-coagulant or pro-coagulant as taught herein, the anti-coagulant is selected from the group comprising or consisting of an inhibitor of thrombin production, an inhibitor of thrombin activity (e.g. a direct thrombin inhibitor), an inhibitor of binding of thrombin to a platelet thrombin receptor, a platelet thrombin receptor antagonist, inhibitor of platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation or a pro-coagulant selected from the group comprising an activator of thrombin production or thrombin activity, thrombin, a platelet thrombin receptor agonist. Such inhibitors, antagonists, activators or agonists may be known to have such activity (e.g., in other test system(s)) or may be otherwise suspected to have such activity (e.g., based on structural or functional predictions).

These and further aspects and preferred embodiments of the invention are described in the following sections and in the appended claims. The subject matter of appended claims is hereby specifically incorporated in this specification.

BRIEF DESCRIPTION OF FIGURES

Figure 1 Thrombin induces AMPK activation *in vitro* via the stimulation of CaMKK β . (A) Western blot analysis of the expression of the α 1 subunit and the α 2 subunit of AMPK in extracts from mesenchymal stem cells (MSC), liver, heart and human platelets. (B) Activation of the α 1 subunit and the α 2 subunit of AMPK in human platelets following treatment with 0.1 U/ml thrombin. (C) Western blot analysis of CaMKK β expression in human platelets, brain and vascular smooth muscle cells (VSMC). (D) Western blot analysis of phosphorylated(Ser79) ACC in human platelets following treatment with 0.1 U/ml thrombin alone or with a combination of thrombin and 10 μ M STO-069.

Figure 2 STO-609 prevents platelet aggregation and platelet degranulation *in vitro*. (A,B) Aggregation of human platelets following treatment with 0.025 U/ml thrombin (A) or

20 μ M ADP (B) in the absence or presence of 10 μ M STO-609. (C) Flow cytometric analysis of the activation of integrin α IIb β 3 on the surface of human platelets following treatment with 0.025 U/ml thrombin in the absence or presence of 10 μ M STO-609. (D) Flow cytometric analysis of the secretion of α -granules by human platelets following
5 treatment with 0.025 U/ml thrombin in the absence or presence of 10 μ M STO-609.

Figure 3 STO-609 prevents MLC and VASP phosphorylation *in vitro*. (A, B) Western blot analysis of MLC phosphorylation (Ser19) (A) and VASP phosphorylation (Thr278) (B) in human platelets following treatment with 0.1 U/ml thrombin in the absence or presence of STO-609.

10 **Figure 4 Platelet aggregation and MLC phosphorylation is decreased in AMPK α 1-knockout mice.** (A) Western blot analysis of the expression of AMPK, and its α 1 and α 2 subunits in extracts from human platelets, platelets from wild-type (WT) mice, platelets from α 1-AMPK knockout (KO) mice, mesenchymal stem cells (MSC) and heart. (B) Aggregation of platelets from wild-type (WT) or α 1-AMPK knockout (KO) mice following
15 treatment with 0.1 U/ml thrombin.

Figure 5 Phosphorylation of ACC in platelets from a subject reflects coagulation cascade activation in said subject. (A-F) Western blot analysis of phosphorylated(Ser79) ACC in human platelets from 6 patients who underwent cardiac surgery with a cardio-pulmonary bypass procedure (CPB). The human platelets were
20 isolated from blood samples drawn during CPB and 4 hours after surgery. (G) Graph showing individual ACC phosphorylation in human platelets from the 6 patients in the post-operative state compared to the CPB state. (H) Graph showing mean ACC phosphorylation in human platelets from the 6 patients in the post-operative state compared to the CPB state. (I) Graph showing correlation between post-operative
25 bleeding severity characterized by chest tube drainage and increased ACC phosphorylation in the post-operative state compared to the CPB state.

Figure 6 Phosphorylation of ACC in platelets from a subject reflects coagulation cascade activation and platelet activation in said subject. Blood samples were drawn from patients (n=29) who underwent cardiac surgery with a cardio-pulmonary bypass
30 procedure. (A) Graph showing mean ACC phosphorylation in platelets in the post-operative state compared to the CPB state. Platelets were isolated from blood samples drawn during surgery (CPB) and 4 hours after surgery (post-op). Platelet lysates were subjected to Western blot analysis with anti-phospho Ser 79 ACC antibodies and phosphorylated ACC was quantified by densitometry normalized to GAPDH expression

and to a calibrator sample. The data are expressed as means \pm SEM (n=29, p = 0.057).

(B) Automated thrombogram showing the amount of thrombin generated from a patients plasma sample (before surgery (pre-op), during surgery (CPB) and after surgery (post-op)) plotted against time as calculated using a fluorogenic thrombin generation assay. **(C)**

- 5 Graph showing ETP values in plasma samples in the post-operative state compared to the CPB state as measured using a fluorogenic thrombin generation assay. **(D)** Graph showing increase in ACC phosphorylation (post-operation versus CBP) in patients with a poor recovery of ETP after CBP (ETP < 20%; post-operation versus basal) or patients preserving an intact ability to generate thrombin after CBP (ETP > 80%; post-operation versus basal). Data are represented as means \pm SEM (*p < 0.057). **(E)** Graph showing correlation between post-operative bleeding severity characterized by chest tube drainage and increased ACC phosphorylation in the post-operative state compared to the CPB state in patients with a positive TRAP test (\geq 830 A.U.) and without transfusion of platelets during CPB.

- 15 **Figure 7 ACC phosphorylation in human platelets is specifically induced by thrombin.** Western blot analysis of phosphorylated(Ser79) ACC in isolated washed human platelets following treatment for 1 minute with increasing doses of thrombin (0.01, 0.03, 0.1, 0.3 and 1 U/ml), the thromboxane A2 (TXA2) receptor agonist U46619 (0.1, 0.3, 1, 3 and 10 μ M), collagen (0.5, 1, 2.5, 5 and 10 μ g/ml) or ADP (2.5, 5, 10, 25 and 50 μ M).
20 Gelsolin expression was used as a loading control.

Figure 8 The CAMKK β /AMPK pathway does not affect TXA2 production or Ca²⁺ release. **(A)** Fluo-3-loaded platelets were pre-incubated with 10 μ M STO-609 for 2 min at 37°C in the presence of 1 mM extracellular Ca²⁺ and 0.1 U/ml thrombin was then added to trigger the increase of intracellular Ca²⁺. **(B)** TXB2 levels were assayed in supernatants of
25 platelets that were pre-incubated with 10 μ M STO-609 or DMSO prior to treatment with 0.1 U/ml thrombin. Platelets activated by thrombin in the presence of 1 mM acetylsalicylic acid (ASA) are negative controls. Similar results were obtained in 3 separate experiments. The data are expressed as mean \pm SEM (***)P<0.001 compared to corresponding control values).

- 30 **Figure 9 STO-609 prevents cofilin phosphorylation *in vitro*.** Washed platelets were incubated with thrombin 0.1 U/ml in the presence (triangle) or absence (rectangular) of 10 μ M STO-609, and lysates were harvested for Western blotting and densitometry. A representative blot of cofilin phosphorylation state is shown in the upper panel. Cofilin expression was normalized to gelsolin expression. Quantitative results were plotted in a

histogram (lower panel). The data are mean \pm SEM (n=5, P<0.05 compared with corresponding control values).

Figure 10 ACC, MLC, VASP and cofilin phosphorylation is decreased in AMPK α 1-knockout mice. Purified murine platelets isolated from WT (filled bars) or AMPK α 1 KO (unfilled bars) mice were stimulated by 0.1 U/ml thrombin for the indicated times. Platelet lysates were analyzed by immunoblotting with anti-phospho Ser 79 ACC (A), anti-phospho Ser 19 MLC (B), anti-phospho Thr 178 VASP (C) or anti-phospho Ser 3 cofilin (D) antibodies and quantified by densitometry. ACC, MLC, VASP and cofilin expression was normalized to GAPDH expression. The data are expressed as mean \pm SEM (n=5, *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 compared to thrombin values in KO; #P<0.05, ##P<0.01 and ###P<0.001 compared to control value in WT; \$P<0.05 compared to control value in KO).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

As used herein, the singular forms “a”, “an”, and “the” include both singular and plural referents unless the context clearly dictates otherwise.

The terms “comprising”, “comprises” and “comprised of” as used herein are synonymous with “including”, “includes” or “containing”, “contains”, and are inclusive or open-ended and do not exclude additional, non-recited members, elements or method steps. The term also encompasses “consisting of” and “consisting essentially of”.

The recitation of numerical ranges by endpoints includes all numbers and fractions subsumed within the respective ranges, as well as the recited endpoints.

The term “about” as used herein when referring to a measurable value such as a parameter, an amount, a temporal duration, and the like, is meant to encompass variations of +/-10% or less, preferably +/-5% or less, more preferably +/-1% or less, and still more preferably +/-0.1% or less of and from the specified value, insofar such variations are appropriate to perform in the disclosed invention. It is to be understood that the value to which the modifier “about” refers is itself also specifically, and preferably, disclosed.

Whereas the term “one or more”, such as one or more members of a group of members, is clear per se, by means of further exemplification, the term encompasses inter alia a reference to any one of said members, or to any two or more of said members, such as, e.g., any ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 or ≥ 7 etc. of said members, and up to all said members.

All documents cited in the present specification are hereby incorporated by reference in their entirety. In particular, the teachings or sections of such documents herein specifically referred to are incorporated by reference.

The discussion of the background to the invention herein is included to explain the context of the present invention. This is not to be taken as an admission that any of the material referred to was published, known, or part of the common general knowledge in any country as of the priority date of any of the claims.

Unless otherwise defined, all terms used in disclosing the invention, including technical and scientific terms, have the meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. By means of further guidance, term definitions are included to better appreciate the teaching of the present invention. When specific terms are defined in connection with a particular aspect or embodiment, such connotation is meant to apply throughout this specification, *i.e.*, also in the context of other aspects or embodiments, unless otherwise defined.

As noted, the inventors surprisingly realised that phosphorylated Acetyl-CoA carboxylase (ACC) in platelets from a subject can be used as a biomarker for blood coagulation, preferably a biomarker for blood coagulation in the subject.

In a certain way, the methods and uses disclosed herein may be denoted as *in vitro* methods, for example since they comprise determination of platelet ACC phosphorylation in a sample removed from a subject. The term "*in vitro*" generally denotes outside, or external to, a body, *e.g.*, an animal or human body. The term "*ex vivo*" typically refers to tissues or cells removed from a body, *e.g.*, an animal or human body, and maintained or propagated outside the body, *e.g.*, in a culture vessel. The term "*in vitro*" as used herein should be understood to include "*ex vivo*".

The terms "biomarker" or "marker" are widespread in the art and may broadly denote a substance whose qualitative and/or quantitative evaluation in a subject is predictive or informative with respect to one or more aspects of the subject's phenotype and/or genotype. As used herein, the terms "biomarker" or "marker" relate to a substance, in particular phosphorylated platelet Acetyl-CoA carboxylase, which is used as an indicator for blood coagulation.

The term "Acetyl-CoA carboxylase" or "ACC" refers in general to a biotin-dependent enzyme that catalyzes the irreversible carboxylation of acetyl-CoA to produce malonyl-CoA and hence, ACC is mainly involved in regulating the metabolism of fatty acids. ACC is a multi-subunit enzyme in most prokaryotes and in the chloroplasts of most plants and

algae, whereas it is a large, multi-domain enzyme in the endoplasmic reticulum of most eukaryotes. In mammals two forms of ACC are expressed: ACC-alpha, ACC1, ACCA or ACACA and ACC-beta, ACC2, ACCB or ACACB and the term encompasses both forms. Exemplary human ACC1 protein sequence may be as annotated under NCBI Genbank
5 accession number NP_942131.1 (isoform 1) (sequence version 1), NP_942133.1 (isoform 2) (sequence version 1), NP_942136.1 (isoform 2) (sequence version 1), NP_942134.1 (isoform 3) (sequence version 1) or NP_942135.1 (isoform 4) (sequence version 1) and exemplary human ACC2 protein sequence may be as annotated under NCBI Genbank
10 accession number NP_001084.3 (sequence version 3). Exemplary human ACC1 mRNA (cDNA) sequence may be as annotated under NCBI Genbank accession number NM_198834.1 (transcript variant 1) (sequence version 1), NM_198839.1 (transcript variant 2) (sequence version 1), NM_198836.1 (transcript variant 3) (sequence version 1), NM_198837.1 (transcript variant 4) (sequence version 1) or NM_198838.1 (transcript
15 variant 5) or (sequence version 1) and exemplary human ACC2 mRNA (cDNA) sequence may be as annotated under NCBI Genbank accession number NM_001093.3 (sequence version 3).

As used herein, the term "Acetyl-CoA carboxylase" or "ACC" particularly refers to platelet Acetyl-CoA carboxylase. For example and without limitation, the term may refer to either one or more or all forms of ACC present in the platelets of a subject being tested. Hence,
20 for example and without limitation, for human subjects or samples the term may refer to either one or both of ACC-alpha and ACC-beta.

The term "phosphorylated ACC" refers herein to ACC containing one or more phosphate groups, and particularly refers to ACC which is phosphorylated at least at its Ser79 residue (i.e., ACC which comprises a phosphate group added at least at its Ser79
25 residue). The phosphorylated ACC may but need not contain phosphate group(s) at residue(s) other than Ser79.

As used herein, the term "determining" is synonymous for "assessing" and includes "detecting" as well as "measuring". The phrase "determining phosphorylated ACC" can be understood as "determining a value for phosphorylated ACC".

30 "Value" as used herein in the context of "value for phosphorylated ACC" or "reference value" (especially, "reference value for phosphorylated ACC") may refer to a qualitative phosphorylation status or condition of ACC, such as phosphorylated or not phosphorylated, as well as to the level, i.e., amount or quantity, of phosphorylated ACC, encompassing both the absolute level of phosphorylated ACC and the relative or
35 normalised level of phosphorylated ACC.

The distinction between “absolute” and “relative” quantification is well appreciated by a skilled person. For example, absolute level of phosphorylated ACC may refer to the amount or quantity of phosphorylated ACC that correlates with the detected signal representing phosphorylated ACC. Absolute level of phosphorylated ACC may be expressed without limitation as absolute intensity of the detected signal representing phosphorylated ACC, or where possible converted to the weight, molar amount, enzymatic units (or similar quantifier) of phosphorylated ACC, measured typically in a given amount of platelets or platelet protein or platelet protein fraction from a sample. For example, “relative or normalised level of phosphorylated ACC” may be understood as the absolute level of phosphorylated ACC divided by or normalised to the total level of ACC, i.e., the sum of the level of phosphorylated ACC and the level of non-phosphorylated ACC. Otherwise, relative quantification may involve determining the relative amount of phosphorylated ACC in a given amount of platelets or platelet protein or platelet protein fraction from a sample compared to a predetermined control amount of phosphorylated ACC.

Techniques for determining or assessing a phosphorylated protein are well known in the art and include for example, but without limitation, Western blot analysis, Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA), cell-based ELISA, flow cytometry, immunocytochemistry (ICC) or immunohistochemistry (IHC), mass spectrometry and multi-analyte profiling.

Western blot analysis is the most common method used for assessing the phosphorylation status of a protein. Following separation of the sample with SDS- PAGE and subsequent transfer to a membrane, a phospho-specific antibody is used to identify the target protein. Because the measured levels of the phosphorylated protein may change through gel loading errors, one may utilise an antibody that detects the total level of the target protein (regardless of its phosphorylation status) to determine the phosphorylated fraction relative to the total fraction and to serve as an internal loading control. Radioisotope, chemiluminescent and colorimetric detection methods are common, and molecular weight markers are generally used to provide information about protein mass.

The ELISA has become a powerful technique for determining protein phosphorylation status. ELISAs are in general more quantitative than Western blot analysis. The format for this advantageously microplate-based assay typically utilises a capture antibody specific for the target protein, independent of its phosphorylation status. The target protein is then bound to the antibody-coated plate. A detection antibody that specifically recognises the phosphorylated target protein is then added. These assays are typically designed using

colorimetric or fluorometric detection. The intensity of the resulting signal is directly proportional to the concentration of phosphorylated target protein present in the sample and by utilising a calibrated standard results are easily quantifiable. The ELISA may be done manually or automated.

- 5 Recently, several immunoassays, known as cell-based ELISAs, enabling the determination of protein phosphorylation in the context of a whole cell have been developed. The cells are fixed, and blocked in the same well. Phospho-specific antibodies are used to assess phosphorylation status using fluorometric or colorimetric detection systems. These assays bypass the need for the creation of cell lysates and are therefore
10 more amenable to high throughput analyses.

For determination of phosphorylated proteins by flow cytometry and ICC/IHC cells are usually fixed with formaldehyde or paraformaldehyde to cross-link the phosphorylated proteins and stabilize them for analysis. The fixed cells must then be permeabilised to allow for entry of phospho-specific antibodies into the cells.

- 15 Flow cytometry uses a laser to excite the fluorochrome used for antibody detection. Flow cytometry is advantageous because it allows for rapid, quantitative, single cell analysis. Proteins can be detected in a specific cell type within a heterogeneous population via cell surface marker phenotyping without the need to physically separate the cells. Filter sets and fluorochromes with non-overlapping spectra are then carefully chosen to assess
20 multiple proteins in the same cell.

- ICC generally refers to protein detection by microscopy in cultured cells, while IHC refers to protein detection in intact tissue sections. Like flow cytometry, these techniques allow for the assessment of multiple proteins within a cell or tissue provided that adequate attention is given to avoid overlapping fluorescence spectra or colour. Both fluorescent
25 and colorimetric detection techniques are commonly used.

- Mass spectrometry (MS) techniques may also be useful tools for determining phosphorylated proteins. However, there are several inherent difficulties for the analysis of phospho-proteins since signals from phosphopeptides are generally weaker and it can be difficult to observe the signals from low-abundance phosphorylated target proteins in the
30 high-background of abundant non-phosphorylated proteins. To overcome these drawbacks, several enrichment strategies for phospho-protein analysis by MS have been developed including immobilized metal affinity chromatography (IMAC) (Brill, L. M. *et al.* 2004. *Anal. Chem.* 76:2763), phospho-specific antibody enrichment (Steen, H. *et al.* 2002. *J. Biol. Chem.* 277:1031), chemical-modification-based methods such as beta-elimination

of phospho-serine and -threonine (Zhou, H. *et al.* 2001. *Nat. Biotechnol.* 19:375), and replacement of the phosphate group with biotinylated moieties (Oda, Y. *et al.* 2001. *Nat. Biotechnol.* 19:379).

Multiple analyte profiling is a mass spectrometric technique such as collision-induced
5 dissociation (CID) or electron transfer dissociation (ETD) that determines protein
phosphorylation of multiple analytes simultaneously. It involves the use of phospho-
specific antibodies and include microplate-based, bead-based, or membrane-based
detection formats. The obvious benefit of these assays is that throughput capability is
greatly enhanced by bypassing the need for running multiple individual Western blots or
10 traditional ELISA-based assays. These techniques are also known for providing more data
while requiring very little sample volume. In trade, protein profiling assays are typically
recognized as being less sensitive than their more conventional counterparts due to
potential antibody cross-reactivity.

The ALPHAScreen™ technology developed by Perkin Elmer (see, e.g., "A Practical Guide
15 to Working with AlphaScreen™", PerkinElmer LAS literature, 007011_01. Boston:
PerkinElmer, 2004), based on methodology originally developed under the name LOCI
(Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay) by Dade Behring, Inc. of Germany (see,
e.g., Ullman et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 5426-5430; and Ullman et al. *Clin
Chem* 1996, 42: 1518-1526), is a bead-based, non-radioactive Amplified Luminescent
20 Proximity Homogeneous Assay. In this assay, a donor and an acceptor pair of microbeads
are brought into proximity by a biomolecular interaction of binding partners immobilized to
these beads. Excitation of the assay mixture with a high-intensity laser at 680 nm induces
the formation of singlet oxygen at the surface of the donor bead (following conversion of
ambient oxygen to a more excited state by a photosensitizer present in the donor bead).
25 The singlet oxygen molecules can diffuse up to 200 nm. If an acceptor bead is in
proximity, the singlet oxygen can react with a thioxene derivative present in this bead,
generating chemiluminescence at 370 nm that further activates the fluorophores contained
in the same bead. The fluorophores subsequently emit light at 520–620 nm. The donor
bead generates about 60,000 singlet oxygen molecules, resulting in an amplified signal.
30 To assess the phosphorylation status of a protein using this ALPHAScreen™ technology,
suitable binding partners may be a phospho-specific anti-target antibody, which
specifically recognizes the target protein when it is phosphorylated, preferably an anti-
phospho-ACC antibody, bound on one bead and a total anti-target antibody, which
recognizes the target protein irrespective its phosphorylation status, preferably an anti-
35 ACC antibody, bound on the other bead. Such assay kit, preferably an assay kit for

detecting phosphorylated ACC, allows to get a quantitative value for the phosphorylation status of a target protein, preferably ACC.

Hence, in certain embodiments, phosphorylated ACC may be preferably detected using such ALPHAScreen™ based technology.

5 Hence, in certain embodiments, phosphorylated ACC may be detected by an assay comprising:

- first (donor) microbeads and second (acceptor) microbeads,
- wherein the donor microbeads are configured to release singlet oxygen when illuminated by a high-intensity laser, preferably at 680 nm (for example, the donor
10 microbeads may comprise photosensitizer capable of converting ambient oxygen to an excited state),
- wherein the acceptor microbeads comprise a thioxene derivative capable of reacting with said singlet oxygen, whereby said reaction generates chemiluminescence, preferably at 370 nm,
- 15 - wherein the acceptor microbeads further comprise fluorophore configured to be activated by the light output of said chemiluminescence and to emit light, preferably at 520–620 nm, when so activated (by means of explanation, the light output of the fluorophore thus constitutes the readout of the assay),
- wherein either one of the donor microbeads or acceptor microbeads comprise an
20 antibody capable of specifically binding to phosphorylated ACC, particularly to ACC phosphorylated at least on Ser79 (i.e., a phospho-specific anti-ACC antibody), and
- wherein the other one of the donor microbeads or acceptor microbeads comprise an antibody capable of binding to ACC irrespective of its phosphorylation status, particularly preferably irrespective of its phosphorylation status on Ser79.

25 Further, in an aspect, the invention provides a kit comprising the donor microbeads and acceptor microbeads as defined in the previous paragraph. Such kit may optionally also comprise suitable reagents (e.g., buffers) for performing the necessary reactions (e.g., reagents conducive to binding of the donor and acceptor microbeads to the phosphorylated ACC target), suitable controls (e.g., known quantities of phosphorylated
30 ACC or non-phosphorylated ACC), reagents necessary for preparing platelet extract in which phosphorylated ACC can be measured, instructions for use, etc. Any of the components of the kit may be provided in separate vials or in combinations where applicable.

The majority of the above described techniques rely on the use of phospho-specific antibodies, i.e., antibodies that specifically recognise a target protein when it is phosphorylated. Phospho-specific antibodies may be obtained by immunising animals, e.g., rabbits, with phosphorylated proteins or synthetic phospho-peptides representing the amino acid sequence surrounding the phosphorylation site seen in the target protein. These peptides should be sufficient to form an epitope. These peptides may for example comprise from 6 to 20, preferably from 6 to 15, more preferably from 6 to 10 residues of amino acids. Preferably, from the generated antibodies those with high affinity and specificity for the antigen comprising the phosphorylated target protein are selected. Nowadays, phospho-specific antibodies are commercially available for most target proteins.

Techniques for determining or assessing phosphorylated ACC may typically rely on a phospho-ACC (Ser79) antibody that specifically recognizes ACC when phosphorylated at Ser79, such as for example the commercial available phospho-ACC (Ser79) antibodies such as Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) Antibody (#3661, Cell Signaling Technology®), Acetyl Coenzyme A Carboxylase (phospho S79) antibody (ab31931, Abcam) and Anti-phospho-Acetyl CoA Carboxylase (Ser79) (07-303, Millipore). Suitable techniques for determining phosphorylated ACC may include PathScan® Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) Sandwich ELISA kit (#7986, Cell Signaling Technology®).

Phosphorylated ACC is determined herein in “platelets from a subject”, which refers herein to a biological sample of a subject comprising platelets and may include, for example, but without limitation, undiluted and/or diluted whole blood, undiluted and/or diluted blood plasma, fraction(s) of fractionated whole blood such as the platelet rich plasma (PRP) fraction or isolated platelets.

The plasma-rich fraction from whole blood can be generally obtained by centrifugation of the blood at between 100g and 400g for between 5 and 20 min, such as, for example, by centrifugation at 150g for 10 min or at 330g for 15 min. A well-known method for purification of the platelet-rich fraction that allows for isolation of platelets is the OptiPrep™ method, which is based on density gradient centrifugation. There exist also methods that allow for separation of platelets from whole blood without centrifugation such as the method disclosed in WO200210771 using paramagnetic microparticles coated with antibodies that specifically bind to platelets.

The terms “subject” specifically refer to humans, but may also encompass reference to non-human animals, preferably warm-blooded animals, more preferably non-human

mammals, such as, e.g., non-human primates, rodents, canines, felines, equines, ovines, porcines, and the like.

As noted in some preferred embodiments, the subject has been administered an anti-coagulant or a pro-coagulant. Suitable but non-limiting anti-coagulants include, for example, Bivaluridin-Angiox®, which is commercially available and currently used and oral anti-IIa (Dabigatran-Pradaxar®) and anti-Xa (Rivaroxaban-Xarelto®), which are expected to be marketed in the near future.

In some other preferred embodiments, the subject is a patient with a blood coagulation disorder.

10 The term “patient” refers herein a subject that is, or is suspected to be afflicted with a blood coagulation disorder. With the term “blood coagulation disorder” is meant herein any disorder that affects blood coagulation in a subject and encompasses blood clotting disorders as well as bleeding disorders. The term “blood clotting disorder” refers to a condition or disease characterised by an increased tendency, often repeated and over an
15 extended period of time, for excessive clotting or thrombosis. Examples of clotting disorders include *inter alia* Factor V Leiden, protein C deficiency, protein S deficiency, anti-thrombin deficiency, prothrombin 20210A mutations and thrombotic disorders such as, for example, but without limitation, acute thrombotic stroke, venous thrombosis, myocardial infarction, unstable angina, abrupt closure following angioplasty or stent
20 placement and thrombosis as a result of peripheral vascular surgery. The term “bleeding disorder” refers to a condition or disease characterized in poor blood clotting and continuous bleeding. Examples of bleeding disorders include *inter alia* Von Willebrand's disease, hemophilia, including hemophilia A and hemophilia B, Glanzmann's thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome, thrombocytopenia, vitamin K deficiency,
25 amyloidosis, platelet dysfunction, systemic lupus erythematosus and immune thrombocytopenic purpura.

The terms “diagnosis” and “monitoring” are commonplace and well-understood in medical practice.

By means of further explanation and without limitation the term “diagnosis” generally
30 refers to the process or act of recognising, deciding on or concluding on a disease or condition in a subject on the basis of symptoms and signs and/or from results of various diagnostic procedures (such as, for example, from knowing the presence, absence and/or quantity of one or more biomarkers characteristic of the diagnosed disease or condition). As used herein, “diagnosis” of blood coagulation in a subject may particularly mean the

determination of the presence (occurrence) or absence of blood coagulation in the subject.

The term "monitoring" generally refers to the follow-up of a disease or a condition in a subject for any changes which may occur over time. As used herein, "monitoring" blood
5 coagulation in a subject thus particularly refers to the follow-up of the blood coagulation status in the subject for any changes in blood coagulation which may occur over time.

In the methods as taught herein, phosphorylated ACC determined in platelets from a subject may be compared with a reference value for said phosphorylated ACC representing a given status or condition of blood coagulation, such as, e.g., a known
10 status of blood coagulation.

By means of example, but without limitation, a suitable reference value for phosphorylated ACC may – depending on the preference and intention of the experimenter – be the value of phosphorylated ACC in platelets from a subject is known to have no blood coagulation at the time of sampling, or is known to have blood coagulation at the time of sampling, or a
15 subject who has been administered an anti-coagulant or a pro-coagulant.

The present methods may employ reference values for phosphorylated ACC that may be established according to known procedures previously employed for other biomarkers. Such reference values may be established either within (*i.e.*, constituting a step of) or external to (*i.e.*, not constituting a step of) the methods of the present invention as defined
20 herein. Accordingly, any one of the methods taught herein may comprise a step of establishing a reference value for phosphorylated ACC. Such reference value may conveniently represent either (a) diagnosis of the absence of blood coagulation, or (b) diagnosis of the occurrence of blood coagulation, or (c) diagnosis of the occurrence of a certain known extent of blood coagulation.

25 Hence, also provided is a method for establishing a reference value for phosphorylated ACC, said reference value representing:

(a) diagnosis of the absence of blood coagulation, or

(b) diagnosis of the occurrence of blood coagulation, or

(c) diagnosis of the occurrence of a certain known extent of blood coagulation;

30 comprising:

(i) determining phosphorylated ACC in:

(i a) platelets from one or more samples from one or more subjects not having blood coagulation at the time of sampling, or

(i b) platelets from one or more samples from one or more subjects having blood coagulation at the time of sampling, or

(i c) platelets from one or more samples from one or more subjects having a certain known extent of blood coagulation at the time of sampling;

5 and

(ii) storing the determined value of phosphorylated ACC:

(ii a) as determined in (i a) as the reference value representing the diagnosis of the absence of blood coagulation, or

10 (ii b) as determined in (i b) as the reference value representing the diagnosis of the occurrence of blood coagulation, or

(ii c) as determined in (i c) as the reference value representing the diagnosis of the occurrence of a certain known extent of blood coagulation.

In other methods as taught herein, phosphorylated ACC determined in platelets from a subject from two or more successive time points may be compared with each other.

15 Typically, an action or event took place between said two or more time points, such as for example, the administration of an anti-coagulant or pro-coagulant, whereby the outcome of the method may be advantageously informative as to the effect of the administered anti-coagulant or pro-coagulant.

20 Such comparisons may generally include any means to determine the presence or absence of at least one difference and optionally of the magnitude of such difference between values being compared. A comparison may include an arithmetical or statistical comparison of values. Such statistical comparisons include, but are not limited to, applying a rule. When a deviation is found between phosphorylated ACC in platelets from a subject and a reference value, said deviation is indicative or conclusive that the status or condition

25 of blood coagulation in the subject is different from that represented by the reference value. When (substantially) no deviation is found between phosphorylated ACC in platelets from a subject and a reference value, the absence of such deviation is indicative or conclusive that the status or condition of blood coagulation in the subject is substantially the same as that represented by the reference value.

30 When a deviation is found between phosphorylated ACC in platelets from a subject from two or more successive time points, said deviation is indicative or conclusive that the status or condition of blood coagulation in the subject has changed between the two or more successive time points.

When (substantially) no deviation is found between phosphorylated ACC in platelets from a subject from two or more successive time points, the absence of such deviation is indicative or conclusive that the status or condition of blood coagulation in the subject is substantially the same at the two or more successive time points.

- 5 A "deviation" of a value from a value to be compared with, e.g. a reference value, may generally encompass any direction (e.g., increase: value 1 > value 2; or decrease: value 1 < value 2) and any extent of alteration. For example, a deviation may encompass a decrease in a value by, without limitation, at least about 10% (about 0.9-fold or less), or by at least about 20% (about 0.8-fold or less), or by at least about 30% (about 0.7-fold or less), or by at least about 40% (about 0.6-fold or less), or by at least about 50% (about 0.5-fold or less), or by at least about 60% (about 0.4-fold or less), or by at least about 70% (about 0.3-fold or less), or by at least about 80% (about 0.2-fold or less), or by at least about 90% (about 0.1-fold or less), relative to a reference value with which a comparison is being made. For example, a deviation may encompass an increase of a value by, without limitation, at least about 10% (about 1.1-fold or more), or by at least about 20% (about 1.2-fold or more), or by at least about 30% (about 1.3-fold or more), or by at least about 40% (about 1.4-fold or more), or by at least about 50% (about 1.5-fold or more), or by at least about 60% (about 1.6-fold or more), or by at least about 70% (about 1.7-fold or more), or by at least about 80% (about 1.8-fold or more), or by at least about 90% (about 1.9-fold or more), or by at least about 100% (about 2-fold or more), or by at least about 150% (about 2.5-fold or more), or by at least about 200% (about 3-fold or more), or by at least about 500% (about 6-fold or more), or by at least about 700% (about 8-fold or more), or like, relative to a reference value with which a comparison is being made. Preferably, a deviation may refer to a statistically significant observed alteration. For example, a deviation may refer to an observed alteration which falls outside of error margins of values in a given population (as expressed, for example, by standard deviation or standard error, or by a predetermined multiple thereof, e.g., $\pm 1 \times \text{SD}$ or $\pm 2 \times \text{SD}$, or $\pm 1 \times \text{SE}$ or $\pm 2 \times \text{SE}$). Deviation may also refer to a value falling outside of values in a given population (for example, outside of a range which comprises $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 75\%$ or $\geq 80\%$ or $\geq 85\%$ or $\geq 90\%$ or $\geq 95\%$ or even $\geq 100\%$ of values in said population). Alternatively, a deviation may be concluded if an observed alteration is beyond a given threshold or cut-off. Such threshold or cut-off may be selected as generally known in the art to provide for a chosen sensitivity and/or specificity of the methods described herein, e.g., sensitivity and/or specificity of at least 50%, or at least 60%, or at least 70%, or at least 80%, or at least 85%, or at least 90%, or at least 95%. Advantageously, steps involving comparison of

phosphorylated ACC determined in platelets from a subject to a reference value or comparison of phosphorylated ACC determined in platelets from a subject from two or more successive time points with each other may be performed using a computer, such as a general-purpose computer. The hardware architecture of such a computer can be realised by a person skilled in the art, and may comprise hardware components including one or more processors (CPU), a memory (e.g., a random-access memory (RAM) and a read-only memory (ROM)), and an internal or external data storage medium (e.g., hard disk drive). A program configured to direct the computer to carry out the requisite computational steps may be provided on a computer-readable recording medium, such as, e.g., diskette, CD, DVD, etc.

By detecting a deviation between phosphorylated ACC in platelets from a subject and a reference value representing a given status or condition of blood coagulation in the subject, the uses and methods as taught herein may advantageously allow to detect a change (e.g., worsening or improvement) in the blood coagulation status of a subject before (other) symptoms or signs indicative of such change are felt or observed. Likewise, by detecting a deviation between phosphorylated ACC in platelets from a subject taken at different times, the uses and method as taught herein may advantageously allow to detect a change (e.g., worsening or improvement) in the blood coagulation status of a subject before (other) symptoms or signs indicative of such change are felt or observed. This early information about the blood coagulation status of the subject can allow to initiate therapeutic intervention(s) earlier and more effectively.

The methods and uses as taught herein also allow for monitoring the responsiveness of a subject to an anti-coagulant or pro-coagulant that has been administered to said subject and at the same time allow for determining the *in vivo* efficacy of said anti-coagulant or pro-coagulant.

Another application of the methods and uses as taught herein allows for evaluating the risk of bleeding after surgery. The methods and uses as taught herein allow to determine whether platelet activation and activation of the coagulation cascade are functional in bleeding patients. In addition, as shown in the experimental section, the level of ACC phosphorylation (directly linked to platelet activation and activation of the coagulation cascade) may be proportional to the importance of bleeding. Therefore, in a patient with normal coagulation, ACC phosphorylation may be an indicator of bleeding severity and predict complications.

Yet another application of the methods and uses as taught herein allow for evaluating the recovery of thrombin generation after surgery towards basal thrombin generation (i.e.

thrombin generation before surgery). Thrombin generation can be quantified through measuring endogenous thrombin potential (ETP). As shown in the experimental section, the level of ACC phosphorylation may be proportional to the recovery of thrombin generation or ETP value after surgery.

- 5 Another aspect of the present invention relates to methods and uses for screening one or more test agents for candidate anti-coagulants or pro-coagulants.

As used herein, the term "agent" broadly refers to any chemical (*e.g.*, inorganic or organic), biochemical or biological substance, molecule or macromolecule (*e.g.*, biological macromolecule), a combination or mixture thereof, a sample of undetermined
10 composition, or an extract made from biological materials such as bacteria, plants, fungi, or animal cells or tissues. Non-limiting "agents" include antibodies and fragments and derivatives thereof, polypeptides or proteins, peptides, peptidomimetics, aptamers, photoaptamers, chemical substances, preferably organic molecules, more preferably small organic molecules, lipids, carbohydrates, polysaccharides, nucleic acids,
15 oligonucleotides, ribozymes, *etc.*, and any combinations thereof.

The term "anti-coagulant" generally refers to an agent that prevents blood coagulation or delays blood coagulation, *i.e.* an agent that prevents blood from clotting or prevents a clot that has formed from enlarging. They may inhibit clot formation by blocking the action of clotting factors or platelets.

- 20 In preferred embodiments, the anti-coagulant administered to a subject or screened for in the methods and uses as taught herein is selected from the group comprising an inhibitor of thrombin production, an inhibitor of thrombin activity (*e.g.* a direct thrombin inhibitor), an inhibitor of binding of thrombin to a platelet thrombin receptor, a platelet thrombin receptor antagonist, inhibitor of platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated
25 platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation

The term "direct thrombin inhibitor" or "DTI" refers to an anticoagulant that directly inhibits thrombin.

- The term "platelet thrombin receptor" as used herein generally refers to any receptor on the platelet surface to which thrombin binds and which activation by thrombin leads to an
30 intracellular signalling. The term refers in particular to a platelet activated receptor (PAR), preferably human PAR-1 and PAR-4 and mouse PAR-3 and PAR-4. Suitable examples of a platelet thrombin receptor antagonist are E555 and Vorapaxar.

The term "pro-coagulant" generally refers to an agent that promotes blood coagulation.

In a preferred embodiment, the pro-coagulant administered to a subject or screened for in the methods and uses as taught herein is selected from the group comprising an activator of thrombin production or thrombin activity, thrombin, a platelet thrombin receptor agonist.

While the invention has been described in conjunction with specific embodiments thereof, it is evident that many alternatives, modifications, and variations will be apparent to those skilled in the art in light of the foregoing description. Accordingly, it is intended to embrace all such alternatives, modifications, and variations as follows in the spirit and broad scope of the appended claims.

The above aspects and embodiments are further supported by the following non-limiting examples.

EXAMPLES

Example 1 Experimental procedures

Animals

AMPK $\alpha 1^{-/-}$ (mixed C57BL6 and SV-129 background) mice were generated as described (Jørgensen et al. 2004 J Biol Chem 279(2): 1070-1079). All animal procedures and protocols were approved by local authorities (Comité d'éthique facultaire pour l'expérimentation animale, UCL/MD/2007/049) and were performed in agreement with the guidelines on animal experimentation at our institution. Moreover, this study conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Study population.

Blood was taken from 6 patients who underwent cardiac surgery with a cardio-pulmonary bypass procedure (CPB). None of these patients received aspirin or other anti-platelet agent at least 5 days before surgery. Patients who had suffered from acute coronary syndrome or other thrombotic processes in a period of 6 months before surgery, were excluded from the study.

Study design.

A blood sample was drawn during CPB. Under this condition, all patients received unfractionated heparin (UFH) as a bolus before CBP and had an activated coagulation time (ACT) above 450 s. ACT was measured at the bedside of the patients: a sample of blood was drawn, transferred into an appropriate test vial and the clotting time was measured. The second sample was taken 4 h after surgery and the coagulation was assessed in the same time (activated partial thromboplastin time, apTT; thrombin time, TT). Thrombin time (Thromboclotin™, Siemens, Marburg, Germany) and activated partial

thromboplastin time (Platelin L; bioMérieux, France) were measured in a tube containing 0.129 M of trisodium citrate and determined using a coagulation device (MDA II coagulation analyzer; bioMérieux). After surgery, a chest tube was inserted and a closed chest drainage system was attached to promote drainage of air and fluid. Bleeding was evaluated by the amount of blood collected in the chest tube of drainage over a period of 6 h after admission in intensive cares.

Endogenous thrombin potential (ETP) was measured using a fluorogenic thrombin generation assay. Briefly, 80 μ l of platelet-poor plasma were pipetted into the well of a microplate together with 20 μ l of a mixture of Tissue Factor (final concentration 20 pM) and phospholipids (final concentration 4 μ M) (PPP-Reagent HIGH, Thrombinoscope bv, Maastricht, The Netherlands). The plate was put in a pre-warmed measuring chamber and 20 μ L of the fluorogenic substrate with CaCl_2 0.1M (FluCa Kit, Thrombinoscope bv) was automatically dispensed into each well. The fluorescence signal was then recorded for 30 min at 15-second time intervals. As there is no direct correlation between thrombin activity and fluorescent signal intensity (amongst others because thrombin bound to α 2-macroglobulin retains its activity to the fluorogenic substrate), the splitting of the fluorogenic substrate is compared to a constant known thrombin activity in a parallel non-clotting sample containing Thrombin Calibrator (Thrombinoscope bv), the so called calibrated automated thrombogram. Accordingly, ETP values were calculated and corrected for α 2-macroglobulin complex activity by using the Calibrated Automated Thrombogram.

Integrity of the platelet PAR was assessed by the Multiplate[®] TRAP test. Briefly, 300 μ l of saline and 300 μ l of a blood sample (usually hirudin or heparin blood) were pipetted into a Multiplate[®] test cell. The sample was allowed to warm and equilibrate for 3 minutes. Then, the activator thrombin receptor activating peptide (TRAP-6, a potent agonist which mimicks the platelet-activating action of thrombin) was added. The Multiplate[®] analyzer recorded platelet aggregation at approximately 0.5 second intervals. The principle of Multiplate[®] analysis is based on the fact that platelets become sticky upon activation and adhere and aggregate onto the metal sensor wires in the Multiplate[®] test cell. The increase in impedance by the attachment of activated platelets onto the Multiplate[®] sensors was transformed to arbitrary Aggregation Units (AU) and plotted against time. Three parameters were calculated: Aggregation, the Area Under the aggregation Curve (AUC) and Velocity. The most important parameter is AUC, which is recorded as Units (U). It is affected by the total height of the aggregation curve as well as by its slope and is best suited to express the overall platelet activity. The Aggregation (in AU) is the

maximum height of the curve during the measurement period and the Velocity (in AU/min) is the maximum slope of the curve. The output data calculated by the software was the mean value of the two independent sensors in the test cell. The correlation coefficient of the individual measurements was determined and the analysis was accepted when the correlation coefficient was greater than 0.98. Additionally, the difference of each curve from the mean curve (DIF) was calculated and was accepted when the difference was less than 20%.

Platelet isolation

Washed human platelets (used in *in vitro* studies). Platelets were obtained from adult healthy volunteers in accordance with the Ethics Commission of our institution (Commission d'Ethique Biomédicale Hospitalo-Facultaire, Université catholique de Louvain). Whole blood was collected with butterfly needle 21G into Sodium Citrate 1:10 solution (S-monovette). Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by 15 min centrifugation at 330g. The platelets pellet was then washed in Tyrode modified buffer (135 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 1mM Sodium Citrate, 2.9 mM KCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 5 mM D-glucose, 10 mM HEPES, 0.35 % bovine serum albumin (BSA), pH 7.4 at 37°C) and resuspended to a density of 2.5 10⁵ platelets/μl for the measurement of intracellular Ca²⁺ or platelet aggregation. For Western Blot analysis, PRP with eptifibatide 4 μg/ml (Integriline, GlaxoSmithKline) and ectonucleotidase apyrase (grade I) 0.5 U/ml was layered over a density barrier of iodixanol (Optiprep®) that allowed the erythrocytes and leucocytes to pellet during centrifugation at 350g for 15 min. The platelets, because of their small size, sediment much more slowly. After centrifugation at 800g for 10 min, the resulting pellet was resuspended to a density of 2. 10⁵ platelets/μl in Tyrode modified buffer before treatment and lysis of samples.

Non-washed human platelets (used in *in vivo* studies). Platelets were obtained from patients after admission in intensive cares, in accordance with the Ethics Commission of our institution. Whole blood was collected with butterfly needle 21G into Sodium Citrate 1:10 solution (S-monovette). PRP was obtained by 15 min centrifugation at 330g. For Western Blot analysis, PRP with eptifibatide 4 μg/ml (Integriline, GlaxoSmithKline) and ectonucleotidase apyrase (grade I) 0.5 U/ml was layered over a density barrier of iodixanol (Optiprep®) that allowed the erythrocytes and leucocytes to pellet during centrifugation at 350g for 15 min. The platelets, because of their small size, sediment much more slowly. After centrifugation at 800g for 10 min, the resulting pellet was resuspended to a density of 2. 10⁵ platelets/μl in Tyrode modified buffer before lysis of samples for Western blot analysis.

Murine platelets. Eight- to 12-week-old mice were bled under sodium pentobarbital anesthesia (25–35 mg.kg⁻¹) from the retroorbital plexus. Mouse blood was collected in a 1/10 ACD solution (12 mM citric acid, 15 mM sodium citrate, 25 mM glucose) with ectonucleotidase apyrase (grade I) 0.5U/ml. PRP was obtained by centrifugation at 800g for 5 s followed by 5 min at 150g. PRPs from three animals were pooled. Platelets were washed in Tyrode modified buffer and resuspended to a density of 2.5 10⁵ platelets/μl for the measurement of platelet aggregation and for Western Blot analysis. At least three independent experiments were performed on PRP from different pools.

Measurement of platelet aggregation

Light transmission during thrombin-induced platelet aggregation in human and murine PRP was recorded with a Chrono-Log Aggregometer at 37°C, under stirring condition (1200 crpm). The platelet suspension was incubated with dimethyl sulfoxide (DMSO, vehicle) or STO-609 (10 μM, Tocris) for 2 min before the addition of the thrombin (+/- 0.03 U/ml). CaCl₂ 2 mM was added prior to the agonists.

Western Blotting

Proteins were separated as described (Miranda et al. 2010. J Clin Invest 103(6): 879-887). The membranes were probed with the following antibodies: α1/α2 AMPK (Kinasource), phospho-ACC (S79) (1:1000; Cell Signalling), phospho-MLC (S19) (1:10000; Sigma-Aldrich), phospho-VASP (T278) (1:1000; ECM Bioscience), cofilin (Cell Signalling), phospho-cofilin (Ser 3) (Cell Signalling). Bound antibodies were detected by enhanced chemiluminescence (Thermofisher). For each gel, control of loading was realized by immunoblotting using an anti-β-actin (1:10000; Santa Cruz Biotechnology), anti-gelsolin (Santa Cruz Biotechnology) or anti-GAPDH (1:1000; Cell Signalling) antibody after the membranes were stripped. Band intensities were quantified by scanning and processing image intensities with the program ImageJ (1.33 for Mac OS X). The quantification of immunoblots presented in results was obtained after normalization using the internal loading control.

AMPK enzyme assays

AMPK was immunoprecipitated with 10 μg of α1-AMPK or α2-AMPK antibodies (Kinasource) from 50 μg of platelet extracts and assayed in a final volume of 50 μl Hepes 50 mM, pH 7.2, with 0.2 mM SAMS peptide (Substrate for AMP-activated Protein Kinase, Tocris Bioscience), 0.2 mM adenosine 5'-monophosphate (AMP), and 0.1 mM [³²P]MgATP (specific radioactivity: 1000 cpm/pmol; Perkin Elmer) at 30°C. Aliquots (10 μl) were removed and spotted onto Whatman P81 papers for measurement of ³²P incorporation. One unit of protein kinase activity corresponds to the incorporation of 1

nmol of phosphate into the appropriate peptide substrate per min under the assay conditions.

Flow cytometry

Flow cytometric analysis was performed on a FACScan (Becton Dickinson). Washed
5 human platelets ($2 \cdot 10^5$ platelets/ μ l) were pre-incubated with DMSO/STO-609 for 2 min
and then treated with or without thrombin (0.025 U/ml) in the presence of excessive
amounts of FITC-conjugated monoclonal antibody (anti-CD62P (BD Biosciences) or PAC-
1 (BD Biosciences)) at room temperature. The samples were then fixed at 4°C for 30 min
10 with 2% paraformaldehyde. The levels of P-selectin expression and PAC1 binding were
expressed as the percentages of cells positive for anti-CD62P and PAC-1, respectively.
The negative cut-off for each antibody was set using resting platelets that gave less than
5% of cells positive for binding of anti-CD62P or PAC-1.

Cytosolic Ca²⁺ measurement

Platelets pelleted from the platelet-rich plasma were suspended in Ca²⁺-free modified
15 Tyrode's buffer and then incubated with 3 μ M fluo-3/acetoxymethyl ester (Santa Cruz
Biotechnology) at 37°C for 30 min. Probenecid 2.5 mM (Sigma-Aldrich) was added to the
buffer throughout the experiments to prevent leakage of the dye. After 2 washings, fluo-3-
loaded platelets were suspended in modified Tyrode's buffer at a concentration of $2 \cdot 10^7$
platelets/ml. They were then pre-incubated with 10 μ M STO-609 in the presence of 1 mM
20 extracellular Ca²⁺ with stirring at 37°C for 2 min before the addition of thrombin (0.1 U/ml).
Fluorescence (excitation 505 nm, emission 530 nm) was measured with a
spectrophotometer (AMINCO SPF500). Ca²⁺ concentration as estimated as follows: $K_d \cdot$
(F-Fmin)/(Fmax-Fmin), where the Kd of Fluo-3 is (864 mM at 37°C). The minimal
fluorescence (Fmin) is the fluorescence in the absence of Ca²⁺ and Fmax is the
25 fluorescence determined with ionomycin 1 μ M.

Thromboxane B2 assay

Because thromboxane A2 is very unstable and converts rapidly to TXB2, a more stable
metabolite, the latter was measured. After 2 min pre-incubation with 10 μ M STO-609 or
DMSO, washed platelets were treated with 0.1 U/ml thrombin for 5 min. Negative controls
30 corresponded to platelets activated by thrombin in the presence of 1 mM acetylsalicylic
acid (ASA). Platelet suspensions were pelleted (quick speed), and TXB2 in the
supernatants was assayed according to the manufacturers instructions (Enzo Life
Sciences).

Example 2 Thrombin induces AMPK activation *in vitro* via the stimulation of CaMKK β

Resting platelets were purified from human peripheral blood as described in the experimental procedures.

5 AMPK expression in human platelets was analysed by Western Blotting. Figure 1A shows that human platelets expressed the $\alpha 1$ subunit of AMPK. Extracts from mesenchymal stem cells (MSC) and from liver and heart were used as a positive control for $\alpha 1$ and $\alpha 2$ expression, respectively.

Treatment of the human platelets with 0.1 U/ml thrombin led to AMPK activation (Fig. 1B).

10 AMPK was immunoprecipitated with anti- $\alpha 1$ - and anti- $\alpha 2$ -AMPK antibodies prior to AMPK assay. The AMPK catalytic $\alpha 1$ -subunit isoform accounted for the total AMPK activity in platelets (Fig. 1B), confirming the immunoblotting results.

Thrombin-induced AMPK activation was mediated by CaMKK β , an upstream kinase in the AMPK cascade (Fig. 1D). Human platelets were shown to express the CaMKK $\beta 1$ isoform
15 predominantly expressed in rat brain and in vascular smooth muscle cells (VSMC) by probing platelet extracts with a polyclonal antibody that recognizes CaMKK β . The platelets extracts contained a major band (65,000) corresponding to the CaMKK $\beta 1$ isoform (Fig. 1C).

STO-609 (Tocris) is a relatively selective and cell permeable inhibitor of CaMKK β . At a
20 concentration of 10 μ M, STO-609 markedly reduced AMPK activation, as judged by a decrease in phosphorylation of AMPK Thr172 (not shown) and of downstream Ser79 acetyl-CoA carboxylase (ACC) (Fig. 1D).

Example 3 STO-609 prevents platelet aggregation and secretion *in vitro*

To evaluate the potential implication of CaMKK β in platelet aggregation, washed human
25 platelets were pre-incubated for 2 min with 10 μ M STO-609, prior to treatment with thrombin or ADP.

STO-609 significantly inhibited thrombin-induced platelet aggregation (0.025 U/ml thrombin: 69 \pm 3 % of aggregation; thrombin + STO609: 11 \pm 4 % of aggregation, P<0.001) (Fig. 2A).

30 Platelet aggregation caused by 20 μ M ADP was not inhibited by STO-609 (Fig. 2B). ADP did also not lead to ACC phosphorylation (not shown), indicating that the CaMKK β /AMPK pathway is specifically activated by thrombin.

In addition to aggregation measurements, we examined by flow cytometry STO-609 effects on PAC-1 binding, an antibody specific for the activated conformation of $\alpha IIb\beta 3$.

35 Platelets were activated by 0.025 U/ml thrombin in the absence or presence of 10 μ M

STO-609. The CaMKK β inhibitor STO-609 significantly inhibited PAC-1 binding in response to thrombin (Fig. 2C).

In addition, the effect of STO-609 on α -granule release was determined by measuring the exposure on platelet surface of P-selectin (CD62P). STO-609 significantly inhibited
5 CD62P detection per platelet in response to thrombin treatment (Fig. 2D).

Example 4 STO-609 prevents MLC and VASP phosphorylation *in vitro*

Human platelet incubation with thrombin led to an increase in myosin light chain (MLC) Ser 19 phosphorylation (Fig. 3A), which was significant after 2 min and persisted till 10 min of treatment. Pre-incubation with STO-609 decreased significantly MLC
10 phosphorylation (Fig. 3A).

In human platelets, thrombin led also to a significant increased phosphorylation of VASP on Thr 278 (Fig. 3B). Pre-incubation with STO-609 prevented thrombin- induced VASP phosphorylation on this site (Fig. 3B).

These data show that the CaMKK β /AMPK cascade is involved in MLC and VASP
15 phosphorylation and suggest that the CaMKK β /AMPK cascade may play a role in the changes in actin cytoskeleton induced by thrombin in platelets.

Example 5 Platelet aggregation and MLC phosphorylation is decreased in AMPK α 1-knockout mice.

As the α 1-subunit isoform accounted for the total AMPK in human platelets (Fig. 1A,B),
20 we used α 1-AMPK knockout (KO) mice and we examined thrombin-induced platelet aggregation and MLC phosphorylation.

By contrast with human platelets, platelets from wild-type (WT) mice expressed both α -AMPK isoforms (Fig. 4A). As expected, no α 1-AMPK could be detected from α 1-AMPK KO mice.

25 In agreement with the data obtained using human platelets, thrombin-induced aggregation was attenuated in platelets from KO mice versus WT mice (Fig. 4B).

Example 6 Analysis of blood coagulation in patients undergoing cardiac surgery

During cardiac surgery, each of 6 patients received unfractionated heparin (UFH) to reach an activated coagulation time (ACT) above 450 sec. The mean ACT during the first
30 sampling was 568 ± 65 sec after administration of 25250 ± 11000 UI UFH (Table 7). Under these conditions, activated partial thromboplastin time (aPTT) and thrombin time (TT) values were above 180 sec and 120 sec, respectively.

The second sample was taken 4 h after the admission in intensive cares. A coagulation assessment was performed in the same time. At this time, aPTT was 30 ± 2 sec and TT

was 25 ± 3 sec, demonstrating a normal capacity to coagulate (Table 7). The International Normalized Ratio (INR) and fibrinogen were normal (data not shown) and platelets count was above $100\,000/\text{mm}^3$ for each patient.

5 **Table 1 Assessment of blood coagulation in patient 1.** Patient 1 underwent aortic valve replacement. Blood coagulation was assessed during and 4 h after surgery.

	during surgery	post-surgery
ACT (s)	485	not applicable
aPTT (s)	> 180	34
TT (s)	> 120	21
UFH (units)	17000	-
chest tube drainage over 6 h	-	165

Table 2 Assessment of blood coagulation in patient 2. Patient 2 underwent Bentall operation. Blood coagulation was assessed during and 4 h after surgery.

	during surgery	post-surgery
ACT (s)	523	not applicable
aPTT (s)	> 180	32
TT (s)	> 120	23
UFH (units)	33000	-
chest tube drainage over 6 h	-	160

10 **Table 3 Assessment of blood coagulation in patient 3.** Patient 3 underwent mitral valvuloplasty. Blood coagulation was assessed during and 4 h after surgery.

	during surgery	post-surgery
ACT (s)	635	not applicable
aPTT (s)	> 180	30
TT (s)	> 120	28
UFH (units)	25500	-
chest tube drainage over 6 h	-	80

Table 4 Assessment of blood coagulation in patient 4. Patient 4 underwent Tirone-

David operation. Blood coagulation was assessed during and 4 h after surgery.

	during surgery	post-surgery
ACT (s)	498	not applicable
aPTT (s)	> 180	29
TT (s)	> 120	24
UFH (units)	10000	-
chest tube drainage over 6 h	-	105

Table 5 Assessment of blood coagulation in patient 5. Patient 5 underwent aortic valve replacement. Blood coagulation was assessed during and 4 h after surgery.

	during surgery	post-surgery
ACT (s)	698	not applicable
aPTT (s)	> 180	30
TT (s)	> 120	24
UFH (units)	25000	-
chest tube drainage over 6 h	-	335

5

Table 6 Assessment of blood coagulation in patient 6. Patient 6 underwent CABG. Blood coagulation was assessed during and 4 h after surgery.

	during surgery	admission in intensive care unit	after protamine injection
ACT (s)	568	not applicable	not applicable
aPTT (s)	> 180	40	27
TT (s)	> 120	> 120	30
UFH (units)	41000	-	-
chest tube drainage over 6 h	-	520	

Table 7 Assessment of blood coagulation in patients undergoing and recovering from cardiac surgery. Mean values for the blood coagulation parameters obtained from patients 1-6.

	during surgery	post-surgery
ACT (s)	568 ± 65	not applicable

10

aPTT (s)	> 180	30 ± 2
TT (s)	> 120	25 ± 3

ACC phosphorylation significantly increased in the post-operative status (with normal coagulation) compared to the CPB status (under high dose of UFH) (Fig. 5H). Each patient individually exhibited an increase in ACC phosphorylation (Fig. 5A-F and 6A). However, the extent of the effect varied between subjects. We correlated this effect with the post-operative bleeding severity characterized by chest tube drainage and showed that the bleeding severity was proportional to the increase in ACC phosphorylation (Fig. 5I). Note that bleeding for the patient 6 was more pronounced than expected. By contrast with the other patients, he exhibited an abnormal coagulation immediately after the admission in the intensive cares, which was responsible for a more important bleeding during this initial phase. Bleeding was controlled after restoration of coagulation by protamine administration.

In conclusion, our data clearly indicate that phosphorylation of ACC reflects coagulation cascade activation. It could predict bleeding complications after major surgery in patients with normal coagulation.

15 **Example 7 Analysis of blood coagulation in patients undergoing cardiac surgery (larger study)**

A larger study was set up to evaluate blood coagulation in a clinical situation in accordance with the study design of Examples 1 and 6. 29 patients who underwent elective cardiac surgery with CPB were included in the study. Diabetic patients were excluded from the study.

Blood samples were drawn before the surgery (basal); during surgery, after bolus administration of unfractionated heparin (UFH) to reach an activated clotting time (ACT) above 450 s; and 4 hours after surgery after blood coagulation correction (post-surgery).

Blood coagulation was assessed during surgery and post-surgery through measurement of activated partial thromboplastin time (aPPT) and thrombin time (TT).

During surgery, the mean ACT was 594 ± 100 sec after administration of 47086 ± 17766 UI UFH (Table 8). Under these conditions, activated partial thromboplastin time (aPTT) and thrombin time (TT) values were above 180 sec and 120 sec, respectively. The second blood coagulation assessment was performed 4 hours after surgery. At this time, aPTT was 36.3 ± 7.4 sec and TT was 21.3 ± 5.2 sec, demonstrating a normal capacity to coagulate (Table 8). The International Normalized Ratio (INR) and fibrinogen were normal (data not shown) and platelets count was above $100\,000/\text{mm}^3$ for each patient.

Table 8 Assessment of blood coagulation in patients undergoing and recovering from cardiac surgery. Mean values for the blood coagulation parameters obtained from the patients in the study (n=29).

	during surgery	post-surgery
ACT (s)	594 ± 100	not applicable
aPTT (s)	> 180	36.3 ± 7.4
TT (s)	> 120	21.3 ± 5.2

Platelets were isolated from the blood samples drawn during surgery and after surgery and ACC phosphorylation was evaluated. As shown in Figure 6A, ACC phosphorylation significantly increased in the post-operative status (with normal coagulation) as compared to the CPB status (under high dose of UFH).

Thrombin generation was assessed through measurement of endogenous thrombin potential (ETP) before surgery, during surgery and 4 hours after surgery. Following cardiac surgery, there is a partial recovery of basal (i.e. before surgery) thrombin generation (Fig. 6B,C). The huge heterogeneity of ETP values observed post-surgery reflects the random ability of patients to generate thrombin after CPB (Fig. 6C).

ACC phosphorylation was evaluated in 2 extreme groups of patients, recovering more than 80% and less than 20% of basal ETP, respectively. The increase in ACC phosphorylation in the post-operative status as compared to the CPB status was significantly higher in the platelets of patients preserving an intact ability to generate thrombin (ETP > 80%) (Fig. 6D). These data support the use of phosphorylated ACC in platelets from a subject as a biomarker for thrombin generation *in vivo* (i.e. in said subject).

The integrity of the platelet PAR receptor, and its ability to be activated upon thrombin stimulation were evaluated using the Multiplate® TRAP test.

The increase in ACC phosphorylation in the post-operative status as compared to the CPB status was correlated with the post-operative bleeding severity characterized by chest tube drainage in patients with a positive TRAP test (≥ 830 A.U.) and without transfusion of platelets during CPB. The bleeding severity was proportional to the increase in ACC phosphorylation in these patients ($R^2 = 0,7149$; Fig. 6E). These data support the use of phosphorylated ACC in platelets from a subject as a biomarker for platelet responsiveness, in particular thrombin-induced platelet responsiveness, in said subject.

In conclusion, our data indicate that phosphorylated ACC in platelets from a patient can be

simultaneously used as a biomarker of thrombin generation and platelet responsiveness in said patient.

Example 8 Thrombin specifically induces ACC phosphorylation in human platelets

5 Platelets were isolated from human blood samples as described in the experimental procedures. The isolated platelets were treated with increasing doses of thrombin (0.01, 0.03, 0.1, 0.3 and 1 U/ml), the thromboxane A2 (TXA2) receptor agonist U46619 (0.1, 0.3, 1, 3 and 10 μ M), collagen (0.5, 1, 2.5, 5 and 10 μ g/ml) or ADP (2.5, 5, 10, 25 and 50 μ M) for 1 min. Following treatment, the platelets were lysed and subjected to Western blotting for determining phosphorylation of Ser79 of ACC.

10 Thrombin induced Ser79 ACC phosphorylation, confirming the results of Example 2. The other platelet agonists ADP, collagen and U46619 failed to increase ACC phosphorylation comparably to thrombin (Fig. 7).

These data indicate that phosphorylated ACC in platelets may be useful as biomarker for blood coagulation specifically mediated by thrombin.

15 **Example 9 The CaMKK β inhibitor STO-609 does not interfere with Ca²⁺ signalling or thromboxane B2 (TXB2) formation in human platelets.**

To evaluate the potential implication of CaMKK β in Ca²⁺ signalling and thromboxane B2 (TXB2) formation, platelets were pre-incubated with STO-609 prior to treatment with thrombin. Cytosolic Ca²⁺ and thromboxane B2 (TXB2) formation were measured as
20 described in the experimental procedures.

STO-609 did not modify the rise in Ca²⁺ concentration in response to thrombin (Fig. 8A). STO-609 did also not affect thrombin-induced TXB2 formation (Fig. 8B).

These data show that the inhibitory effect of STO-609 on platelet activation, aggregation and degranulation as shown in Example 3, did not result from alteration of Ca²⁺ signalling
25 or thromboxane B2 (TXB2) formation.

Example 10 STO-609 prevents thrombin-induced cofilin phosphorylation *in vitro*

Human platelet incubation with thrombin led to an increase in cofilin phosphorylation in Ser3, which was maximal at 1 min and persisted for 10 min (Fig. 9). Pre-incubation with STO-609 significantly decreased cofilin phosphorylation 10 min after thrombin exposure
30 (Fig. 9).

These data show that the CaMKK β /AMPK cascade is involved in cofilin phosphorylation and suggest that the CaMKK β /AMPK cascade may play a role in the changes in actin cytoskeleton induced by thrombin in platelets.

Example 11 ACC, MLC, VASP and cofilin phosphorylation are decreased in AMPK α 1-knockout mice.

Platelets isolated from α 1-AMPK knockout (KO) mice were used to examine the role of this AMPK isoform in thrombin-induced ACC, MLC, VASP and cofilin phosphorylation.

- 5 The increase in ACC phosphorylation was reduced by about 75% in platelets from KO compared to WT mice. The residual phosphorylation may result from AMPK- α 2 activation (Fig. 10A).

10 Thrombin 0.05 U/ml induced an increase in the phosphorylation of MLC, VASP and cofilin in platelets isolated from WT mice (Fig. 10B-D). The phosphorylation of these cytoskeleton proteins was significantly reduced in platelets from their KO littermates (Fig. 10B-D). These data indicate that MLC, VASP and cofilin are substrates of AMPK- α 1 in murine platelets.

15 In agreement with the data obtained using human platelets, thrombin-induced ACC, MLC, VASP and cofilin phosphorylation were decreased in platelets from KO mice versus WT mice.

CLAIMS

1. Use of phosphorylated Acetyl-CoA carboxylase (ACC) in platelets from a subject as a biomarker for blood coagulation in the subject.
2. The use according to claim 1 for the diagnosis or the monitoring of blood coagulation in the subject.
5
3. A method for determining blood coagulation in a subject comprising determining phosphorylated ACC in platelets from the subject, preferably comprising measuring the level of phosphorylated ACC in the platelets from the subject.
4. The method according to claim 3 for the diagnosis of blood coagulation in the subject
10 comprising:
 - (i) determining phosphorylated ACC in platelets from the subject;
 - (ii) comparing phosphorylated ACC as determined in (i) with a reference value, said reference value representing a known status of blood coagulation;
 - (iii) finding a deviation or no deviation of phosphorylated ACC as determined in (i) from
15 said reference value;
 - (iv) attributing said finding of deviation or no deviation to a particular diagnosis of blood coagulation in the subject.
5. The method according to claim 4, wherein in step (iv) higher phosphorylated ACC in
20 platelets from the subject as compared to the reference value is attributed to increased blood coagulation compared to the blood coagulation status represented by the reference value.
6. The method according to claim 3 for the monitoring of blood coagulation in the subject comprising:
 - (i) determining phosphorylated ACC in platelets from the subject from two or more
25 successive time points;
 - (ii) comparing said phosphorylated ACC as determined in (i);
 - (iii) finding a deviation or no deviation of said phosphorylated ACC as compared in (b);
 - (iv) attributing said finding of deviation or no deviation to a particular change in blood coagulation in the subject between the two or more successive time points.
- 30 7. The use according to any one of claims 1 or 2 or the method according to any of claims 3 to 6, wherein said blood coagulation comprises thrombin production.

8. The use according to any one of claims 1 or 2 or the method according to any of claims 3 to 6, wherein said blood coagulation comprises the activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4.
9. The use according to any one of claims 1 or 2 or the method according to any of claims 3 to 6, wherein said blood coagulation comprises platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation.
10. The use according to claim 9 or the method according to claim 9, wherein said platelet activation results in platelet aggregation and/or platelet degranulation.
11. The use according to any one of claims 1, 2, 7 to 10 or the method according to any of claims 3 to 10, wherein said subject has been administered an anti-coagulant or a pro-coagulant.
12. The use according to claim 11 or the method according to claim 11, wherein said subject has been administered an anti-coagulant selected from the group comprising an inhibitor of thrombin production, an inhibitor of thrombin activity (e.g. a direct thrombin inhibitor), an inhibitor of binding of thrombin to a platelet thrombin receptor, a platelet thrombin receptor antagonist, inhibitor of platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation or a pro-coagulant selected from the group comprising an activator of thrombin production or thrombin activity, thrombin, a platelet thrombin receptor agonist.
13. The use according to any one of claims 1, 2, 7 to 12 or the method according to any of claims 3 to 12, wherein said subject is a patient with a blood coagulation disorder.
14. Use of phosphorylated ACC in platelets from a subject for screening of one or more test agents for a candidate anti-coagulant or pro-coagulant, wherein the subject has been administered the test agent.
15. A method for screening one or more test agents for a candidate anti-coagulant or pro-coagulant, comprising determining whether phosphorylated ACC is modulated in platelets from a subject, wherein the subject has been administered the test agent.
16. A method for screening one or more test agents for a candidate anti-coagulant or pro-coagulant comprising:
- (i) contacting a test agent with platelets;
 - (ii) determining whether said test agent can modulate phosphorylated ACC in said platelets.

17. The use according to claim 14 or the method according to any of claims 15 or 16, wherein said anti-coagulant is selected from the group comprising an inhibitor of thrombin production, an inhibitor of thrombin activity (e.g. a direct thrombin inhibitor), an inhibitor of binding of thrombin to a platelet thrombin receptor, a platelet thrombin receptor antagonist, inhibitor of platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation or wherein said pro-coagulant selected from the group comprising an activator of thrombin production or thrombin activity, thrombin, a platelet thrombin receptor agonist.

18. Use of ACC in platelets from a subject as a biomarker for:

- 10 - thrombin production; or
- activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or
- platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or
- 15 - platelet aggregation and/or platelet degranulation.

19. A method for determining thrombin production; or activation of a platelet thrombin receptor, preferably PAR, more preferably PAR1 and/or PAR4; or platelet activation, preferably platelet thrombin receptor-mediated platelet activation, more preferably thrombin-induced platelet activation; or platelet aggregation and/or platelet degranulation, comprising determining phosphorylated ACC in platelets from a subject, preferably

20 comprising measuring the level of phosphorylated ACC in the platelets from a subject.

FIG. 1

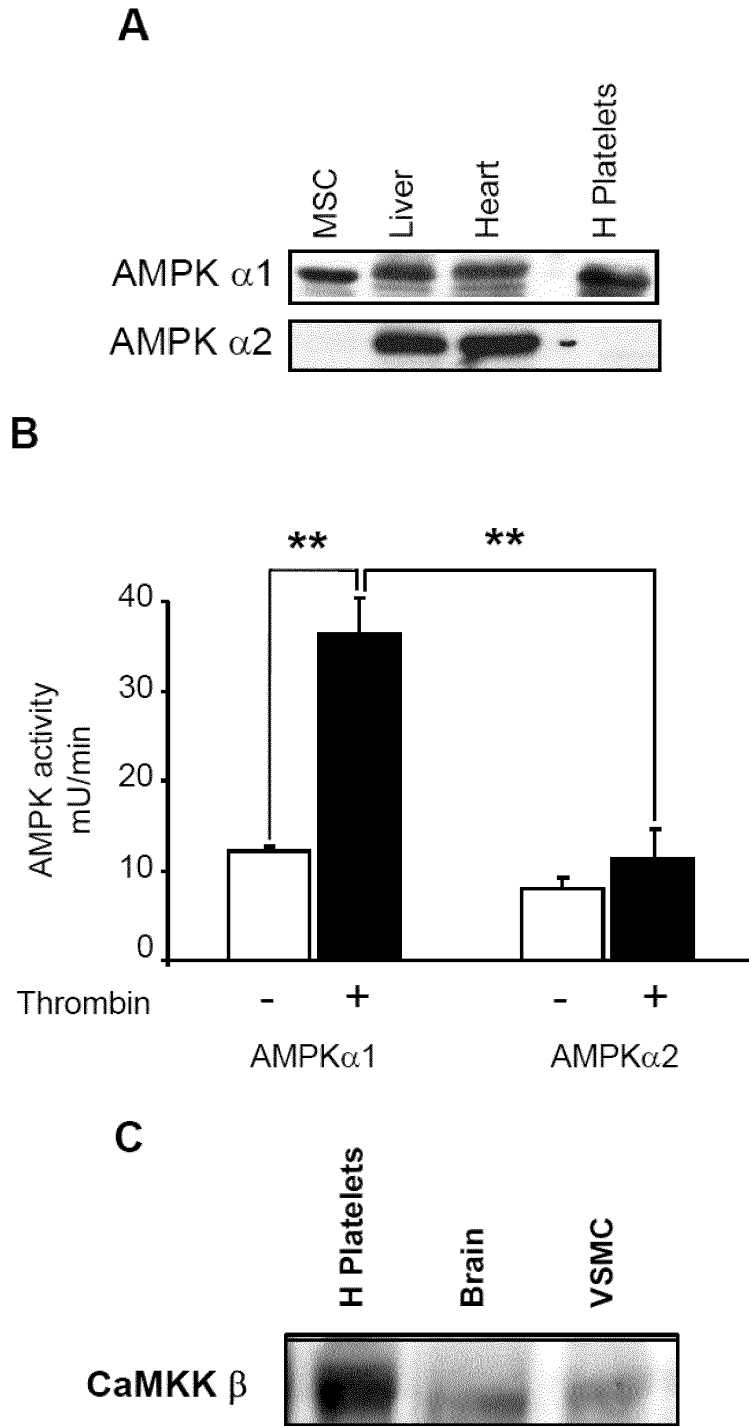


FIG. 1

D

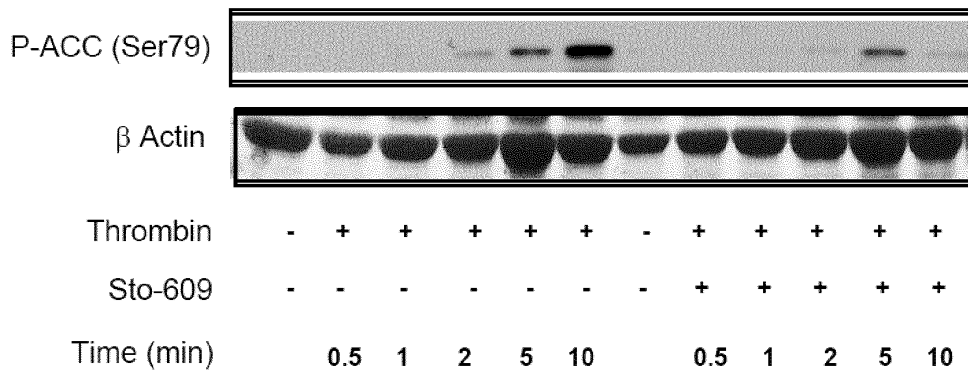
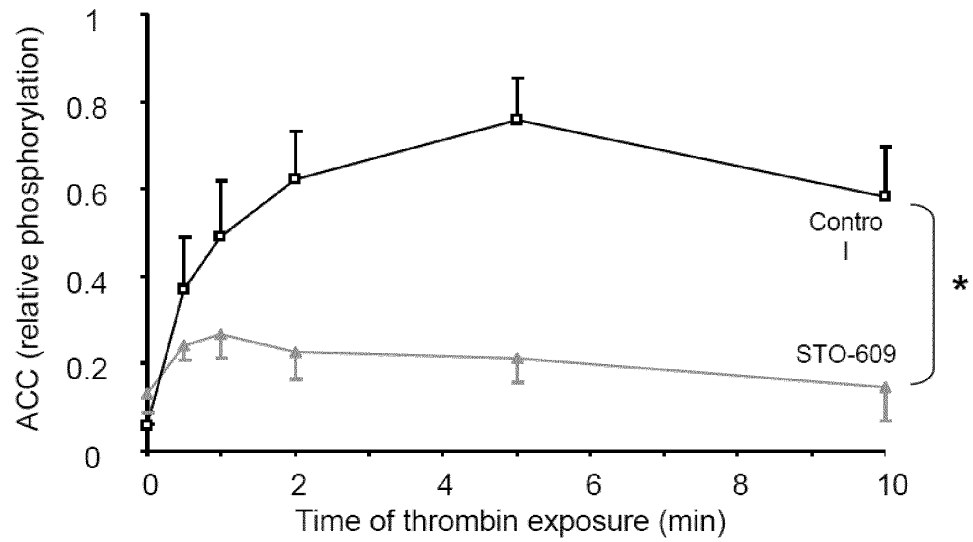


FIG. 2

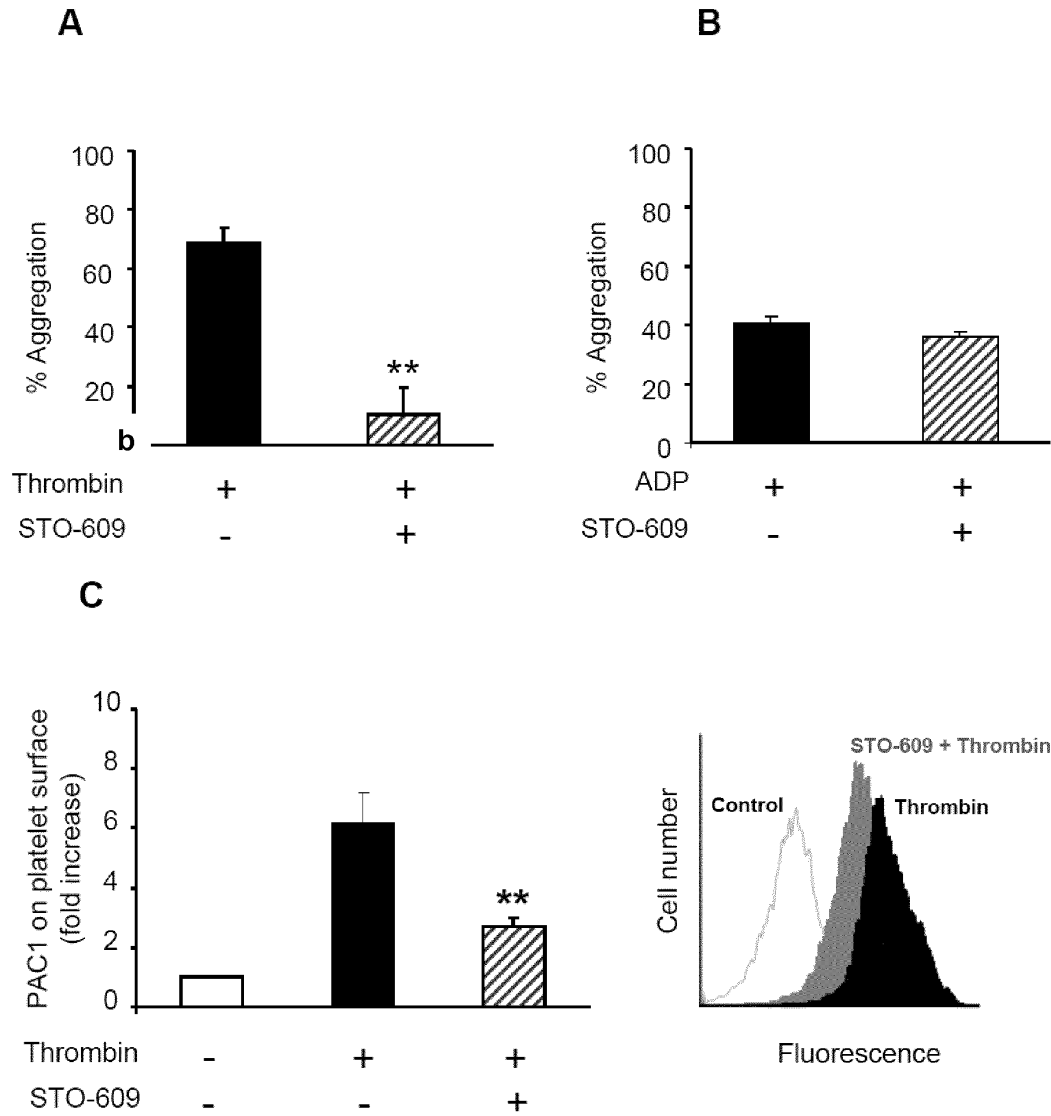


FIG. 2

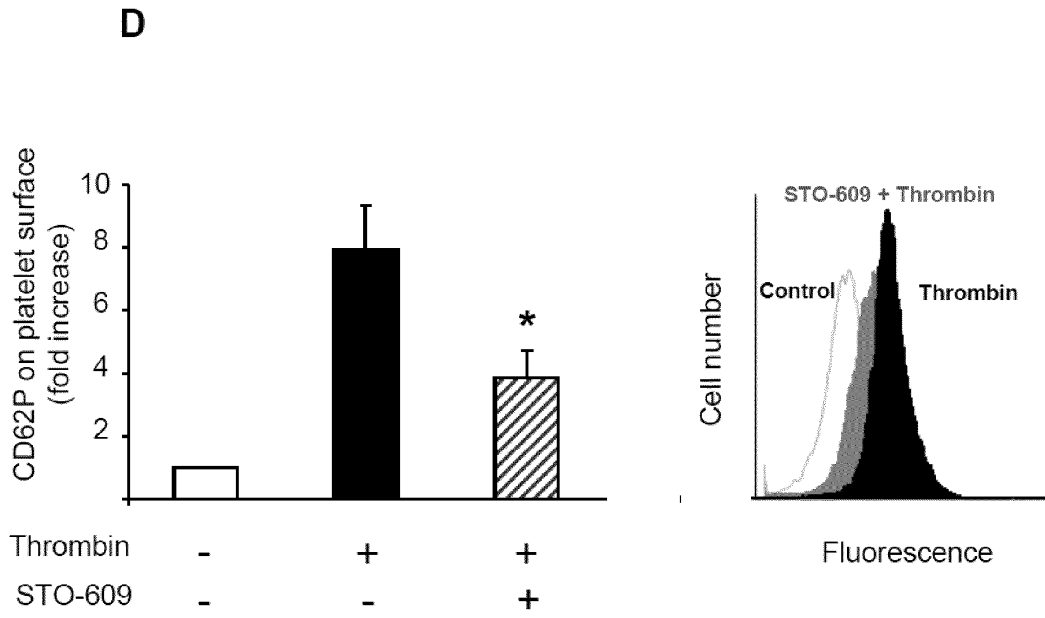


FIG. 3

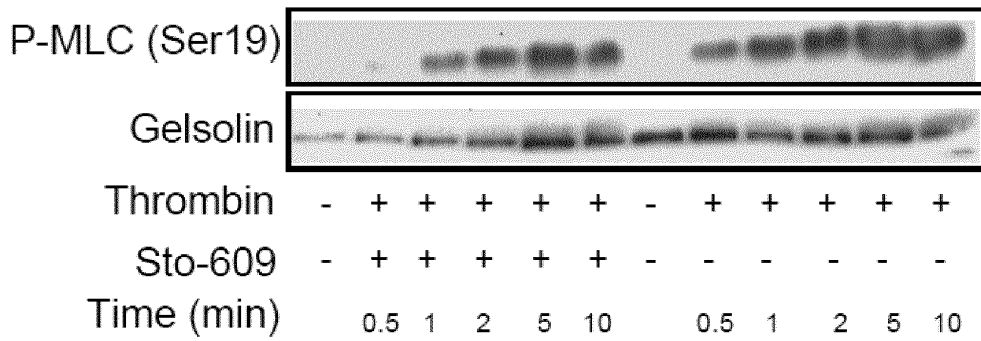
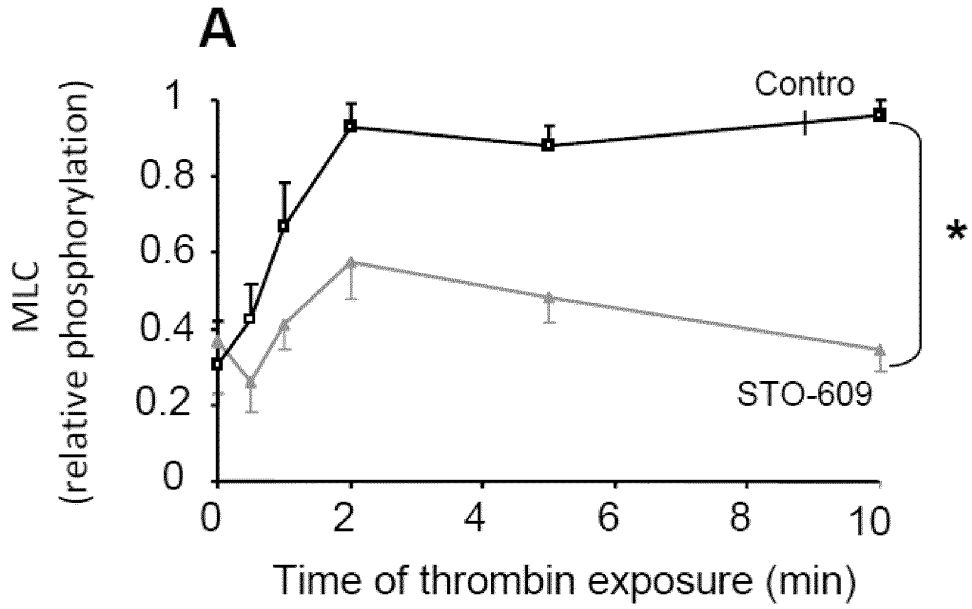


FIG. 3

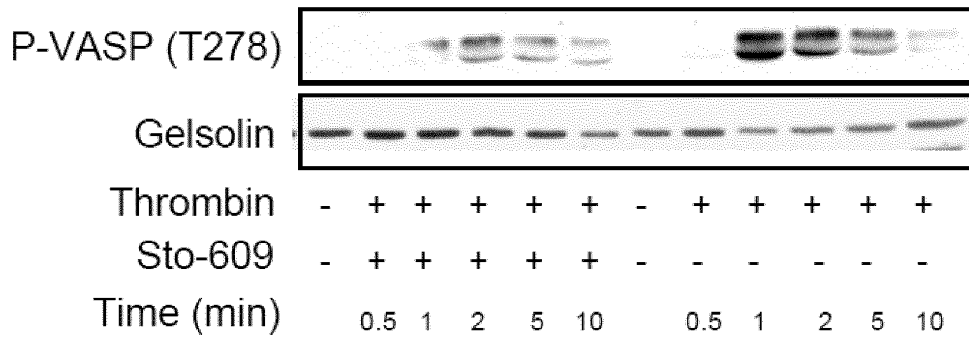
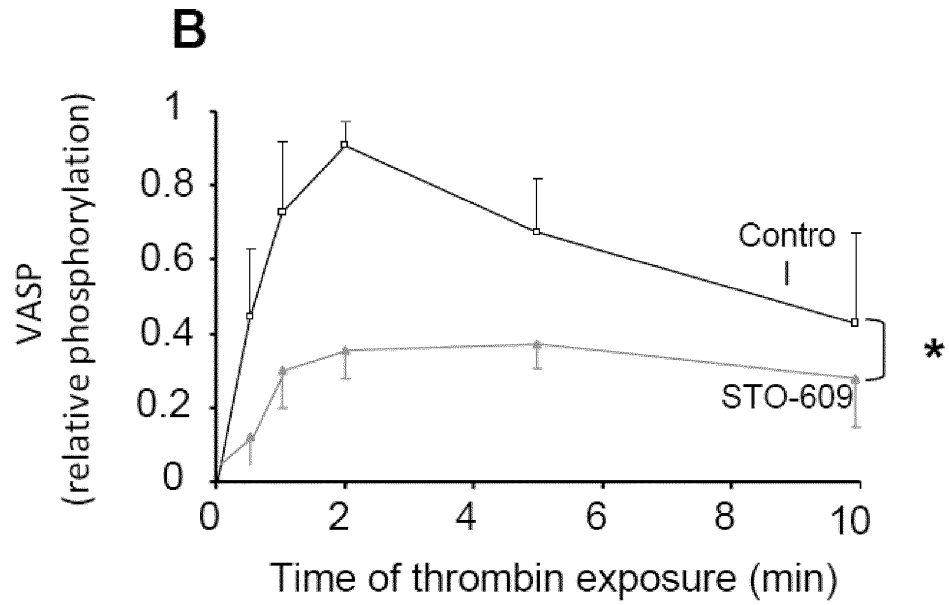
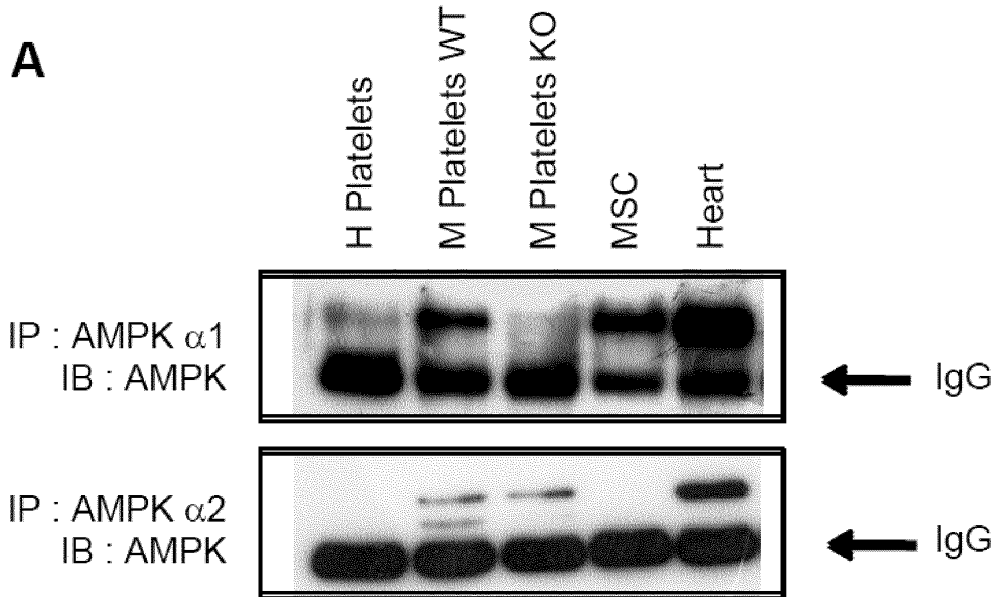


FIG. 4



B

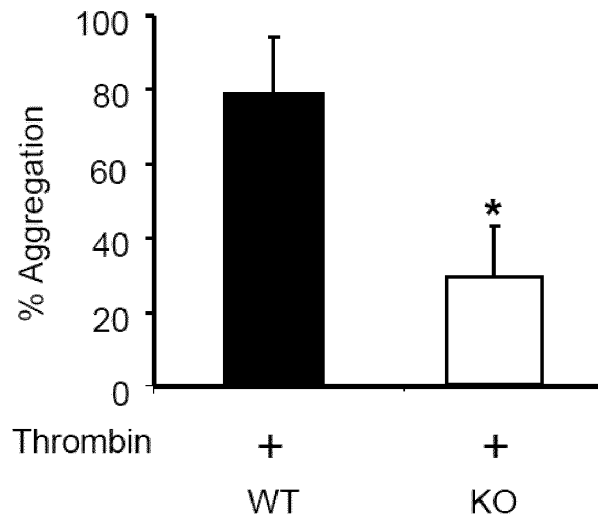


FIG. 5

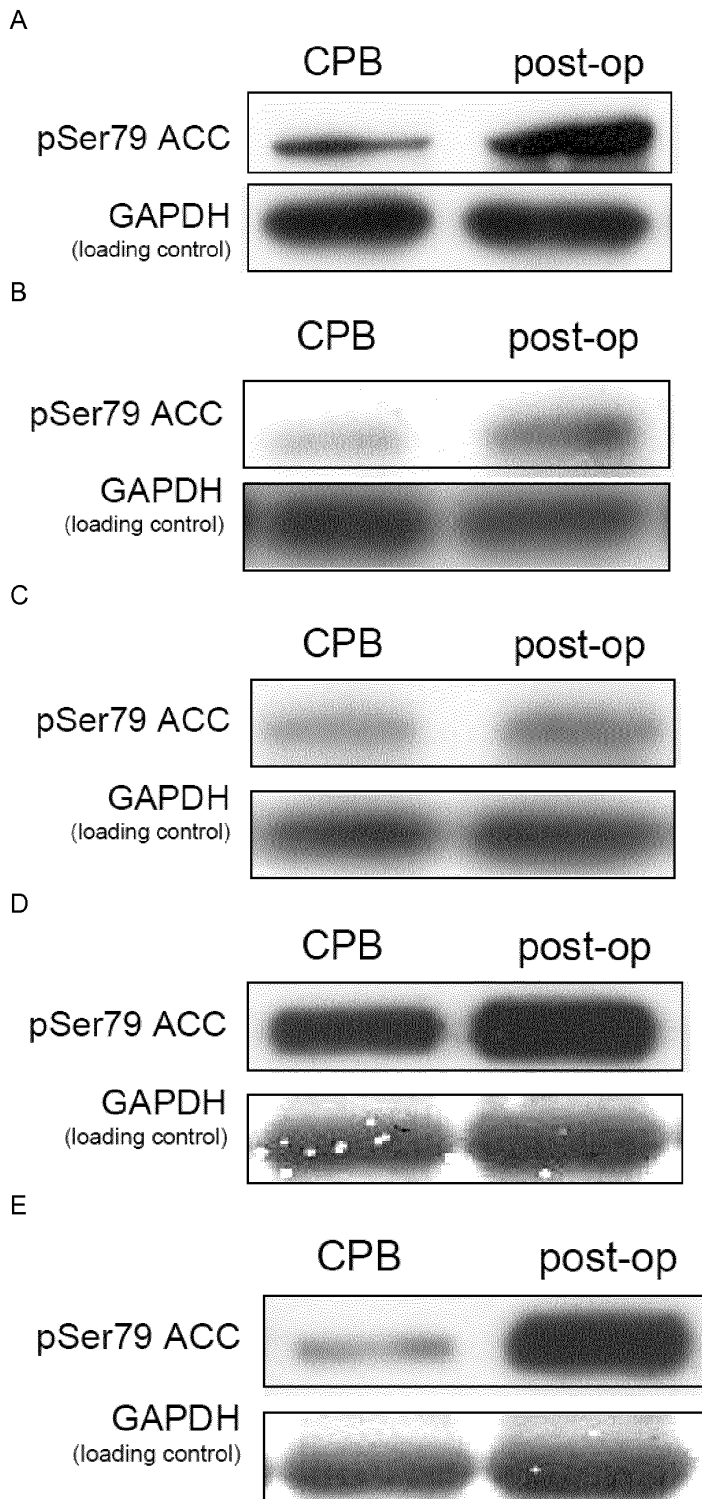
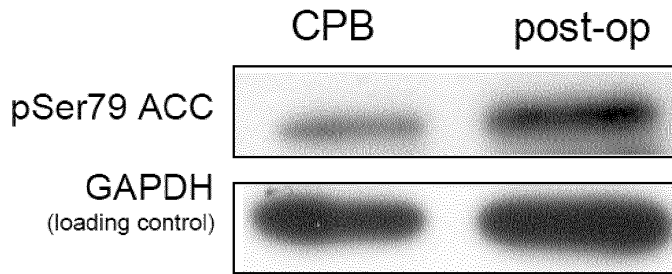
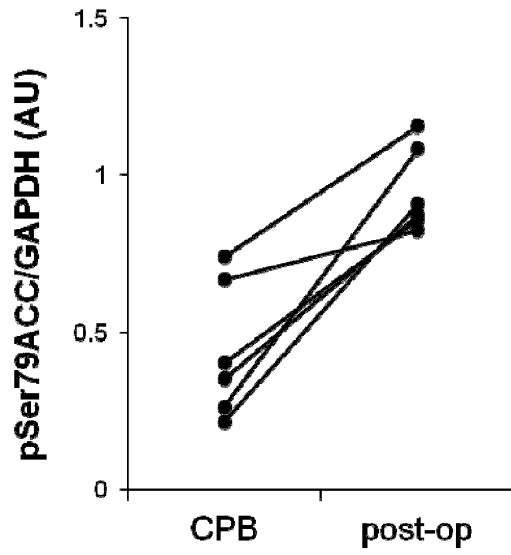


FIG. 5

F



G



H

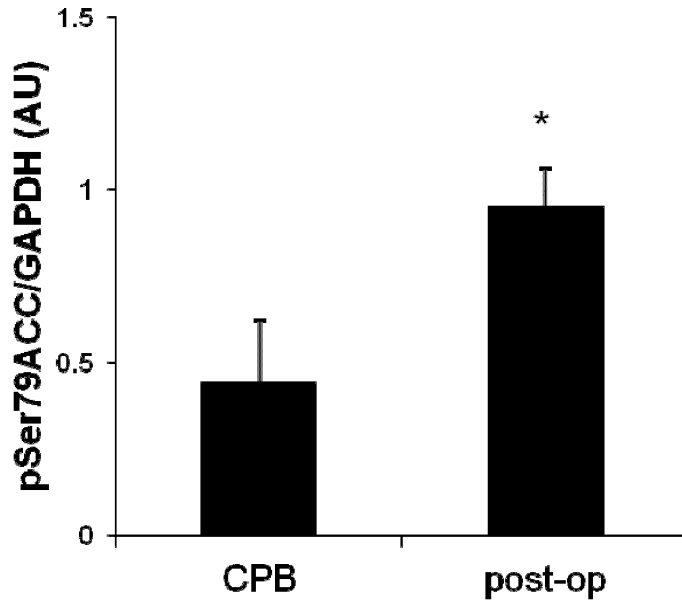


FIG. 5

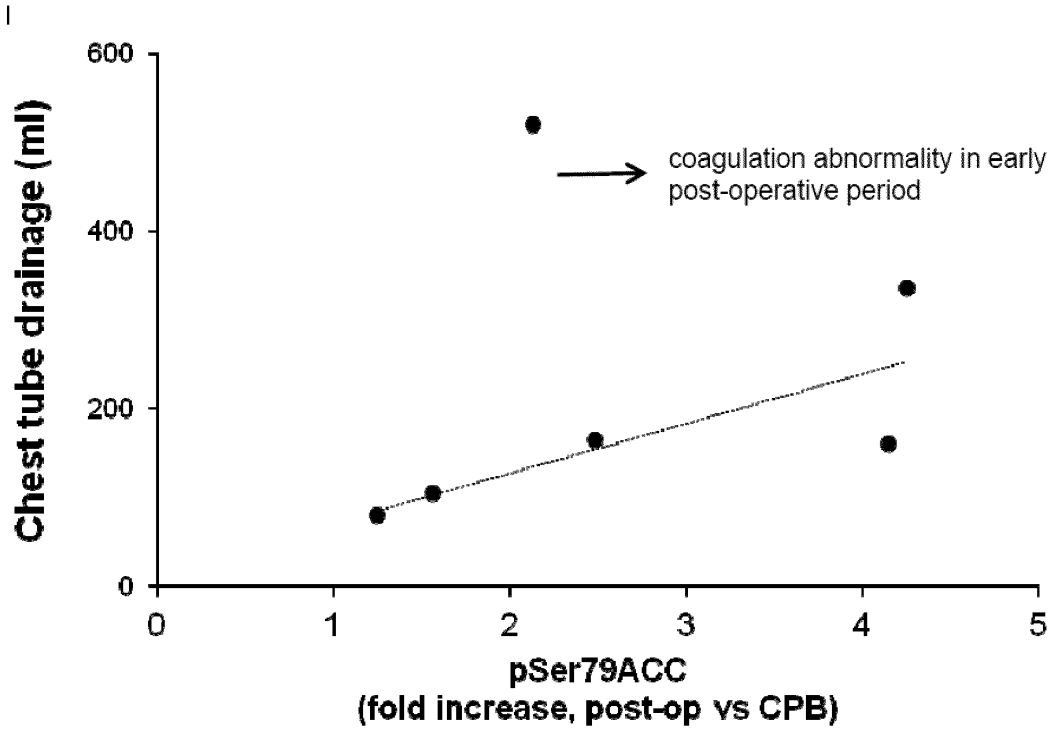


FIG. 6

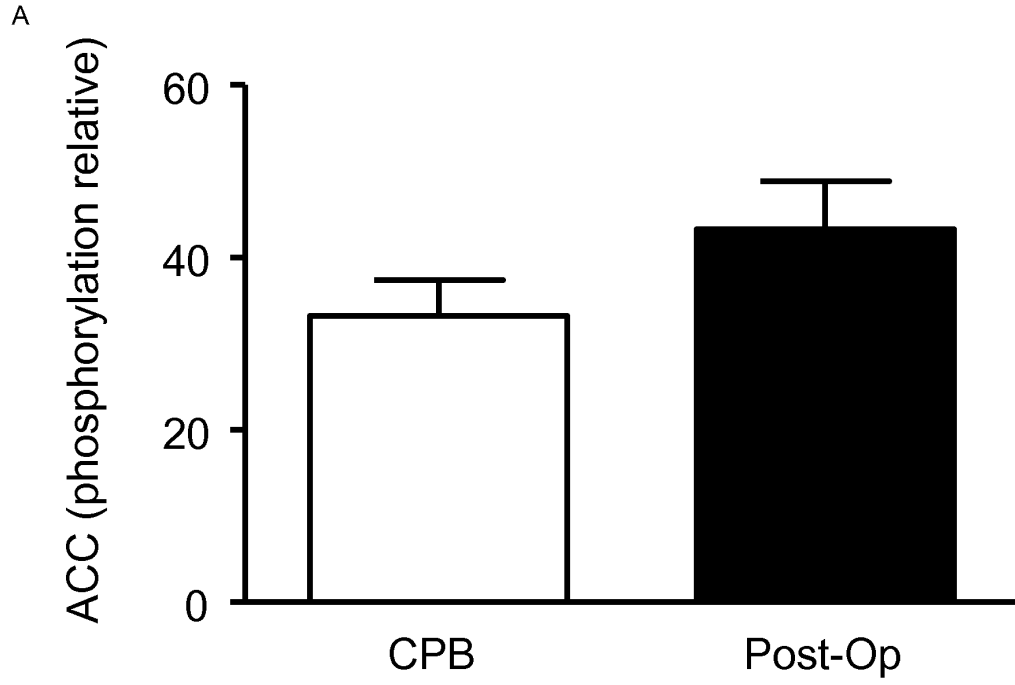


FIG. 6

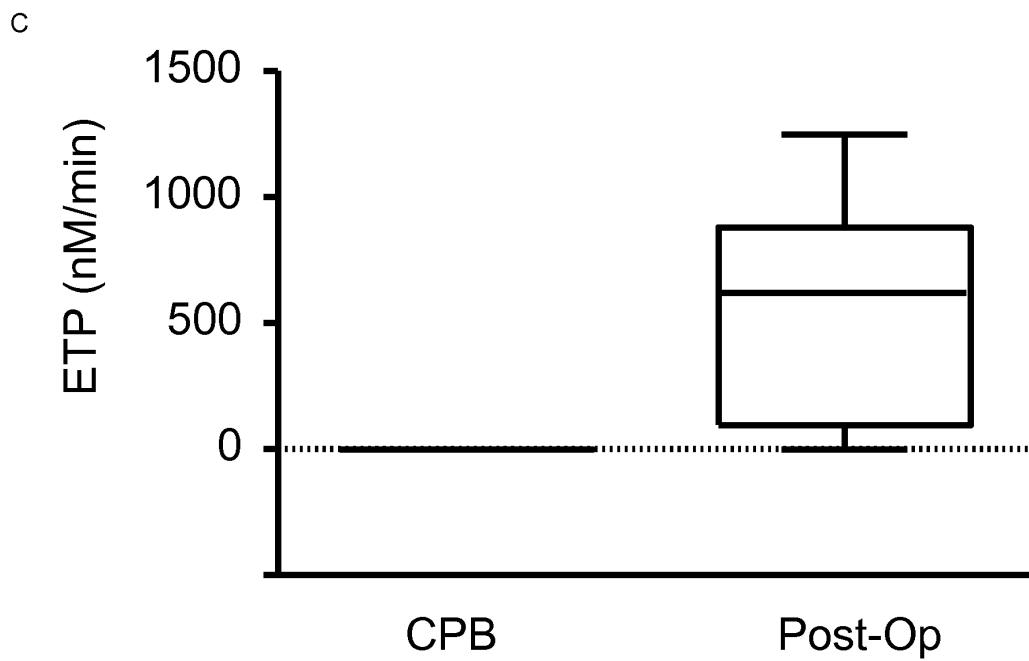
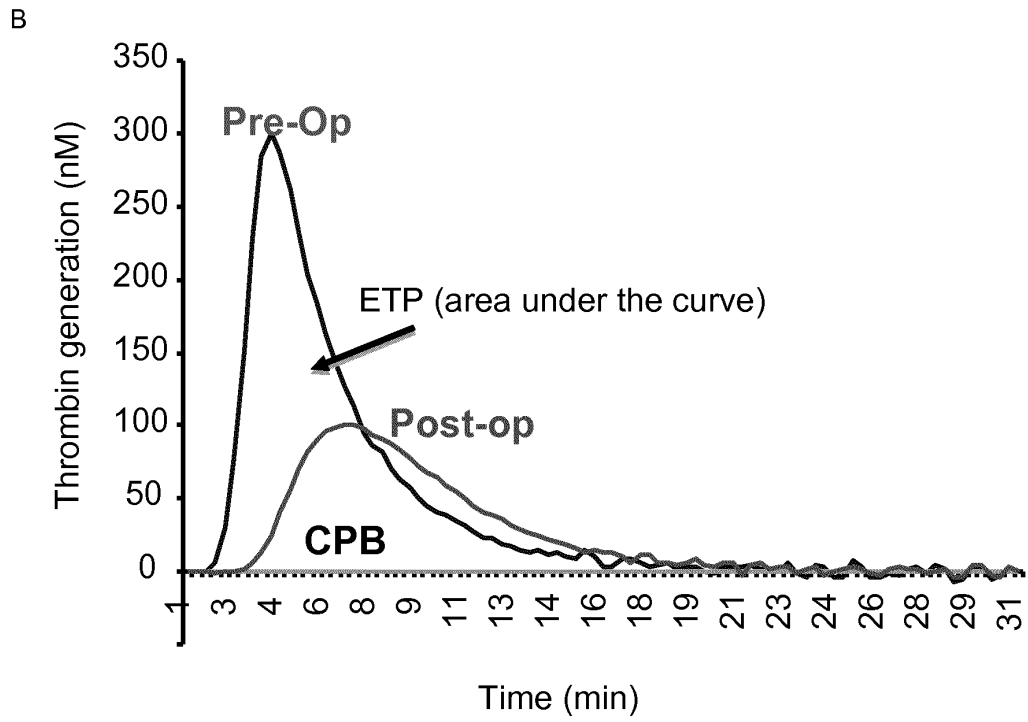
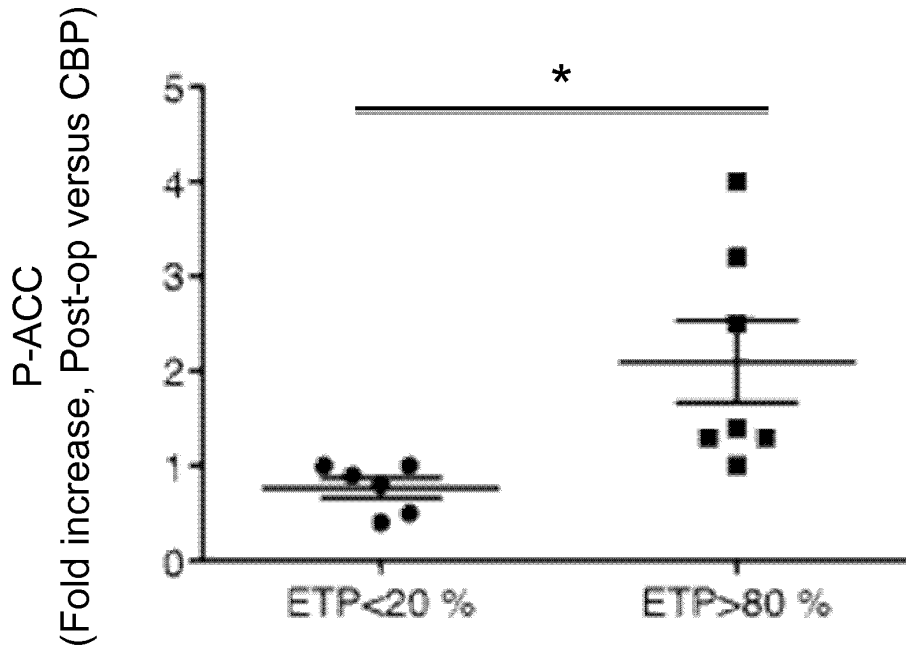


FIG. 6

D



E

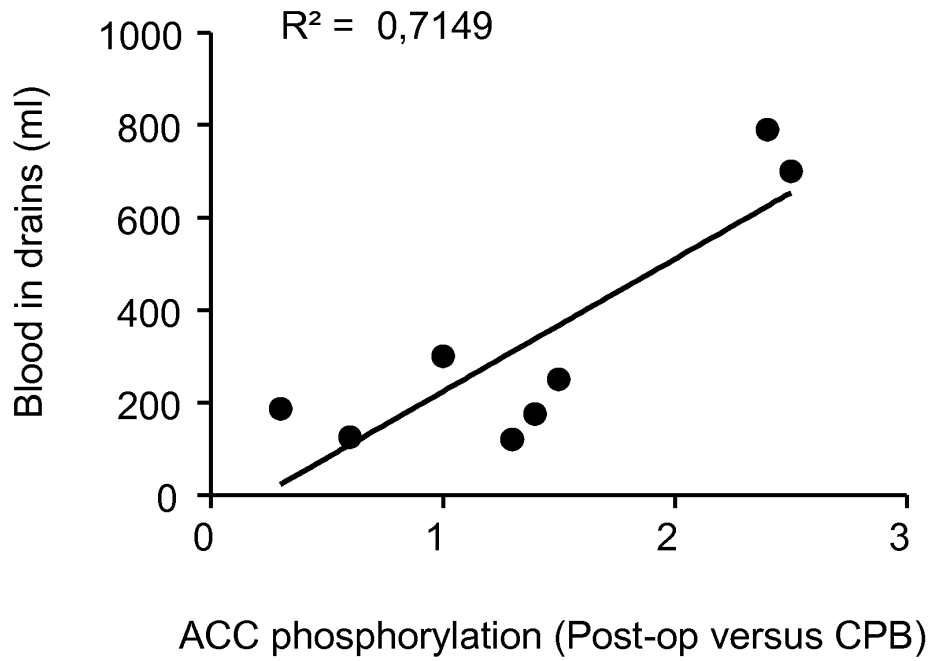
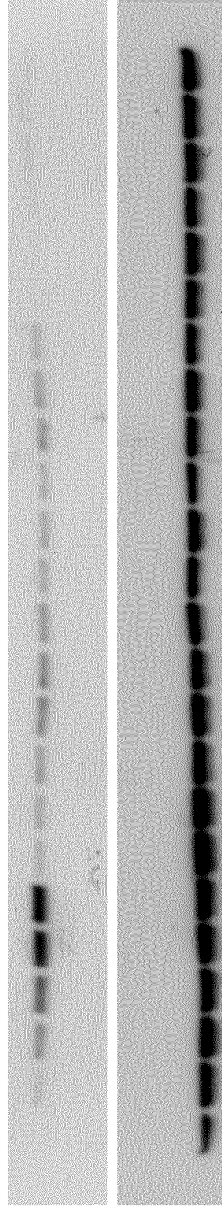


FIG. 7

Thrombin (U/ml)	TxA2 (μM)	Collagen (μg/ml)	ADP (μM)
0	0	0	0
.01	.1	.5	2.5
.03	.3	1	5
.1	1	2.5	10
.3	3	5	25
1	10	10	50

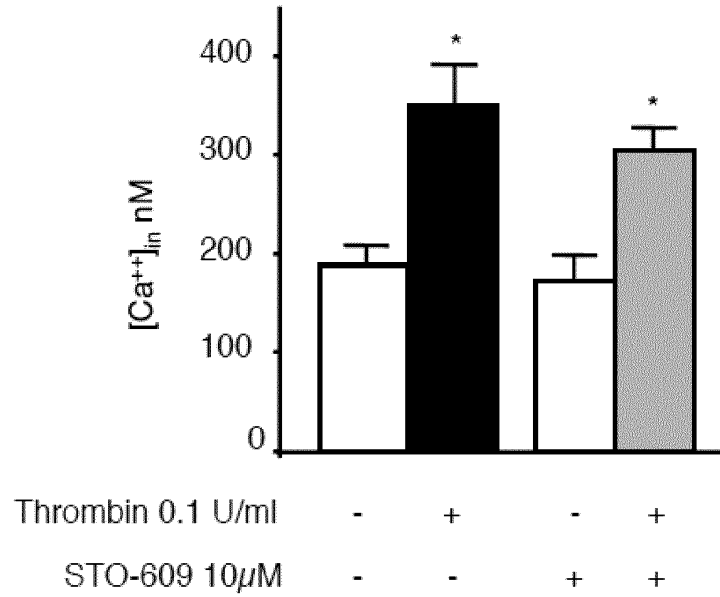


P-ACC (Ser 79)

Gelsolin

FIG. 8

A



B

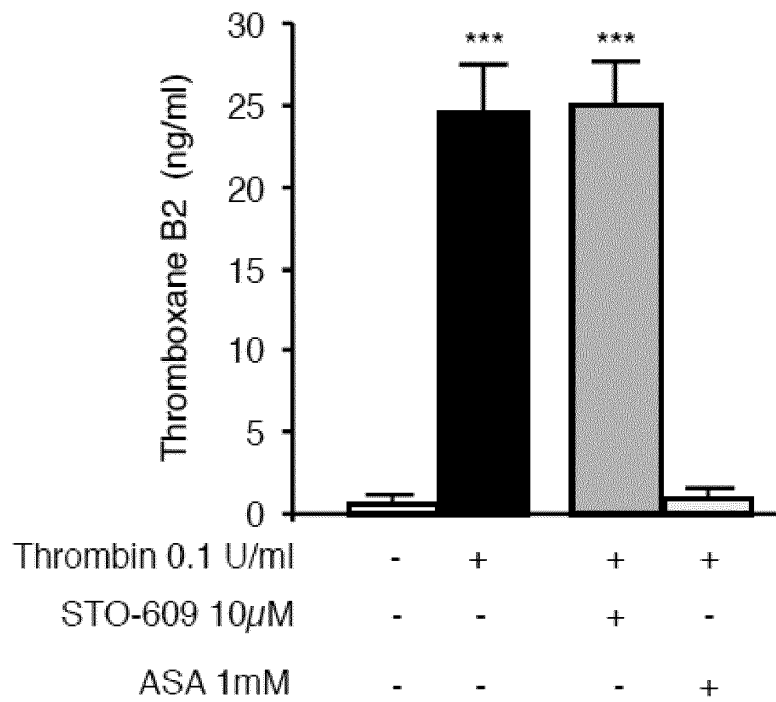


FIG. 9

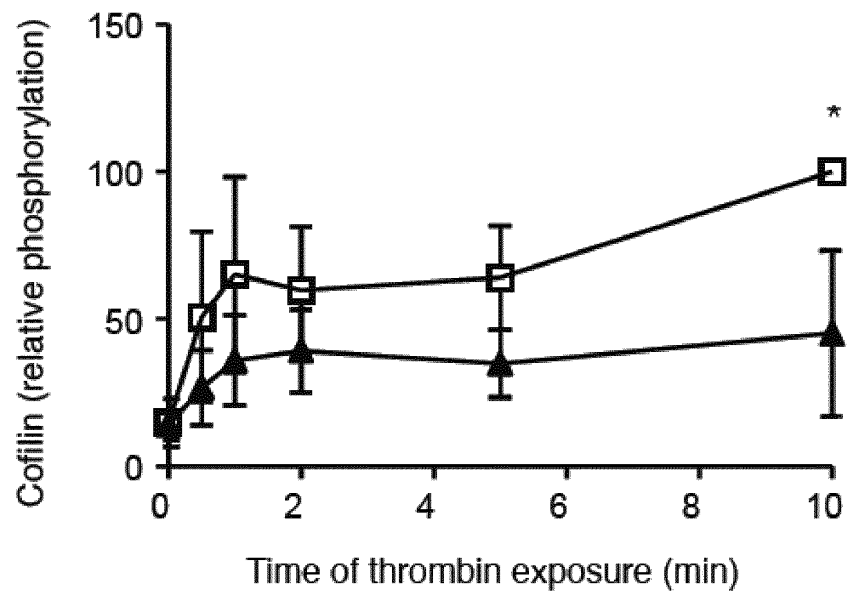
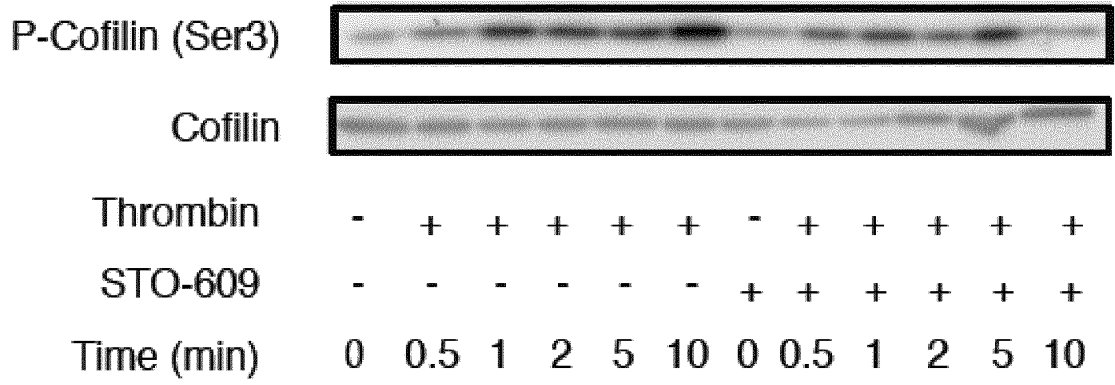
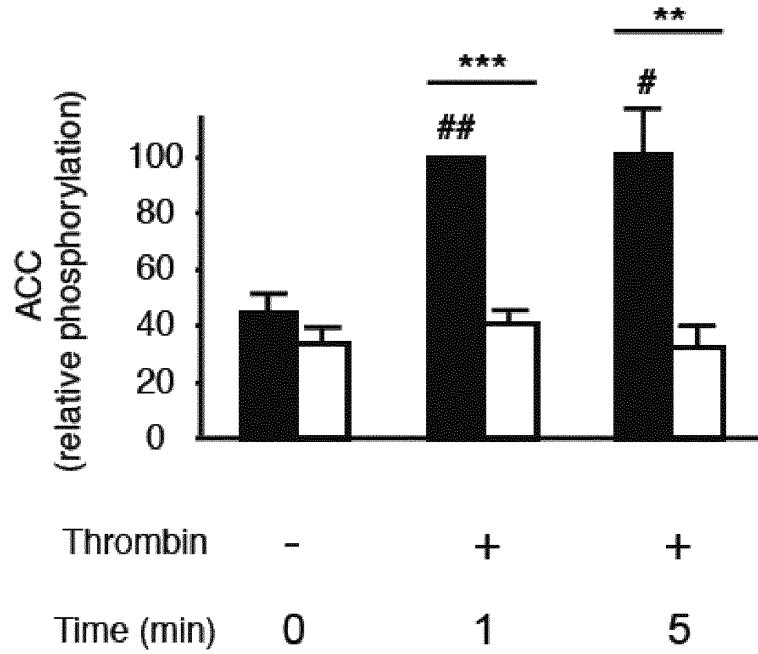


FIG. 10

A



B

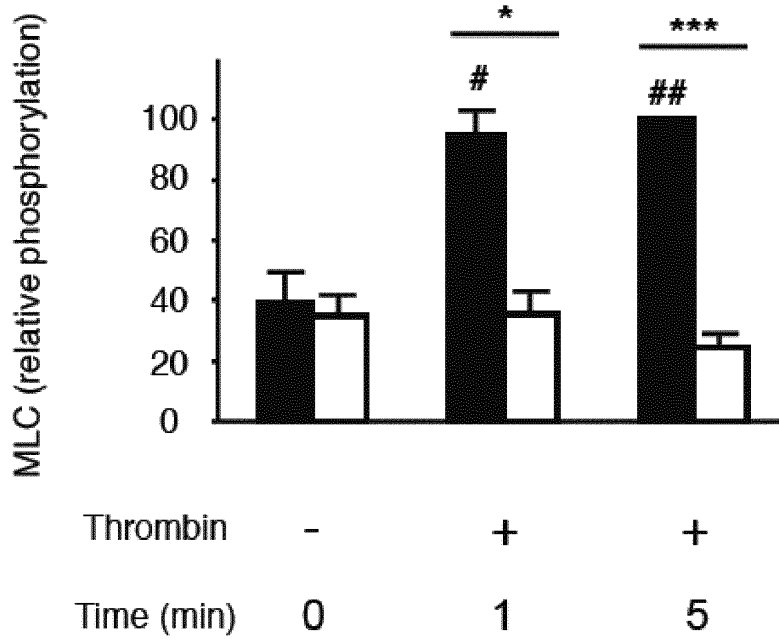
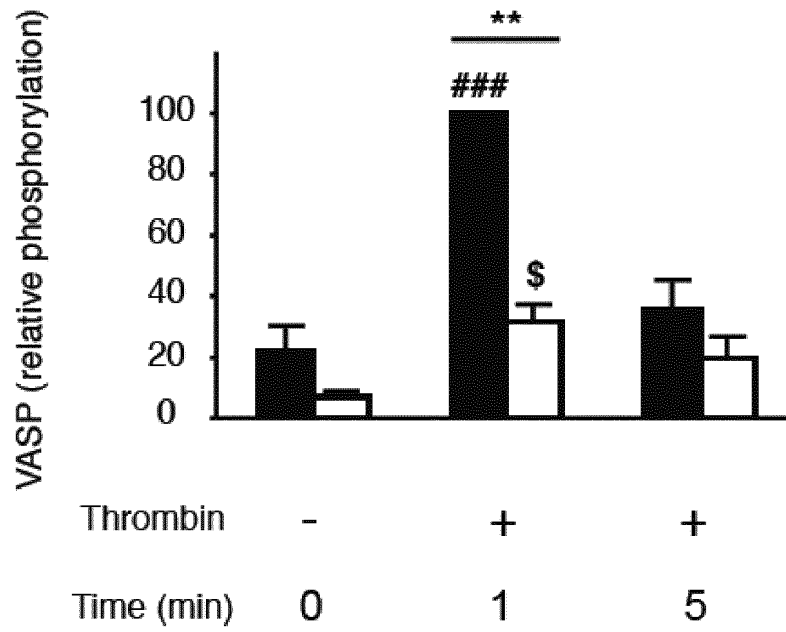
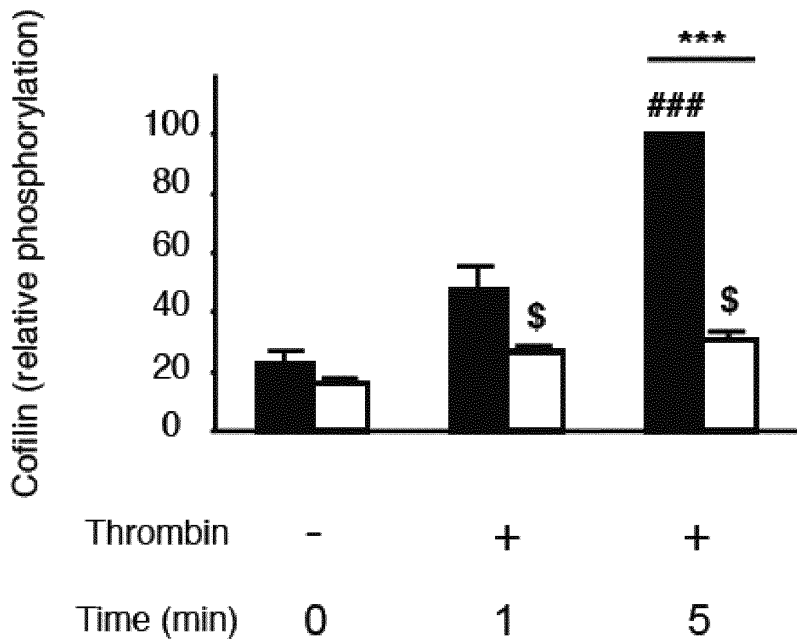


FIG. 10

C



D



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/073263

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/00 G01N33/86 ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAJERUS P W ET AL: "Lipid metabolism in human platelets. I. Evidence for a complete fatty acid synthesizing system.", January 1969 (1969-01), THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION JAN 1969 LNKD-PUBMED:5765018, VOL. 48, NR. 1, PAGE(S) 156 - 164, XP002667582, ISSN: 0021-9738 page 162, right-hand column, paragraph 2 - page 163, left-hand column, paragraph 1 ----- -/--	1-19

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
--	--

* Special categories of cited documents :	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 February 2013	Date of mailing of the international search report 07/03/2013
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Stachowiak, Olaf
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/073263

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FRIEDMAN P A ET AL: "THE APPARENT ABSENCE OF INVOLVEMENT OF BIOTIN IN THE VITAMIN K DEPENDENT CARBOXYLATION OF GLUTAMIC-ACID RESIDUES OF PROTEINS", BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 163, no. 1, 1977, pages 39-44, XP002667583, ISSN: 0264-6021 page 41 - page 42 -----	1-19
A	WO 2008/106630 A1 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; SEETHALA RAMAKRISHNA [US]; GOLLA RAJASRE) 4 September 2008 (2008-09-04) claims 1-11 -----	1-19
A	WO 2010/060081 A1 (BAYER HEALTHCARE LLC [US]; TANG LIANG [US]; APELER HEINER [DE]; RAMSEY) 27 May 2010 (2010-05-27) claims 1-27 -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/073263

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008106630 A1	04-09-2008	NONE	

WO 2010060081 A1	27-05-2010	CA 2744340 A1	27-05-2010
		EP 2368124 A1	28-09-2011
		JP 2012510060 A	26-04-2012
		WO 2010060081 A1	27-05-2010
