



HAL
open science

Etude des mécanismes d'adhérence et d'activation des plaquettes sanguines appliquée à l'identification de nouvelles cibles anti-thrombotiques plus sûres

Mathieu Schaff

► **To cite this version:**

Mathieu Schaff. Etude des mécanismes d'adhérence et d'activation des plaquettes sanguines appliquée à l'identification de nouvelles cibles anti-thrombotiques plus sûres. Hématologie. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ102 . tel-00867777

HAL Id: tel-00867777

<https://theses.hal.science/tel-00867777>

Submitted on 30 Sep 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Hématologie et Physiopathologie Vasculaire

Par

Mathieu SCHAFF

Soutenue le 07 décembre 2012

**Etude des mécanismes d'adhérence et d'activation des plaquettes
sanguines appliquée à l'identification de nouvelles cibles
anti-thrombotiques plus sûres**

Directeur de thèse

Monsieur François LANZA

Docteur, Université de Strasbourg

Rapporteurs externes

Madame Marie-Christine ALESSI

Professeur, Université d'Aix-Marseille II

Monsieur Bernard PAYRASTRE

Professeur, Université de Toulouse III

Rapporteur interne

Monsieur Laurent MONASSIER

Professeur, Université de Strasbourg

Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Hématologie et Physiopathologie Vasculaire

Par

Mathieu SCHAFF

Soutenue le 07 décembre 2012

**Etude des mécanismes d'adhérence et d'activation des plaquettes
sanguines appliquée à l'identification de nouvelles cibles
anti-thrombotiques plus sûres**

Directeur de thèse

Monsieur François LANZA

Docteur, Université de Strasbourg

Rapporteurs externes

Madame Marie-Christine ALESSI

Professeur, Université d'Aix-Marseille II

Monsieur Bernard PAYRASTRE

Professeur, Université de Toulouse III

Rapporteur interne

Monsieur Laurent MONASSIER

Professeur, Université de Strasbourg

INSERM UMR-S 949

« Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines : hémostase, thrombose, transfusion »

Directeur : Professeur Christian GACHET

Etablissement Français du Sang (EFS)-Alsace

10, rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France

Tel.: +33 3 88 21 25 25, Fax: +33 3 88 21 25 21

Directeur de thèse :

Docteur François LANZA

E-mail : francois.lanza@efs-alsace.fr

Co-encadrant :

Docteur Pierre MANGIN

E-mail : pierre.mangin@efs-alsace.fr

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean-Pierre Cazenave de m'avoir permis d'effectuer mon master puis ma thèse au sein de l'Etablissement Français du Sang-Alsace.

Mes remerciements vont également au Professeur Christian Gachet, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a donné les moyens de réaliser ce travail dans un environnement pluridisciplinaire très enrichissant. Merci de m'avoir constamment soutenu en portant un regard pertinent, constructif et pédagogue sur mes résultats.

J'adresse toute ma reconnaissance aux Professeurs Marie-Christine Alessi, Bernard Payraastre et Laurent Monassier qui me font l'honneur de juger ma thèse.

Je remercie tout particulièrement les docteurs François Lanza et Pierre Mangin, qui m'ont intégré si rapidement dans leur équipe et confié ce projet. A leur contact, j'ai appris la rigueur et l'amour du travail bien fait. Leur disponibilité, leur impressionnante culture scientifique et leurs explications ont contribué à faire de ces quatre années une expérience très positive et riche en enseignements. Pierre, merci pour ta confiance, ta patience, ton soutien quotidien et tes encouragements constants. J'ai énormément appris à tes côtés et j'espère vivement que d'autres étudiants pourront bénéficier de ton encadrement de grande qualité. Merci également pour la vision de la recherche que tu m'as enseignée et que je m'efforcerai de conserver.

Cette thèse n'aurait pu aboutir sans Catherine Bourdon et Nicolas Receveur qui ont consacré beaucoup de temps à me transmettre leurs connaissances avec un professionnalisme admirable. Ce travail vous doit beaucoup, vous y avez massivement contribué en faisant preuve d'un intérêt pour le sujet remarquable. Merci pour votre aide, votre patience et votre éternelle bonne humeur !

Un grand merci à mes collègues thésards, Eric, Fabien et Thibault. J'apprécie votre enthousiasme, votre passion de la recherche, votre sens du travail d'équipe et votre perfectionnisme. Merci pour votre humour décalé et votre soutien précieux, ce fut un réel plaisir de partager mon bureau avec vous.

Je voudrais remercier chaleureusement l'ensemble des membres du laboratoire pour leur professionnalisme, leur sympathie et leur bonne humeur. Ces quatre années m'ont énormément apporté tant scientifiquement qu'humainement et je le dois à vous tous. Merci à Dominique pour ses conseils avisés en lavage de plaquettes, à Sylvie, Virginie et Philippe pour leurs explications en biochimie, à Stéphanie et Anne pour leur aide en histochimie, à Anita pour ses explications en microscopie électronique, à Valérie pour sa disponibilité et sa gentillesse constantes et à tous ceux qui m'ont apporté leur aide, Béatrice, Monique, Blandine, Ghina, Marie-Jeanne, Véronique, Simone, Josiane, Patricia, Cécile, Jean-Yves,

Fabienne, et les nombreuses Catherine. Merci au personnel de l'animalerie pour tout le travail abattu, j'ai conscience que sans votre contribution cette thèse n'aurait pu voir le jour.

Merci à Maria pour nos discussions du soir, spéciale dédicace à vous !

Merci enfin à ma famille, à mes parents, à ma sœur Delphine, à mon frère Nicolas, à mes oncles Hubert et Eric et à mes grands-parents pour leur amour, leur soutien, leur écoute et leur indulgence. Merci de m'avoir supporté dans mes mauvais moments, particulièrement ces derniers mois d'écriture qui ne furent pas les plus faciles...

RESUME

Etude des mécanismes d'adhérence et d'activation des plaquettes sanguines appliquée à l'identification de nouvelles cibles anti-thrombotiques plus sûres

L'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes sanguines sont essentielles à l'hémostase mais peuvent également conduire à la thrombose artérielle sur plaque d'athérosclérose, aujourd'hui première cause de mortalité dans le monde. Les anti-thrombotiques actuels, dirigés contre l'activation et l'agrégation plaquettaires, ont une efficacité reconnue mais ont pour inconvénient d'augmenter le risque de saignement. L'objectif de cette thèse a été d'explorer de nouvelles stratégies réduisant la thrombose tout en préservant l'hémostase. L'utilisation de souris modifiées génétiquement a mis en évidence que l'intégrine $\alpha_6\beta_1$, impliquée dans l'adhérence des plaquettes aux laminines, joue un rôle critique en thrombose expérimentale mais pas en hémostase. De plus, nous avons montré dans un système de perfusion de sang qu'une protéine préférentiellement exprimée dans les plaques d'athérosclérose, la ténascine-C, permet l'adhérence et l'activation des plaquettes. En revanche, la β -arrestine-1, une protéine de signalisation, ne contribue que modestement aux fonctions plaquettaires et à la thrombose. En conclusion, ce travail a permis de dégager deux nouvelles pistes anti-thrombotiques potentiellement capables de préserver l'hémostase, basées sur le ciblage de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ ou de l'interaction plaquette/ténascine-C.

Mots clés : plaquettes, hémostase, thrombose artérielle, intégrine $\alpha_6\beta_1$, ténascine-C, β -arrestine

RESUME EN ANGLAIS

Study of blood platelet adhesion and activation mechanisms to identify safer antithrombotic targets

Following vascular injury, blood platelet adhesion, activation and aggregation are essential for hemostasis but can also lead to arterial thrombosis, which is a leading cause of death worldwide. Current antithrombotic drugs impede platelet activation and aggregation, thereby considerably reducing cardiovascular mortality, but their use is linked to an increased bleeding risk. This thesis aimed to explore more selective strategies causing minimal perturbation of hemostasis. The use of genetically-modified mice has revealed an unsuspected important contribution of integrin $\alpha_6\beta_1$, which mediates platelet adhesion and activation to laminins, to experimental arterial thrombosis but not hemostasis. In addition, we showed that tenascin-C, an extracellular matrix protein overexpressed in atherosclerotic plaques, can support platelet adhesion and activation under flow. In contrast, the signaling protein β -arrestin-1 does not play a major role in platelet function, hemostasis and thrombosis. In conclusion, this work provides two interesting candidates, namely integrin $\alpha_6\beta_1$ and tenascin-C, to put into practice the concept of targeting thrombosis while minimally impairing hemostasis.

Keywords: platelets, hemostasis, arterial thrombosis, integrin $\alpha_6\beta_1$, tenascin-C, β -arrestin

TABLE DES MATIERES

RESUME	5
RESUME EN ANGLAIS	6
TABLE DES MATIERES.....	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION GENERALE.....	19
But de la thèse et principaux résultats	24
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	31
1. Généralités sur la plaquette sanguine	33
2. Les récepteurs d'adhérence et d'activation des plaquettes.....	36
2.1. Principaux récepteurs des protéines adhésives	38
2.1.1. Le complexe GPIb-V-IX.....	38
2.1.2. La GPVI	40
2.1.3. Les intégrines	44
2.1.3.1. Généralités	44
2.1.3.2. Mécanismes d'activation des intégrines plaquettaires.....	44
2.1.3.3. Les intégrines β_3	47
a) $\alpha_{IIb}\beta_3$	47
b) $\alpha_V\beta_3$	50
2.1.3.4. Les intégrines β_1	50
a) $\alpha_2\beta_1$	50

b) $\alpha_5\beta_1$	51
c) $\alpha_6\beta_1$	52
2.2. Principaux récepteurs des activateurs solubles.....	53
2.2.1. Les récepteurs des nucléotides adényliques	53
2.2.1.1. Le récepteur P2Y ₁	53
2.2.1.2. Le récepteur P2Y ₁₂	53
2.2.1.3. Le récepteur P2X ₁	55
2.2.2. Les récepteurs des prostanoïdes	56
2.2.3. Les récepteurs de la thrombine.....	59
2.3. Régulation des récepteurs par désensibilisation	63
2.3.1. La désensibilisation	63
2.3.2. Les arrestines.....	64
3. Structure, organisation, composition et réactivité hémostatique de l'artère saine	67
3.1. Structure d'une artère.....	67
3.2. Organisation du système artériel.....	68
3.3. Composition de l'artère saine	69
3.3.1. La cellule endothéliale.....	69
3.3.1.1. Généralités	69
3.3.1.2. Propriétés anti-thrombotiques de l'endothélium quiescent	70
3.3.1.3. Propriétés pro-thrombotiques de l'endothélium activé	72
3.3.2. Les CML et les fibroblastes.....	73
3.3.3. La MEC	74
3.3.3.1. La membrane basale	74
3.3.3.2. Les collagènes.....	76
3.3.3.3. Les fibres élastiques.....	78
3.3.3.4. Les glycoprotéines	80
a) Le FW	80
b) Les laminines	82
c) Les TSP.....	86

d) Les fibronectines.....	88
e) Le fibrinogène.....	90
f) La vitronectine.....	91
3.3.3.5. Les protéoglycanes	93
4. Flux sanguin et fonctions plaquettaires	95
5. La thrombose artérielle	101
5.1. L'athérosclérose	101
5.1.1. Physiopathologie	101
5.1.2. Impact de l'athérosclérose sur la rhéologie sanguine.....	103
5.1.3. Impact de l'athérosclérose sur la composition de la paroi artérielle	103
5.1.4. La TN-C, une glycoprotéine de la MEC surexprimée dans les plaques d'athérosclérose.....	104
5.1.5. Les complications de l'athérosclérose.....	106
5.2. Traitement et prévention de la thrombose artérielle.....	109
5.2.1. Les interventions chirurgicales.....	109
5.2.2. Les antiplaquettaires.....	111
5.2.2.1. Les inhibiteurs des COX.....	111
5.2.2.2. Les antagonistes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	112
5.2.2.3. Les antagonistes du récepteur P2Y ₁₂	113
5.2.2.4. Les inhibiteurs des PDE	114
5.2.3. Considérations socio-économiques et industrielles.....	115
5.2.3.1. Impact socio-économique des antiplaquettaires	115
5.2.3.2. La recherche médicamenteuse face aux mutations de l'industrie pharmaceutique.....	115
5.2.4. Un besoin non couvert en antiplaquettaires plus efficaces et mieux tolérés ..	116
5.2.4.1. Le bénéfice limité des médicaments actuels.....	117
5.2.4.2. Le risque hémorragique iatrogène	117
5.3. Nouvelles approches antiplaquettaires	118
5.3.1. Les antagonistes des récepteurs TP	119
5.3.2. Les antagonistes du récepteur PAR-1	120

5.3.3.	L'inhibition de l'interaction GPVI/collagènes	121
5.3.4.	L'inhibition de l'axe GPIb α /FW	121
5.3.5.	Les inhibiteurs de la PI3K p110 β	122
RESULTATS EXPERIMENTAUX		125
Rôle de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ en hémostasie et thrombose		127
Rôle de la TN-C dans l'adhérence et l'activation plaquettaire.....		183
Rôle des β-arrestines dans l'activation plaquettaire, en hémostasie et en thrombose.....		205
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		225
ANNEXE.....		233
BIBLIOGRAPHIE		243

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Rôle des plaquettes dans l'hémostase	20
Figure 2 : La cascade de la coagulation.....	22
Figure 3 : Ultrastructure de la plaquette	32
Figure 4 : Changements morphologiques des plaquettes au cours de leur activation	35
Figure 5 : Principales voies d'activation et d'inhibition des plaquettes.....	37
Figure 6 : Structure et partenaires du complexe GPIb-V-IX	39
Figure 7 : Signalisation déclenchée par la GPVI.....	41
Figure 8 : Modèle d'activation des intégrines.....	45
Figure 9 : Signalisation déclenchée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	49
Figure 10 : Signalisation déclenchée par les récepteurs P2	54
Figure 11 : Principales étapes de la biosynthèse des prostanoides dans les plaquettes ...	57
Figure 12 : Signalisation déclenchée par les récepteurs TP	58
Figure 13 : Modèle d'activation des récepteurs PAR	59
Figure 14 : Principales étapes de la désensibilisation des RCPG	62
Figure 15 : Structure des β -arrestines.....	64
Figure 16 : Structure d'une artère saine	66
Figure 17 : Propriétés anti- et pro-thrombotiques de l'endothélium	71
Figure 18 : Structure de la membrane basale.....	75
Figure 19 : Principales étapes de la biosynthèse des collagènes fibrillaires à striation ...	77

Figure 20 : Aspect des fibres élastiques artérielles au microscope	79
Figure 21 : Structure du FW	81
Figure 22 : Structure des laminines	83
Figure 23 : Structure des TSP	87
Figure 24 : Structure des fibronectines	89
Figure 25 : Structure du fibrinogène	91
Figure 26 : Structure de la vitronectine	92
Figure 27 : Caractéristiques d'un fluide newtonien.....	94
Figure 28 : Schématisation du dispositif de perfusion de sang	99
Figure 29 : Localisations préférentielles des plaques d'athérosclérose.....	100
Figure 30 : Principales étapes du développement de l'athérosclérose	102
Figure 31 : Profils de vitesse du flux sanguin au niveau d'une sténose.....	102
Figure 32 : Structure de la TN-C	105
Figure 33 : Principales causes de décès dans le monde en 2008.....	107
Figure 34 : Principales techniques de revascularisation chirurgicale.....	108
Figure 35 : Mécanisme d'action des antiplaquettaires actuels	110
Figure 36 : Mécanisme d'action des antiplaquettaires en développement	119
Figure 37 : Modèle putatif de l'adhérence des plaquettes sur TN-C et laminine.....	228

TABLEAUX

Tableau 1 : Contenu des granules plaquettaires	34
Tableau 2 : Nomenclature des 18 isoformes de laminine.....	85
Tableau 3 : Taux et contrainte de cisaillement à la paroi de différents vaisseaux.....	97

ABBREVIATIONS

AA	Acide arachidonique
AC	Adénylate cyclase
ADAMTS13	<i>A disintegrin and metalloproteinase with TSP type 1 repeat-13</i>
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
AMPC	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
AP-2	<i>Clathrin adaptor protein-2</i>
ApoE	Apolipoprotéine E
AT	Antithrombine
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
β -arr1	β -arrestine-1
β -arr2	β -arrestine-2
BMP-4	<i>Bone morphogenic protein-4</i>
CalDAG-GEFI	<i>Ca²⁺- and DAG-regulated GEF I</i>
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CCN	CYR61/CTGF/NOV
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CK	<i>Cysteine knot</i>
CML	Cellule musculaire lisse
COX	Cyclo-oxygénase
CRP	<i>Collagen-related peptide</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
CYP	Cytochrome P450
CYR61	<i>Cysteine-rich 61</i>
DAG	Diacylglycérol
DIC	<i>Differential interference contrast microscopy</i>

Dok2	<i>Docking protein 2</i>
Dyn	Dynamine
ED	<i>Extra domain</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Fab	<i>Antigen-binding fragment</i>
FACIT	<i>Fibril-associated collagens with interrupted triple helices</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
Fc	<i>Crystallizable fragment</i>
FN-III	Motif analogue au module de type III de la fibronectine
FT	Facteur tissulaire
FW	Facteur Willebrand
Gads	<i>Grb2 adaptor downstream of Shc</i>
GAG	Glycosaminoglycane
GCs	Guanylate cyclase soluble
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GMPc	Guanosine 3',5'-monophosphate cyclique
GP	Glycoprotéine
GPL	Glycérophospholipides
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
γ RFc	Chaîne γ des récepteurs Fc
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
HCII	Héparin cofactor II
HDL	<i>High density lipoproteins</i>
hscFv	<i>Humanized single-chain variable fragment</i>
IAS	<i>International atherosclerosis society</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IgG	Immunoglobuline G
INSEE	Institut national de la statistique et des études économiques
IP	<i>Prostacyclin receptor</i>
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate

8-iso-PGF2 α	8-iso-prostaglandine F _{2α}
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activatory motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
kDa	Kilodalton
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
LDL	<i>Low density lipoproteins</i>
LEE	Limitante élastique externe
LEI	Limitante élastique interne
LN	Laminine
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MLC	<i>Myosin light chain</i>
MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Monoxyde d'azote
NOV	<i>Nephroblastoma overexpressed</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAF	<i>Platelet-activating factor</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAR	<i>Protease-activated receptor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDE	Phosphodiesterase des nucléotides cycliques
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDK	<i>Phosphoinositide-dependent kinase</i>
PECAM-1	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PF4	<i>Platelet factor 4</i>
PGG ₂	Prostaglandine G ₂
PGH ₂	Prostaglandine H ₂
PGI ₂	Prostacycline
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PMCA	<i>Plasma membrane Ca²⁺ ATPase</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
PSGL-1	<i>P-selectin GP ligand-1</i>
PTT	Purpura thrombotique thrombopénique
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques
RIP ₃	Récepteurs de l'IP ₃
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
SCO	Système canaliculaire ouvert
Shc	<i>Src homology domain-containing protein</i>
SLP-76	<i>Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
STD	Système tubulaire dense
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
TM	Thrombomoduline
TN-C	Ténascine-C
TP	<i>Thromboxane/prostaglandin receptor</i>
t-PA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
TS	Thromboxane synthétase
TSP	Thrombospondine
TxA ₂	Thromboxane A ₂
u-PA	<i>Urokinase plasminogen activator</i>
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WNT	<i>Wingless type</i>

INTRODUCTION GENERALE

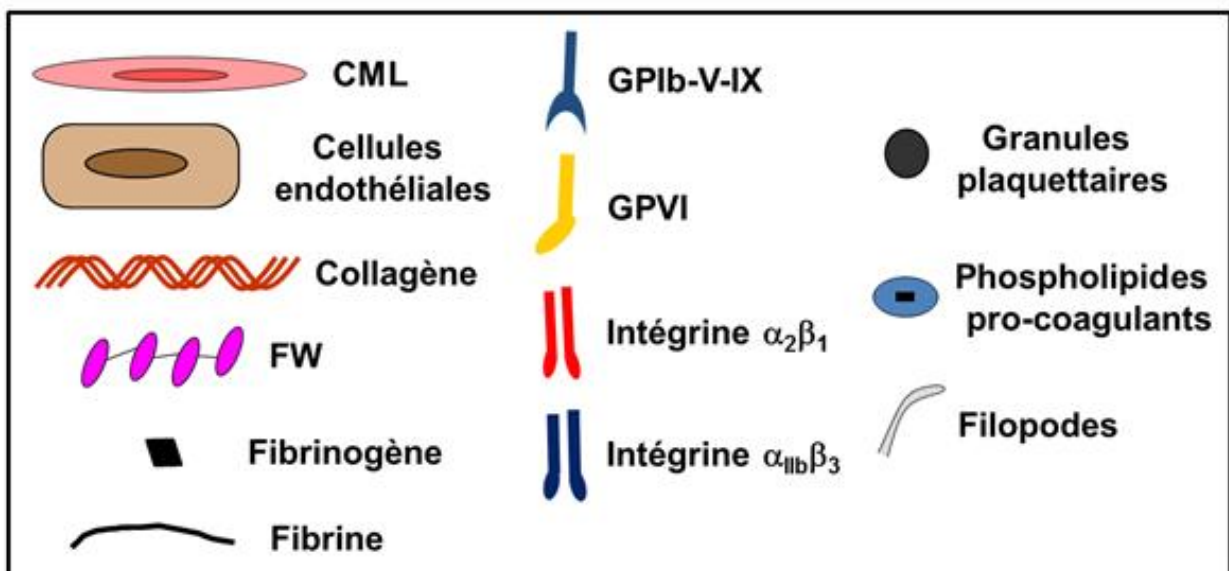
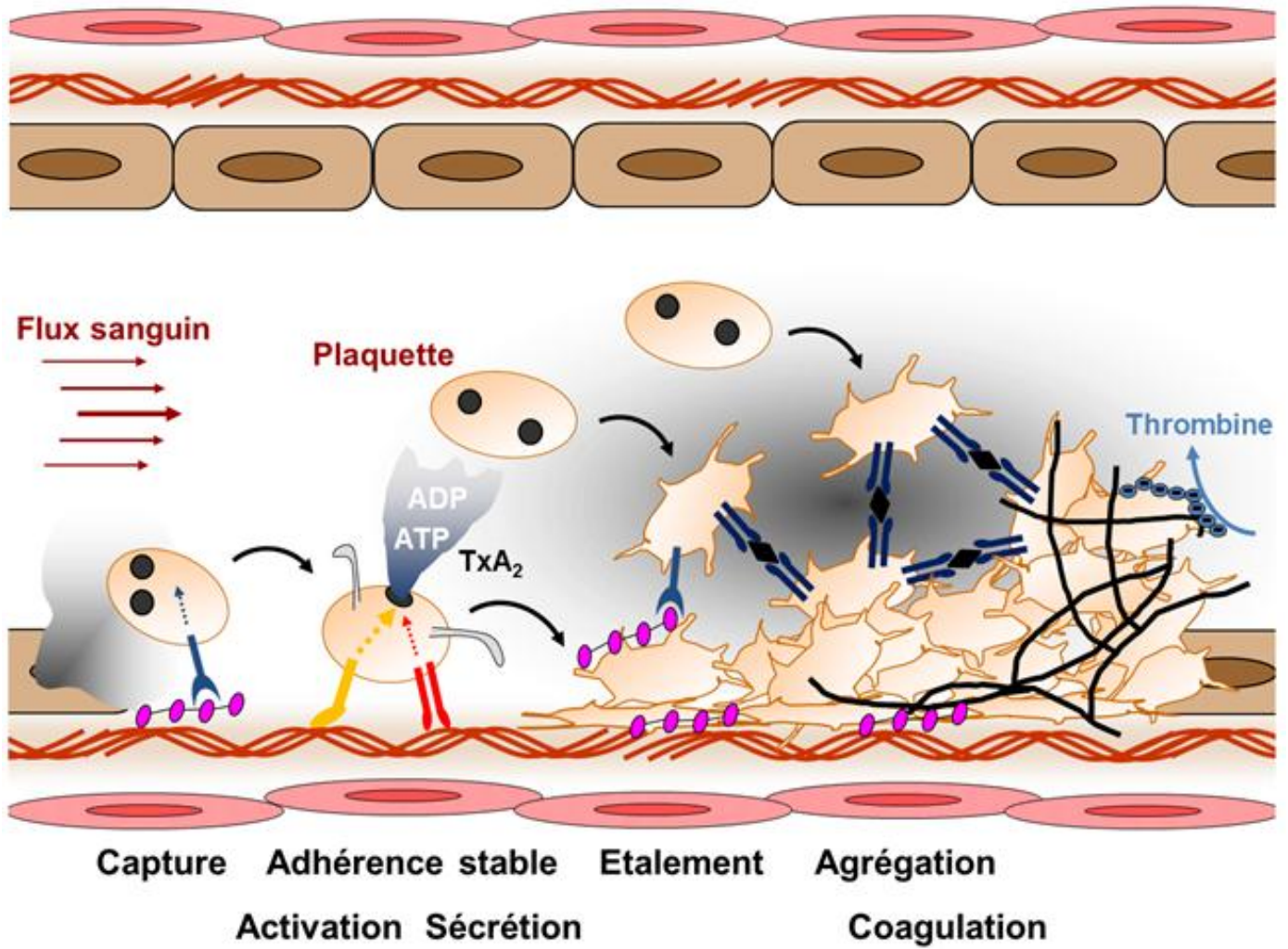


Figure 1 : Schématisation du rôle des plaquettes dans l'hémostase. ADP, adénosine 5'-diphosphate ; ATP, adénosine 5'-triphosphate ; CML, cellule musculaire lisse ; FW, facteur Willebrand ; GP, glycoprotéine ; TxA₂, thromboxane A₂.

L'hémostase regroupe l'ensemble des processus physiologiques qui maintiennent l'intégrité des vaisseaux sanguins en concourant à l'arrêt du saignement suite à une lésion. Trois phases très intriquées sont mises en jeu : l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse. La première étape, l'hémostase primaire, comprend la vasoconstriction, qui limite le débit sanguin et donc la perte de sang, et la formation rapide d'un clou plaquettaire qui va obturer la brèche. La coagulation, en transformant le fibrinogène soluble en un réseau de fibrine insoluble, va former une armature consolidant l'agrégat plaquettaire. Enfin, aux temps tardifs, le bouchon fibrino-plaquettaire est progressivement résorbé par le système fibrinolytique, rétablissant une circulation sanguine normale (**Boneu and Cazenave, 1997; Sabbah and Lacotte, 2011**).

L'hémostase

Au milieu du XIX^{ème} siècle, les processus généraux gouvernant l'hémostase primaire ont été regroupés par le médecin berlinois Rudolf Virchow en une triade associant la paroi vasculaire, des éléments du sang, en particulier les plaquettes et certaines protéines plasmatiques, et les forces hémodynamiques (**Bagot and Arya, 2008**).

Suite à une lésion vasculaire, des protéines adhésives présentes dans le sous-endothélium sont exposées au sang circulant. Dans des conditions de cisaillement élevé, rencontrées dans les artérioles et la microcirculation, l'étape initiale de capture des plaquettes est assurée par la liaison d'un récepteur multimoléculaire, le complexe glycoprotéique (GP) Ib-V-IX, au facteur Willebrand (FW) (**Figure 1**) (**Savage et al., 1996**). La stabilisation de l'adhérence repose sur les intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$, dont les ligands privilégiés sont respectivement le collagène, la fibronectine, la laminine, la vitronectine et le fibrinogène (**Ruggeri, 2002; Savage et al., 1998**). Lorsque le flux sanguin est plus faible, comme dans les veines et les grosses artères, le recrutement des plaquettes repose également sur les intégrines. Les récepteurs d'adhérence initient une activation de faible intensité, relayée par une activation plus importante déclenchée par le récepteur du collagène GPVI, entraînant un changement de forme des plaquettes et l'augmentation de l'affinité des intégrines pour leurs ligands (**Jackson, 2011; Varga-Szabo et al., 2008**). Les plaquettes activées synthétisent du thromboxane A₂ (TxA₂) et sécrètent le contenu de leurs granules,

notamment de l'adénosine 5'-diphosphate (ADP) et de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP), qui amplifient l'activation, conduisant à l'agrégation des plaquettes entre elles via la liaison du fibrinogène plasmatique à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Figure 1**) (**Jackson, 2011; Ruggeri, 2002; Varga-Szabo et al., 2008**). Le clou plaquettaire ainsi constitué stoppe l'hémorragie avant d'être consolidé par la coagulation (**Jobin, 1995a**). Celle-ci est initiée par le facteur tissulaire présent à la surface des cellules pariétales exposées, et renforcée par l'exposition de phospholipides anioniques par les plaquettes activées (**Mackman, 2004**). La coagulation est une cascade de réactions enzymatiques menant à la génération de thrombine, qui clive le fibrinogène soluble afin de former un réseau fibrillaire de fibrine enserrant et stabilisant l'agrégat plaquettaire (**Figures 1 et 2**). La thrombine est également un puissant activateur plaquettaire déclenchant notamment la rétraction du caillot fibrino-plaquettaire en un bouchon compact, résistant et étanche (**Coughlin, 2005; Jobin, 1995a**). Au cours des heures et jours suivants et parallèlement à la cicatrisation de la lésion, les plaquettes sont progressivement phagocytées par les neutrophiles et les monocytes et le système fibrinolytique est déclenché : sous l'effet de la génération de fibrine, le plasminogène inactif est transformé en plasmine, protéase dissolvant la fibrine et plusieurs facteurs de la coagulation (**Jobin, 1995a**).

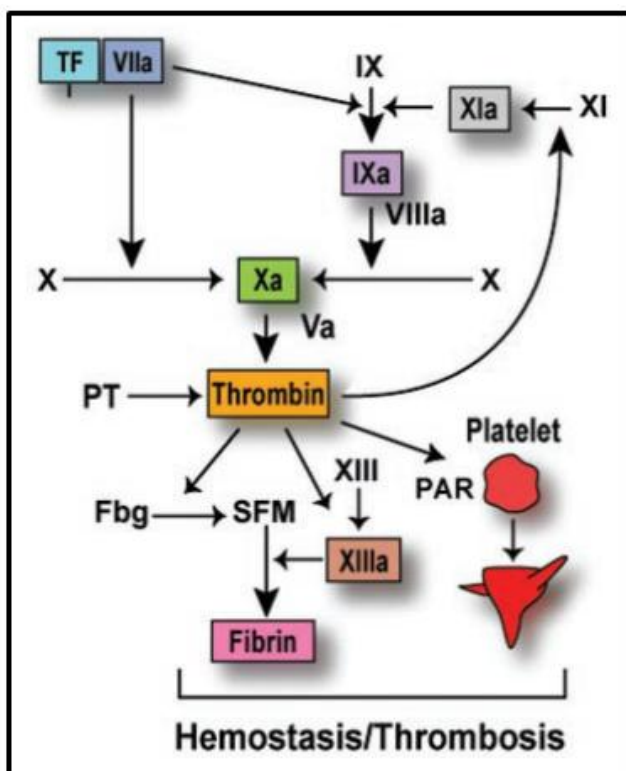


Figure 2 : Représentation de la cascade de la coagulation. La formation du complexe facteur tissulaire (TF)-facteur VIIa initie la coagulation en activant les facteurs X et IX. Le facteur Xa forme avec le facteur Va et des phospholipides anioniques le complexe de la prothrombinase, qui convertit la prothrombine (PT) en thrombine. Cette dernière permet la formation du bouchon hémostatique en activant les récepteurs PAR (*Protease-activated*) des plaquettes et en clivant le fibrinogène (Fbg) en monomères solubles (SFM), qui s'assemblent en un réseau de fibrine insoluble ultérieurement stabilisé par le facteur XIII (d'après **Mackman, 2004**).

La thrombose

Une parfaite intégration des mécanismes hémostatiques permet d'arrêter le saignement, de prévenir sa récurrence et de circonscrire le bouchon à la brèche. Tout dysfonctionnement peut perturber cet équilibre, conduisant soit à des maladies hémorragiques soit à la thrombose, qui est la formation incontrôlée d'un caillot obstruant la lumière vasculaire (**Boneu and Cazenave, 1997; Jobin, 1995b**). La thrombose a des causes variées et peut toucher tout l'arbre circulatoire. On distingue :

- 1) **La thrombose veineuse ou phlébite**, qui prend souvent naissance au niveau du membre inférieur suite à une stagnation du sang (stase) au fond des pochettes valvulaires du réseau veineux profond,
- 2) **La thrombose artérielle**, qui se développe sur une lésion de la paroi comme une plaque d'athérosclérose ou une dilatation anévrysmale,
- 3) **La thrombose intracardiaque**, favorisée par l'association d'affections diverses comme les arythmies, les cardiomyopathies et les valvulopathies,
- 4) **La thrombose des surfaces artificielles** mises au contact du sang telles que les stents, les prothèses valvulaires et les circuits de circulation extracorporelle.

Histologiquement, la thrombose est une masse sanguine solide (le thrombus) adhérent ou non à la paroi et formée d'agrégats plaquettaires, de fibrilles de fibrine et de globules rouges en proportions variables selon les conditions hémorhéologiques (**Boneu and Cazenave, 1997; Jobin, 1995b**). Il existe deux principaux types de thrombi :

- 1) **Le thrombus blanc ou fibrino-plaquettaire**, formé principalement d'agrégats plaquettaires auxquels s'entremêle de la fibrine. Il est caractéristique des vaisseaux à taux de cisaillement élevé comme les petites artères, artérioles et artères présentant un rétrécissement,
- 2) **Le thrombus rouge ou fibrino-cruorique**, constitué de fibrine ayant emprisonné indistinctement globules rouges et autres cellules sanguines. Il se développe

lorsqu'il y a stase dans les veines, les artères obstruées et les cavités du cœur souffrant d'arythmie.

Un thrombus peut évoluer vers (i) **la résolution naturelle** par fibrinolyse, (ii) **l'incrustation dans l'intima** où il sera graduellement transformé en tissu fibreux, contribuant à la progression d'une lésion pariétale préexistante, (iii) **l'occlusion de la lumière vasculaire**, entraînant un arrêt du retour veineux ou, dans le cas d'une artère une nécrose ischémique des tissus irrigués, par exemple un infarctus myocardique ou cérébral, ou une gangrène d'un membre (**Jobin, 1995b; Sabbah and Lacotte, 2011**). L'occlusion peut survenir au site de formation du thrombus et/ou en aval lorsqu'il y a fragmentation de ce dernier en embolies emportés par le flux sanguin. Par exemple, les phlébites se compliquent fréquemment d'embolies migrant dans la circulation pulmonaire où ils peuvent provoquer une défaillance cardiaque redoutable (**Sabbah and Lacotte, 2011**). Responsable de la majorité des 17 millions de décès d'origine cardiovasculaire en 2008, la thrombose représente la première cause de mortalité dans le monde (**OMS, 2011**).

But de la thèse et principaux résultats

Contexte

L'athérosclérose est une pathologie complexe et dégénérative caractérisée par un épaissement de la paroi des artères de moyen et gros calibre évoluant vers la formation de plaques athéromateuses (**Jobin, 1995b; Libby, 2002; Libby et al., 2011**). Ces plaques comprennent un noyau lipidique riche en cholestérol et en cellules spumeuses entouré d'une chape fibreuse composée de cellules musculaires lisses (CML) et de collagènes. La croissance des plaques conduit à un rétrécissement progressif de la lumière vasculaire appelé sténose (**Nesbitt et al., 2006**). A un stade avancé, un déséquilibre entre un contenu lipidique trop important et une enveloppe fibreuse fine entraîne la fragilisation des plaques. Ces plaques dites évoluées sont sujettes à l'érosion ou la rupture, conduisant à l'exposition au sang d'un

matériel hautement thrombogène incluant des lipides, du facteur tissulaire et des quantités élevées de collagène fibrillaire (**Jackson, 2011; Jobin, 1995b; Libby, 2002**). Les plaquettes adhèrent et s'activent de manière exacerbée au contact de ces constituants et peuvent former un thrombus occlusif, qui entraîne une ischémie tissulaire. Les complications thrombo-emboliques de la rupture d'une plaque sont responsables de la majorité des syndromes coronariens aigus (angine de poitrine instable, infarctus du myocarde, mort subite), des accidents vasculaires cérébraux et des ischémies aiguës des membres inférieurs (**Jackson, 2011; Jobin, 1995b; OMS, 2011; Sabbah and Lacotte, 2011**). La plaquette sanguine jouant un rôle clef dans la thrombose sur plaque, elle représente une cible thérapeutique majeure.

Actuellement, trois grands types d'antiplaquettaires sont utilisés en clinique (**Yousuf and Bhatt, 2011**). Les deux premiers, l'aspirine et les thiéno-pyridines, ciblent les deux plus importantes boucles amplificatrices de l'activation des plaquettes. L'aspirine inhibe irréversiblement la cyclo-oxygénase-1 (COX-1), bloquant ainsi la production de TxA_2 . Les thiéno-pyridines comme le clopidogrel inhibent irréversiblement le récepteur $P2Y_{12}$ de l'ADP. La troisième grande catégorie, les antagonistes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, inhibent directement l'agrégation plaquettaire en empêchant la liaison du fibrinogène aux plaquettes activées. Ces médicaments ont une efficacité reconnue et sont utilisés seuls ou en association, d'une part dans la prévention des récurrences de thrombose artérielle et d'autre part en situation aiguë, par exemple lors d'infarctus du myocarde et d'interventions coronariennes comme l'athérectomie ou l'angioplastie avec pose de stent. Leur principale limite est qu'ils entraînent un risque de saignement, ce qui compromet leur utilisation, particulièrement en traitement chronique et chez les patients victimes d'ischémie cérébrale ou subissant une revascularisation chirurgicale par pontage ou endartériectomie (**Fabre and Gurney, 2010; Michelson, 2010; Yousuf and Bhatt, 2011**).

Raisonnement

Le risque hémorragique associé aux anti-thrombotiques actuels illustre le besoin en médicaments innovants, capables d'affecter significativement la thrombose tout en préservant l'hémostase. Dans cette optique, l'objectif central de cette thèse a été d'explorer une nouvelle stratégie basée sur le ciblage non plus de l'activation et de l'agrégation des plaquettes, mais

de l'étape initiale d'adhérence aux protéines sous-endothéliales. Des travaux antérieurs ont en effet montré que l'inhibition de l'axe GPIb-V-IX/FW (**Kageyama et al., 1997; Ulrichs et al., 2011; Wu et al., 2002**), ou de l'un des deux principaux récepteurs des collagènes, l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (**Holtkotter et al., 2002; Miller et al., 2009**) et la GPVI (**Li et al., 2007; Mangin et al., 2012**), diminue la thrombose dans des modèles animaux tout en préservant l'hémostase. De récentes études cliniques de phase I ont confirmé que des agents bloquant les interactions GPIb-V-IX/FW (**Gilbert et al., 2007**) ou GPVI/collagène (**Ungerer et al., 2011**) ne prolongent pas ou alors que très modérément le temps de saignement. Un autre récepteur d'adhérence potentiellement intéressant est l'intégrine $\alpha_6\beta_1$, qui lie les laminines (LN), une importante famille de protéines sous-endothéliales (**Hallmann et al., 2005**). Dans une première partie, nous avons évalué la pertinence du ciblage de ce récepteur en utilisant une lignée de souris ne l'exprimant pas (**Publication 1**). Deuxièmement, nous avons cherché à mettre à profit le fait que la thrombose survient sur une plaque d'athérosclérose, qui contient de nombreuses protéines absentes de la paroi artérielle saine (**Bagnato et al., 2007**). Certaines de ces protéines pourraient participer à l'adhérence plaquettaire et constituer des cibles particulièrement prometteuses. Nous avons évalué les propriétés adhésives et activatrices de la ténascine-C (TN-C), qui est une glycoprotéine préférentiellement exprimée dans les plaques (**Kenji et al., 2004; Pedretti et al., 2010; von Lukowicz et al., 2007; Wallner et al., 1999**), et décrite pour lier des intégrines et moduler l'adhérence et la migration cellulaires (**Midwood and Orend, 2009**) (**Publication 2 et Annexe**).

Une autre approche anti-thrombotique potentiellement plus sûre consisterait à cibler des protéines des voies de signalisation intra-plaquettaires. En effet, il a été montré que la délétion ou l'inhibition chez l'animal de certaines isoformes de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (**Jackson and Schoenwaelder, 2006; Martin et al., 2010**), de la protéine kinase B/Akt (**Woulfe et al., 2004**) ou de la protéine kinase C (PKC) (**Konopatskaya et al., 2009; Nagy et al., 2009**) diminue significativement la thrombose expérimentale sans prolonger le temps de saignement. Dans cette perspective, nous nous sommes intéressés à β -arrestine-1 (β -arr1) et β -arrestine-2 (β -arr2). Ces protéines cytosoliques s'associent à certains récepteurs activés, notamment ceux couplés aux protéines G, initiant (i) leur désensibilisation, et (ii) l'activation de voies de signalisation régulant l'adhérence et la migration cellulaires via la modulation de l'affinité des intégrines et de l'organisation du cytosquelette (**DeWire et al., 2007**). Les β -arrestines pourraient être impliquées dans la désensibilisation des récepteurs à l'ADP P2Y₁ et P2Y₁₂ (**Hoffmann et al., 2008; Mundell et al., 2006; Reiner et al., 2009**;

Savi et al., 2006), mais leur fonction dans les voies de signalisation des plaquettes reste inconnue. La troisième partie de cette thèse porte sur le rôle de β -arr1 et β -arr2 dans l'activation plaquettaire ainsi qu'en hémostase et en thrombose (**Publication 3**).

Principaux résultats

1. Rôle de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ en hémostase et thrombose

L'intégrine $\alpha_6\beta_1$ joue un rôle critique *in vitro* dans l'adhérence des plaquettes sur une surface de laminine (**Hindriks et al., 1992; Nigatu et al., 2006; Sonnenberg et al., 1988**), mais son importance en hémostase et thrombose est inconnue. Afin de l'évaluer, nous avons développé une lignée de souris n'exprimant pas $\alpha_6\beta_1$ dans la lignée mégacaryocytoplaquettaire. Les plaquettes de ces souris s'activent normalement en réponse aux agonistes classiques. En revanche, elles sont incapables d'adhérer sur les LN411, 511 et 521, qui sont les isoformes prédominantes dans la paroi vasculaire. Dans trois modèles, les souris $\alpha_6\beta_1^{-/-}$ présentent une inhibition marquée de la thrombose artérielle induite par une lésion mécanique ou un tir laser. Le temps de saignement et le volume de sang perdu après section de la queue sont inchangés, indiquant l'absence de répercussion sur l'hémostase primaire. Ces résultats révèlent une contribution de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ à la thrombose artérielle et suggèrent qu'elle pourrait représenter une cible anti-thrombotique attractive dépourvue de risque de saignement (**Publication 1**).

2. Rôle de la TN-C dans l'adhérence et l'activation plaquettaires

La TN-C est fortement exprimée dans les plaques d'athérosclérose (**Kenji et al., 2004; Pedretti et al., 2010; von Lukowicz et al., 2007; Wallner et al., 1999**) et pourrait participer à l'adhérence et l'activation plaquettaires. En utilisant un système de perfusion dans lequel du sang anti-coagulé est aspiré au travers de microcapillaires de verre recouverts de TN-C purifiée, nous avons observé que cette protéine assure une adhérence efficace des plaquettes comparativement au FW et au fibrinogène, deux protéines adhésives de référence. De plus, les plaquettes adhèrent sur TN-C dans des conditions de flux élevé, identiques à celles retrouvées

en situation pathologique dans la gorge d'une sténose. L'utilisation d'anticorps bloquants et de sang de souris modifiées génétiquement a permis d'élaborer un modèle dans lequel la TN-C exposée au sang suite à l'érosion ou la rupture d'une plaque d'athérosclérose lie le FW plasmatique, qui permet le recrutement des plaquettes par interaction avec le complexe GPIIb-V-IX. La stabilisation de l'adhérence repose sur l'association de la TN-C avec des intégrines, principalement $\alpha_2\beta_1$ et, dans une moindre mesure, $\alpha_{IIb}\beta_3$. Enfin, la plupart des plaquettes adhérant sur TN-C émettent des filopodes et présentent une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique, traduisant leur activation. Ces résultats suggèrent que la TN-C pourrait participer à la thrombose. En raison de son expression préférentielle dans les plaques d'athérosclérose, elle pourrait représenter un candidat attractif pour un ciblage de la thrombose affectant peu l'hémostase (**Publication 2 et Annexe**).

3. Rôle des β -arrestines dans l'activation plaquettaire, en hémostase et en thrombose

Le rôle de β -arr1 et β -arr2 dans l'activation plaquettaire ainsi qu'en hémostase et en thrombose a été évalué à l'aide de souris déficientes en β -arr1 ou β -arr2. Malgré le rôle supposé de ces protéines dans la désensibilisation des récepteurs $P2Y_1$ et $P2Y_{12}$, nous avons observé que leur délétion n'affecte pas ce processus. De plus, les plaquettes mutantes s'activent normalement en réponse aux agonistes classiques. En revanche, celles déficientes en β -arr1 émettent significativement moins de filopodes que les plaquettes normales après adhérence sur fibrinogène, indiquant un défaut dans la réorganisation du cytosquelette initiée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. L'évaluation de différents marqueurs de la signalisation de cette intégrine a montré que β -arr1 intervient en aval de Src kinases, et en augmentant le niveau de phosphorylation d'Akt, une kinase connue pour participer à l'activation plaquettaire (**Woulfe, 2010**). Les souris déficientes en β -arr1 présentent une légère diminution de la thrombose artérielle après lésion par le $FeCl_3$ ou par un tir laser. Le temps de saignement et le volume de sang perdu après section de la queue sont inchangés, indiquant l'absence de répercussion sur l'hémostase. Ces données suggèrent que β -arr1 régule la signalisation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et participe modestement à l'agrégation plaquettaire *in vivo* (**Publication 3**).

Conclusion et perspectives

Dans la perspective de développer des agents capables de prévenir la thrombose tout en préservant l'hémostase, ce travail a permis de dégager deux nouvelles pistes intéressantes basées sur le ciblage de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ ou de l'interaction plaquette/TN-C. En revanche, l'inhibition de β -arr1 ou β -arr2 ne semble pas une stratégie anti-thrombotique efficace. Au-delà de l'aspect pharmacologique, ces études ont amélioré la compréhension des mécanismes moléculaires qui régulent l'adhérence et l'activation plaquettaires ainsi que la thrombose artérielle.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

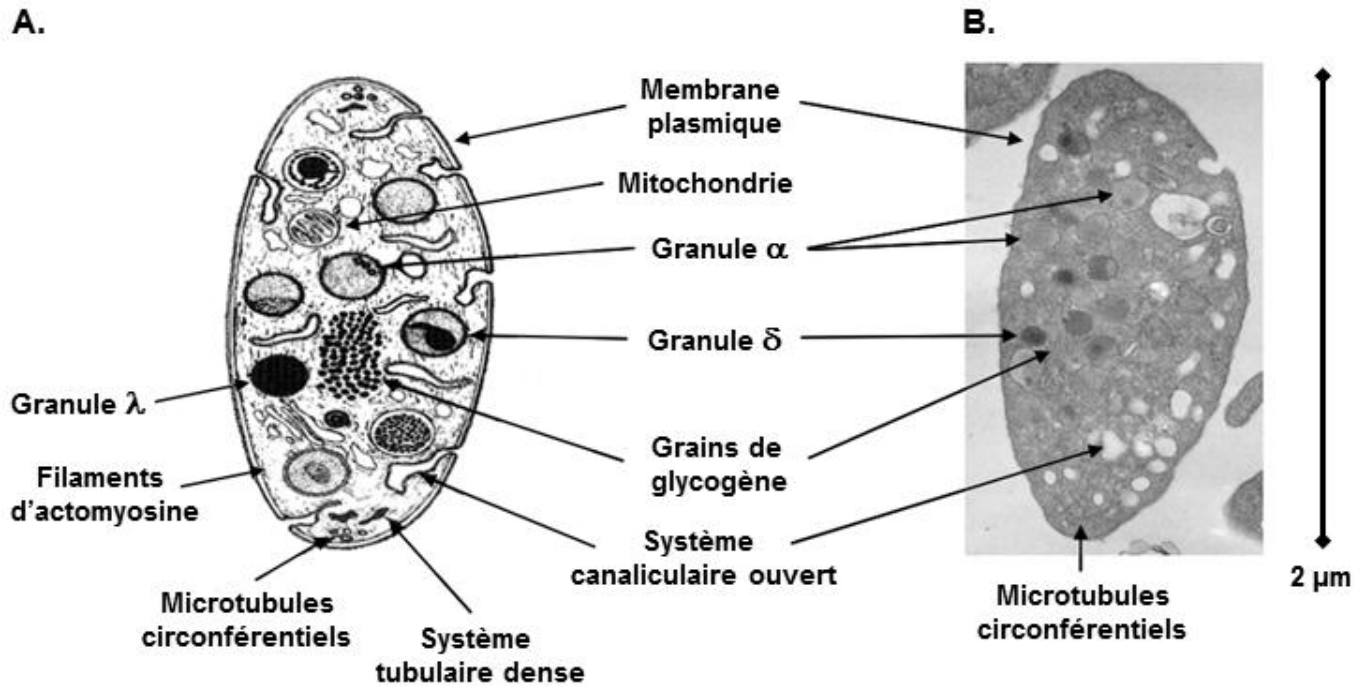


Figure 3 : Schématisation (A) et image de microscopie électronique à transmission (B) d'une plaquette au repos en coupe longitudinale (Anita Eckly, INSERM U949, Strasbourg).

Cette revue traite des trois acteurs impliqués dans la formation du clou plaquettaire décrits dans la triade de Virchow à savoir les plaquettes, la paroi vasculaire et le flux sanguin. Après quelques généralités sur les plaquettes, nous nous focaliserons sur leurs principaux récepteurs d'adhérence et d'activation. Puis, nous traiterons de la composition de la paroi artérielle saine et de sa réactivité hémostatique, avant d'aborder l'impact des conditions hémorhéologiques sur les fonctions plaquettaires. Enfin, la dernière partie portera sur l'athérosclérose et sa complication majeure, la thrombose artérielle. Une attention particulière sera accordée au traitement de cette dernière par les antiplaquettaires, qu'il s'agisse de ceux actuellement disponibles ou en développement.

1. Généralités sur la plaquette sanguine

Décrites pour la première fois en 1881 par le médecin italien Giulio Bizzozero (**Bizzozero, 1881**), les plaquettes sanguines sont des fragments anucléés de mégacaryocytes, formés dans la moelle rouge de certains os (sternum, côtes, vertèbres, iliaques) (**Boneu and Cazenave, 1997**). Au repos, les plaquettes ont une forme discoïde et un diamètre de 2 μm pour un volume d'environ 8 μm^3 . Les deux tiers de la population plaquettaire circulent à une concentration comprise entre 150 000 et 400 000 plaquettes/ μL , le reste étant séquestré dans la rate (**Boneu and Cazenave, 1997**). Leur durée de vie moyenne est de 8 à 10 jours, après quoi elles sont phagocytées par les macrophages de la rate et du foie (**Mason et al., 2007**).

Les plaquettes ont une ultrastructure complexe organisée autour de trois ensembles : la membrane plasmique, les organites et le cytosquelette (**Figure 3**).

Organe pivot, la **membrane plasmique** est une bicouche asymétrique composée de phospholipides, de cholestérol, de glycolipides, de protéoglycanes et de glycoprotéines. Des invaginations tortueuses constituent le système canaliculaire ouvert (SCO), qui démultiplie les contacts avec l'environnement et forme une réserve de membrane mobilisable lors du changement de forme (**Boneu and Cazenave, 1997**).

Les **organites** comprennent des mitochondries, des grains de glycogène, le système tubulaire dense (STD), qui correspond au réticulum endoplasmique et séquestre le Ca^{2+} , et des granules de stockage dont le contenu est sécrété lors de l'activation (**Tableau 1**) (**Boneu and**

Cazenave, 1997; Ruiz et al., 2004). Ces derniers sont de trois types. Les granules α sont les plus abondants et contiennent notamment des glycoprotéines adhésives, des facteurs de coagulation et des facteurs de croissance. Les granules denses ou δ renferment de fortes concentrations de substances pro-agrégantes et pro-coagulantes comme l'ADP, l'ATP, le Ca^{2+} et les polyphosphates. Enfin, les granules λ sont analogues aux lysosomes et contiennent de nombreuses protéases (**Boneu and Cazenave, 1997; Ruiz et al., 2004**). Il existe de rares cas de patients avec un déficit quantitatif ou qualitatif en granules α (Ex. syndrome des plaquettes grises) ou δ (Ex. maladie du « pool vide »), responsable d'hémorragies de sévérité variable (**Nurden and Nurden, 2011**).

Granules α	Granules denses (δ)	Granules λ
Glycoprotéines adhésives (Ex. fibrinogène, FW, TSP-1, fibronectine, vitronectine)	ADP (~650 mM) ATP (~440 mM) Sérotonine (~65 mM)	Hydrolases acides (Ex. cathepsines)
Facteurs de coagulation (Ex. facteurs V, XI, XIII, facteur tissulaire, kininogène de haut poids moléculaire)	Pyrophosphate (~330 mM) Polyphosphates (~1 mM) Ca^{2+} (~2 M)	Métalloprotéases (Ex. collagénases)
Inhibiteurs de la fibrinolyse (Ex. α_2 -antiplasmine, PAI-1)		
Facteurs de croissance et chimiokines (Ex. PDGF, TGF β , EGF, VEGF, PF4)		
P-sélectine		
Albumine		

Tableau 1 : Principales substances contenues dans les granules plaquettaires. EGF, *epidermal growth factor* ; PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1* ; PDGF, *platelet-derived growth factor* ; PF4, *platelet factor 4* ; TGF β , *transforming growth factor β* ; TSP-1, *thrombospondine-1* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor* (**d'après Boneu and Cazenave, 1997; Mackman, 2004; Ruiz et al., 2004**).

Le **cytosquelette** comprend un réseau circonférentiel de microtubules sous la membrane plasmique, qui maintiennent la forme discoïde de repos, et des filaments contractiles d'actomyosine localisés d'une part dans la région sous-membranaire et d'autre part dans le cytosol (Boneu and Cazenave, 1997; Hartwig and DeSisto, 1991). L'activation plaquettaire entraîne des remaniements du cytosquelette à l'origine d'un changement de forme et de la sécrétion du contenu des granules. Selon le mode et l'intensité de stimulation, les changements morphologiques peuvent varier. Des plaquettes en suspension activées par un agoniste deviennent sphériques, se contractent et émettent des filopodes (Figure 4) (Cazenave et al., 2004). Lorsque les plaquettes sont mises à adhérer sur une surface comme le fibrinogène ou le FW, elles adoptent également une conformation sphérique, se contractent et émettent des filopodes, avant d'étendre des lamellipodes et de s'étaler avec un aspect d'« œuf au plat » (Figure 4) (Goncalves et al., 2003; Lanza et al., 2008).

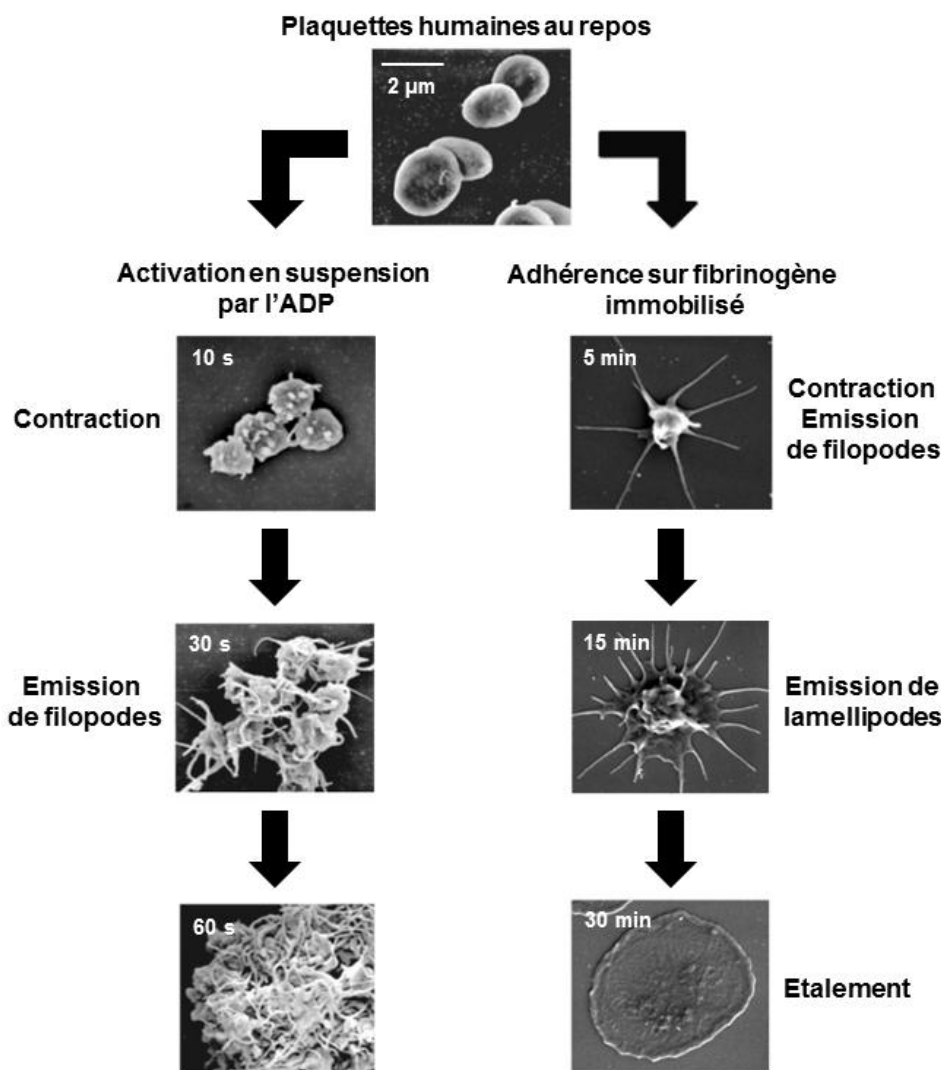


Figure 4 : Changements morphologiques des plaquettes au cours de leur activation en suspension par un agoniste soluble (ADP, 5 μM), ou après adhérence sur fibrinogène immobilisé. Images de microscopie électronique à balayage (Anita Eckly, INSERM U949, Strasbourg).

2. Les récepteurs d'adhérence et d'activation des plaquettes

Trois grandes fonctions contribuent aux propriétés hémostatiques des plaquettes : leur capacité à **adhérer** à la surface d'un vaisseau lésé, à **s'activer** en réponse aux protéines matricielles et à des agonistes solubles, et à **agréger** entre elles pour former le clou hémostatique (**Jackson, 2011; Ruggeri, 2002**). Ces fonctions sont régulées par de nombreux récepteurs enchâssés dans la membrane plasmique (**Figure 5**).

L'adhérence et l'agrégation sont assurées par des intégrines et d'autres glycoprotéines comme le complexe GPIb-V-IX et la GPVI. Ces récepteurs déclenchent des cascades de signalisation intracellulaires mettant notamment en jeu des tyrosine kinases et menant à l'activation des plaquettes (**Ruggeri, 2002; Varga-Szabo et al., 2008**).

L'activation est amplifiée par des agonistes solubles, dont les plus importants sont l'ADP, l'ATP, le TxA₂ et la thrombine, qui mobilisent des récepteurs canaux ou appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG) (**Jackson, 2011; Ruggeri, 2002**).

Enfin, certains récepteurs inhibent les fonctions plaquettaires. Il s'agit de la guanylate cyclase soluble (GCs), stimulée par le monoxyde d'azote (NO) (**Landry and Gies, 2006**), de RCPG activés par la prostacycline (PGI₂) (**Gleim et al., 2009**) ou l'adénosine (**Johnston-Cox et al., 2011**), et d'immunorécepteurs contenant des domaines ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) comme PECAM-1 (*Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) (**Falati et al., 2006**).

Cette partie s'intéresse aux principaux récepteurs des protéines adhésives et des activateurs solubles, à la signalisation qui leur est associée, ainsi qu'à la régulation de leur activité par le mécanisme de désensibilisation.

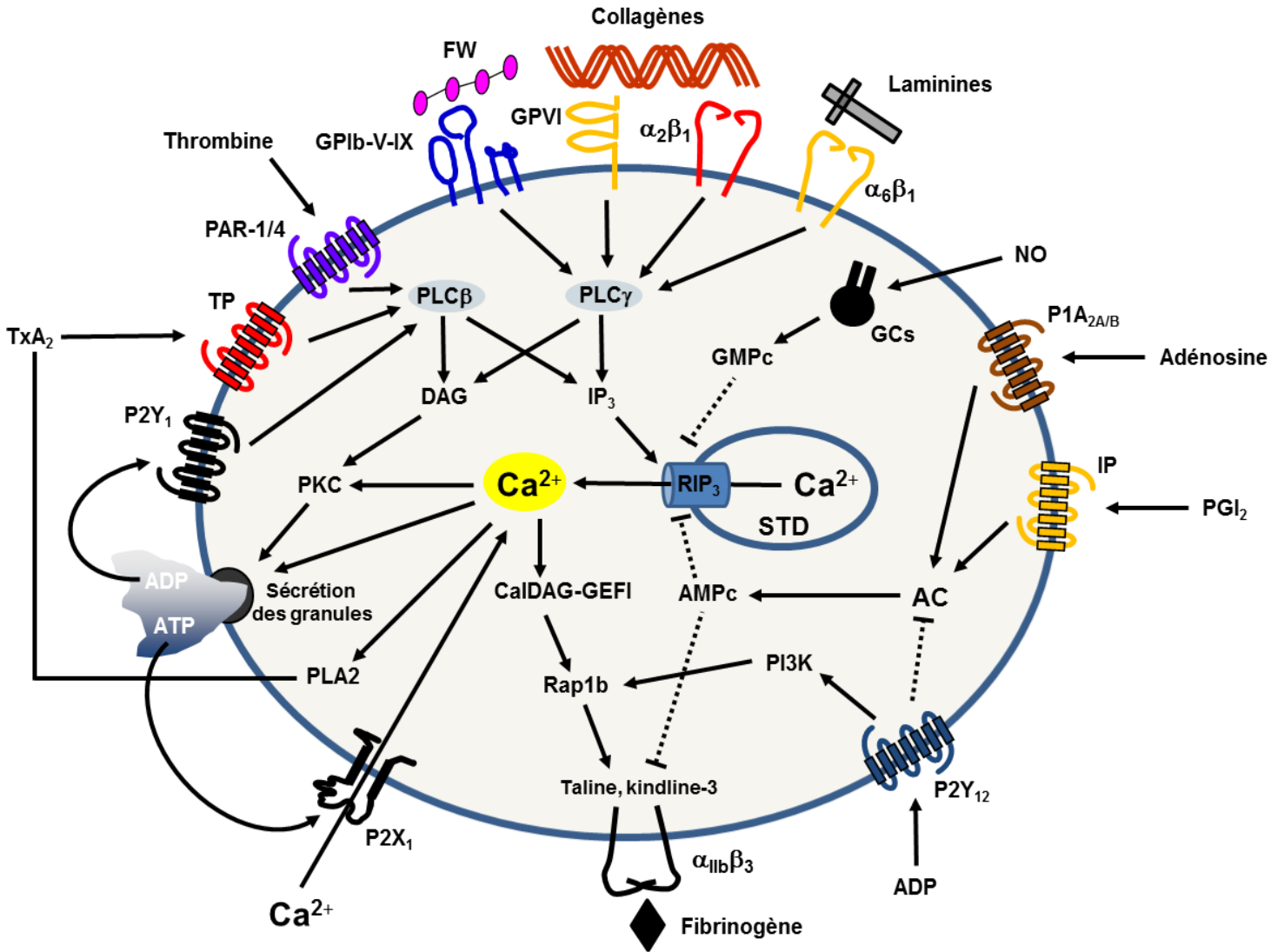


Figure 5 : Schématisation des principales voies d'activation et d'inhibition des plaquettes. AC, adénylate cyclase ; AMPc, adénosine 3',5'-monophosphate cyclique ; CalDAG-GEFI, Ca^{2+} - and DAG-regulated guanine nucleotide exchange factor I ; DAG, diacylglycérol ; GCs, guanylate cyclase soluble ; GMPC, guanosine 3',5'-monophosphate cyclique ; GP, glycoprotéine ; IP, prostacyclin receptor ; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate ; NO, monoxyde d'azote ; PAR, protease-activated receptor ; PGI₂, prostacycline ; PLA2, phospholipase A2 ; PLC, phospholipase C ; RIP₃, récepteurs de l'IP₃ ; STD, système tubulaire dense ; TP, thromboxane/prostaglandin receptor.

2.1. Principaux récepteurs des protéines adhésives

2.1.1. Le complexe GPIb-V-IX

Le complexe GPIb-V-IX appartient à la superfamille des protéines riches en leucine et est exclusivement exprimé dans la lignée mégacaryocytaire (**Lanza et al., 2008**). C'est un multimère constitué de quatre types de glycoprotéines transmembranaires : la GPIb α (135 kDa) liée à deux GPIb β (24 kDa) par des ponts disulfures pour former la GPIb, qui s'associe de manière non covalente à la GPIX (20 kDa) et à la GPV (82 kDa). La stoechiométrie est respectivement de 2 : 4 : 2 : 1 (25 000 copies du complexe GPIb-IX pour 12 000 de GPV) (**Figure 6A**) (**Bergmeier and Hynes, 2012**).

Le complexe GPIb-V-IX est considéré comme le récepteur majeur du FW, dont la fonction principale est d'assurer le recrutement des plaquettes, que ce soit au niveau du sous-endothélium exposé (**Savage et al., 1996**) ou à la surface d'un agrégat plaquettaire (**Kulkarni et al., 2000**) (**Figure 1**). Les sites de liaison pour le FW sont localisés sur la portion globulaire N-terminale de la GPIb α , qui reconnaît une autre protéine adhésive, la thrombospondine (TSP)-1 (**Figure 6A**) (**Jurk et al., 2003**). La GPIb α lie également la thrombine, les facteurs de coagulation XI et XII, le kininogène de haut poids moléculaire, la P-sélectine et l'intégrine leucocytaire $\alpha_M\beta_2$, suggérant un rôle du complexe GPIb-V-IX dans la coagulation et l'inflammation (**Lanza et al., 2008**).

Au niveau intracellulaire, GPIb-V-IX interagit avec la filamine A qui lie le cytosquelette d'actine. Ce pontage est important pour l'expression de surface du complexe et son ancrage membranaire (**Figure 6B**) (**Lanza et al., 2008**). D'autres partenaires directs ont été identifiés à savoir la calmoduline (**Andrews et al., 2001**) et plusieurs isoformes de la protéine adaptatrice 14-3-3 (**Mangin et al., 2009**). En réponse au FW, GPIb-V-IX génère une signalisation impliquant des tyrosine kinases de la famille Src et la phospholipase C (PLC) de type γ_2 (**Mangin et al., 2003**). Les voies effectrices liées à ces enzymes mènent au changement de forme des plaquettes, qui se contractent et émettent des filopodes, et à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Lanza et al., 2008**). L'importance de cette signalisation *in vivo* reste à démontrer.

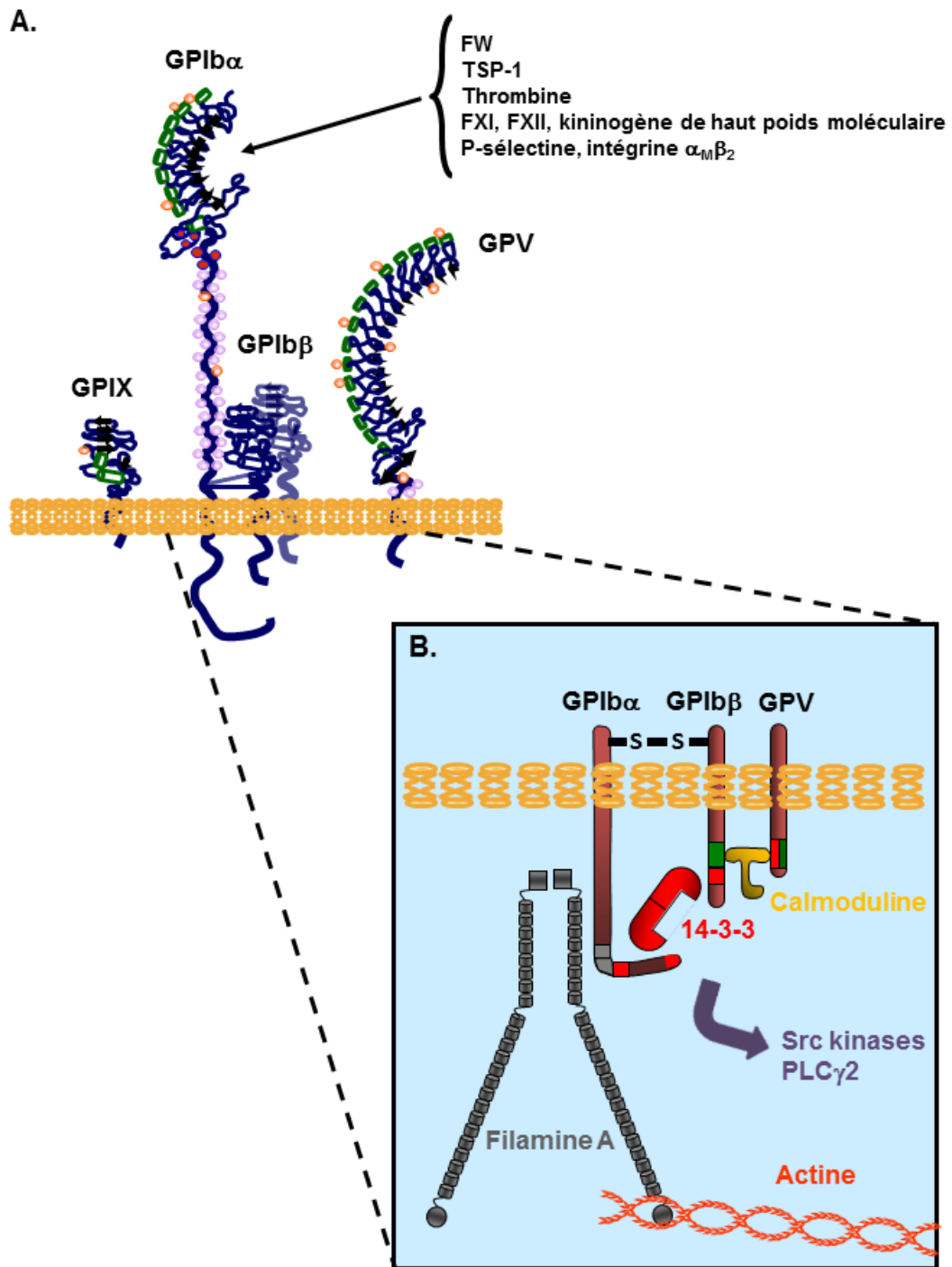


Figure 6 : Parties extracellulaire (A) et intracellulaire (B) du complexe GPIIb-V-IX et leurs principaux ligands (Adapté de Lanza et al., 2008).

L'importance physiologique du complexe est soulignée par l'existence d'une maladie hémorragique rare appelée syndrome de Bernard-Soulier, qui est la conséquence d'une absence d'expression ou d'une anomalie fonctionnelle de l'une de ses sous-unités (**Lanza, 2006**). Cette maladie se traduit par une macrothrombopénie et un prolongement du temps de saignement. Le rôle critique de GPIb-V-IX dans la thrombose artérielle a également été établi dans différents modèles animaux (**Bergmeier et al., 2006; Konstantinides et al., 2006; Strassel et al., 2007**). Par ailleurs, des études génétiques chez l'homme ont révélé un risque accru de thrombose chez les porteurs de certains variants asymptomatiques de la GPIb α dotés d'une meilleure affinité pour le FW (**Di Paola et al., 2005; Matsubara et al., 2005**).

2.1.2. La GPVI

La GPVI est une glycoprotéine de 58 kDa exprimée spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire à raison de 3 000 à 5 000 copies par plaquette (**Best et al., 2003**). Elle comporte deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline interagissant avec le collagène fibrillaire. Par sa région transmembranaire, elle s'associe à la chaîne γ des récepteurs Fc (γ RFc), qui est nécessaire à son expression et lui assure une capacité de signalisation (**Watson et al., 2005**). La GPVI est un récepteur de faible affinité pour le collagène, auquel elle permet l'attachement des plaquettes en condition statique (**Chen et al., 2002a; Jandrot-Perrus et al., 2000**). En présence de flux, sa principale fonction est d'induire l'activation d'intégrines dont $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$ via notamment le relargage d'ADP et de TxA₂, ce qui conduit à l'adhérence stable, l'étalement et l'agrégation des plaquettes (**Kato et al., 2003; Kuijpers et al., 2003; Nieswandt et al., 2001a; Sarratt et al., 2005**). La GPVI participe aussi à l'adhérence des plaquettes sur une surface de fibronectine (**Bültmann et al., 2010**) et à leur activation par les laminines (**Inoue et al., 2006**).

La cascade de signalisation en aval de la GPVI est similaire à celle déclenchée par les immunorécepteurs (**Figure 7**) (**Watson et al., 2005**). La liaison de collagène s'accompagne du regroupement des complexes GPVI/ γ RFc en « *clusters* », entraînant le démasquage du motif cytoplasmique ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activatory motif*) des γ RFc, qui est phosphorylé par des tyrosine kinases de la famille Src (Fyn et Lyn) associées au domaine

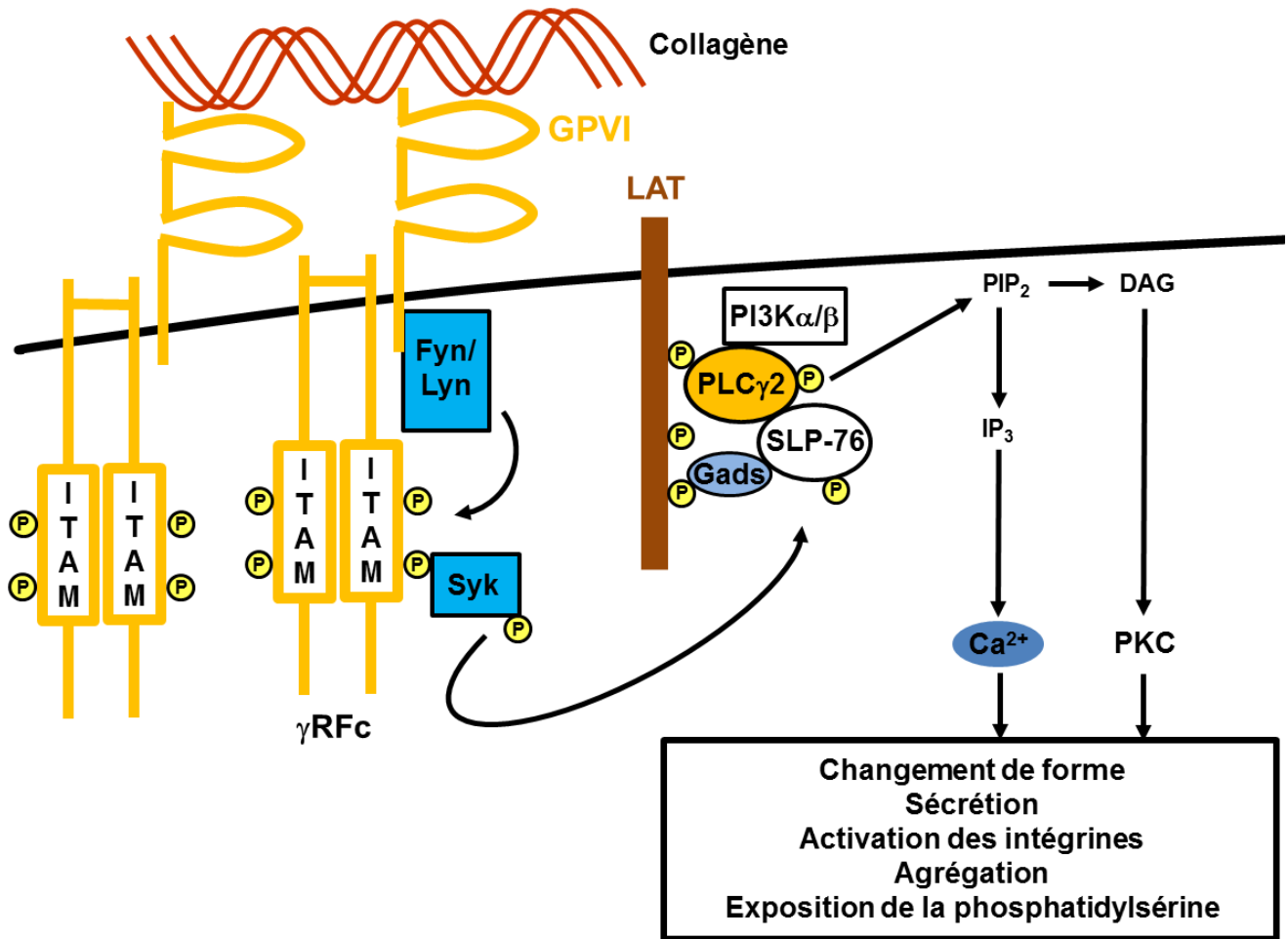


Figure 7 : Schématisation de la signalisation déclenchée par la GPVI. DAG, diacylglycérol ; Gads, *Grb2 adaptor downstream of Shc* ; γRfC, chaîne γ des récepteurs Fc ; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate ; ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activatory motif* ; LAT, *Linker for activation of T cells* ; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PIP₃, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate ; SLP-76, *Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa* ; Syk, *spleen tyrosine kinase* (Adapté de Watson et al., 2005).

intracellulaire de la GPVI. Ceci conduit au recrutement et à l'autophosphorylation de la tyrosine kinase Syk (*Spleen tyrosine kinase*), à la formation d'un complexe de signalisation comprenant notamment les protéines adaptatrices LAT (*Linker for activation of T cells*), SLP-76 (*Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*) et Gads (*Grb2 adaptor downstream of Shc*), et à l'activation des PI3K p110 α et β puis de la PLC γ 2 (**Gilio et al., 2009; Watson et al., 2005; Zahid et al., 2012**). Les voies effectrices liées à ces enzymes induisent la mobilisation des stocks internes de Ca²⁺, la sécrétion du contenu des granules, la synthèse de TxA₂ et l'activation de la petite protéine G Rap1b puis des intégrines (voir section 2.1.3.2.). La signalisation associée à la GPVI conduit aussi à l'exposition à la surface des plaquettes de la phosphatidylsérine, un glycérophospholipide anionique qui est le vecteur de l'activité pro-coagulante (**Heemskerk et al., 2005**).

Des patients n'exprimant pas de GPVI souffrent d'un syndrome hémorragique modéré, suggérant que cette glycoprotéine joue un rôle mineur en hémostasie (**Arthur et al., 2007**). Ceci a été confirmé chez la souris par immunodéplétion de la GPVI ou inactivation de son gène, qui ne prolongent pas ou alors que très peu le temps de saignement mesuré après section de la queue (**Grüner et al., 2004; Kalia et al., 2008; Kato et al., 2003; Lockyer et al., 2006; Mangin et al., 2006**). Dans des modèles de thrombose basés sur des lésions de vaisseaux sains, la GPVI joue, selon les études, un rôle important (**Bender et al., 2011; Dubois et al., 2006; Hechler et al., 2010; Kalia et al., 2008; Massberg et al., 2003; Munnix et al., 2005**) ou très modeste (**Dubois et al., 2006; Eckly et al., 2011; Hechler et al., 2010; Konstantinides et al., 2006; Mangin et al., 2006**). Ceci pourrait s'expliquer par des différences expérimentales portant sur le type de vaisseau utilisé et/ou la nature de la lésion. En particulier, il semble que le rôle de la GPVI soit réduit dans des modèles où la génération de thrombine est importante (**Dubois et al., 2006; Hechler et al., 2010; Mangin et al., 2006**). Plus récemment, il a été montré que la GPVI joue un rôle critique dans des modèles de thrombose sur plaque d'athérosclérose rompue par des ultrasons ou une aiguille (**Hechler and Gachet, 2011a; Kuijpers et al., 2009**).

2.1.3. Les intégrines

2.1.3.1. Généralités

Les intégrines sont formées de l'association non covalente de deux chaînes glycoprotéiques transmembranaires α et β . Les propriétés adhésives des intégrines sont déterminées d'une part par l'affinité envers leur(s) ligand(s), qui dépend de la conformation des domaines extracellulaires, et d'autre part par l'avidité, qui est fonction du degré d'oligomérisation (**Luo et al., 2007**). Trois états conformationnels distincts ont été décrits : 1) un état de repos, à faible affinité, où l'intégrine adopte une conformation en « V » repliée sur elle-même ; 2) un état d'affinité intermédiaire matérialisé par l'extension de l'intégrine, avec une tête globulaire en position fermée ; 3) un état de forte affinité lorsque la tête prend une configuration ouverte, exposant la poche de fixation du ligand de manière optimale (**Figure 8**) (**Luo et al., 2007; Xiao et al., 2004**). Ces réarrangements structuraux sont contrôlés par une signalisation intracellulaire qualifiée d'« *inside-out* » (voir section 2.1.3.2.). En retour, la reconnaissance du ligand conduit à l'oligomérisation de plusieurs intégrines, induisant simultanément la stabilisation de l'état à haute affinité et l'initiation d'une cascade de signaux cytosoliques dits « *outside-in* » (**Luo et al., 2007**). Ainsi, les intégrines sont impliquées dans un transfert bidirectionnel d'informations entre l'intérieur et l'extérieur des cellules, établissant un lien entre les molécules d'adhérence matricielles et les systèmes de signalisation intracellulaires.

2.1.3.2. Mécanismes d'activation des intégrines plaquettaires

Dans la plaquette, l'activation des intégrines est déclenchée par l'exposition aux protéines adhésives (Ex. FW, collagène) et/ou aux agonistes solubles (Ex. ADP, TxA₂, thrombine), dont les récepteurs initient des voies de signalisation « *inside-out* » mettant en jeu des PLC respectivement de type γ ou β (**Figure 5**) (**Jackson et al., 2004**). Les PLC hydrolysent le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) de la membrane plasmique en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃), qui activent respectivement des PKC et des récepteurs canaux mobilisant le Ca²⁺ stocké dans le STD (**Landry and Gies, 2006**).

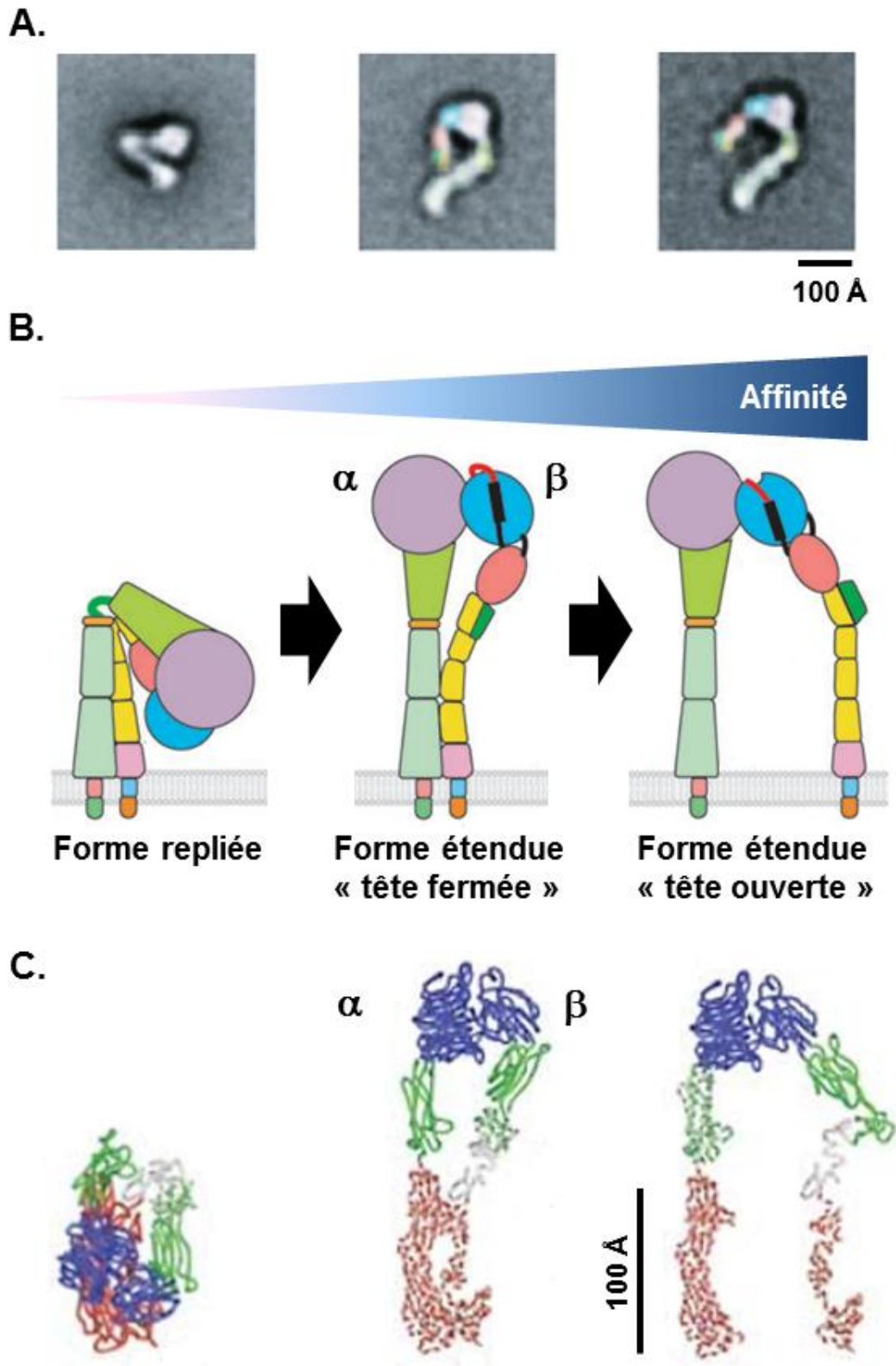


Figure 8 : Images de microscopie électronique à transmission (A), schématisation (B) et diagrammes en rubans (C) des trois conformations adoptées par les domaines extracellulaires de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Adapté de Luo et al., 2007; Xiao et al., 2004).

Le Ca^{2+} et le DAG permettent le recrutement d'une protéine GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*) appelée CalDAG-GEFI, qui active la petite protéine G Rap1b (**Figure 5**) (**Guidetti and Torti, 2012**). Rap1b peut aussi être activée par un mécanisme indépendant du Ca^{2+} impliquant des PI3K. Ceci est observé en aval de la GPVI (**Gilio et al., 2009**) et des récepteurs couplés à une protéine Gi comme le P2Y₁₂ (**Lova et al., 2003; Woulfe et al., 2002**). Rap1b induit l'association de protéines cytosquelettiques telles que la taline et la kindline-3 avec les domaines cytoplasmiques des intégrines β_1 et β_3 , aboutissant aux changements conformationnels activateurs décrits section 2.1.3.1. (**Guidetti and Torti, 2012; Luo et al., 2007**).

Chez la souris, l'inactivation du gène codant pour CalDAG-GEFI (**Crittenden et al., 2004**), Rap1b (**Chrzanowska-Wodnicka et al., 2005**) ou la taline (**Nieswandt et al., 2007**) prolonge fortement le temps de saignement et protège contre la thrombose artérielle. Concernant les souris déficientes en kindline-3, elles décèdent dans la période néonatale d'hémorragies multiples (**Moser et al., 2008**). Chez l'homme, des mutations du gène codant pour la kindline-3 s'accompagnent de syndromes hémorragiques sévères (**Malinin et al., 2010; Meller et al., 2012; Robert et al., 2011**). Des saignements modérés ont aussi été rapportés chez trois patients portant une mutation du gène codant pour CalDAG-GEFI (**Canault et al., 2012**). Ces observations illustrent l'importance des signaux « *inside-out* » dans l'adhérence et l'agrégation des plaquettes *in vivo*.

2.1.3.3. Les intégrines β_3

a) $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, qui est le récepteur plaquettaire le plus abondant, est exprimée spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire. Chaque plaquette en contient environ 80 000 copies en surface ainsi que 30 000 exemplaires supplémentaires sur les membranes du SCO et des granules α , qui sont exposés après activation (**Wagner et al., 1996**). L' $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ reconnaît plusieurs protéines possédant une séquence RGD comme le fibrinogène, le FW, la fibronectine et la vitronectine (**Varga-Szabo et al., 2008**). En condition de flux faible, cette intégrine participe au recrutement des plaquettes au site de lésion en liant le fibrinogène présent dans le sous-endothélium (**Savage et al., 1996**). De plus, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ interagit avec le FW adsorbé aux fibres de collagène, permettant de stabiliser l'interaction des plaquettes avec

celles-ci (**Savage et al., 1998**). La fonction principale d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ est de lier le fibrinogène plasmatique, dont la nature dimérique permet le pontage et l'agrégation des plaquettes. Ce processus nécessite l'activation préalable de l'intégrine par une signalisation « *inside-out* » (voir section 2.1.3.2.) (**Varga-Szabo et al., 2008**).

L'engagement puis le regroupement des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ induit une signalisation « *outside-in* » (**Figure 9**). Celle-ci est initiée par des tyrosine kinases de la famille Src (c-Src et Fyn), qui sont constitutivement liées au domaine intracellulaire de la chaîne β_3 , et activées par autophosphorylation après liaison du fibrinogène (**Watson et al., 2005**). Deux grandes cascades de signalisation ont été décrites. La première implique la phosphorylation de la kinase Syk par c-Src, ce qui conduit à l'activation de la PLC γ 2 et de Rap1b via la formation d'un complexe multimoléculaire faisant notamment intervenir SLP-76 et les PI3K p110 β et δ (**Watson et al., 2005; Zhang et al., 2011**). La seconde voie est déclenchée par Fyn, qui phosphoryle les résidus Tyr⁷⁴⁷ et Tyr⁷⁵⁹ de la chaîne β_3 , permettant le recrutement et la phosphorylation de multiples protéines incluant (i) la myosine, (ii) les adaptateurs Shc (*Src homology domain-containing protein*), Dok2 (*Docking protein 2*) et Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), qui activent des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (**Phillips et al., 2001**), et (iii) la *focal adhesion kinase* (FAK), qui recrute et stimule la PI3K p110 β (**Gratacap et al., 2011; Guinebault et al., 1995**). Ces signaux renforcent l'état d'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ et entraînent la sécrétion des granules, la synthèse de TxA₂ et des réarrangements du cytosquelette à l'origine de l'étalement des plaquettes et la rétraction du caillot (**Phillips et al., 2001**). La signalisation déclenchée par $\alpha_{IIb}\beta_3$ est importante pour la stabilisation des agrégats et joue un rôle critique en hémostasie et thrombose (**Goschnick et al., 2006; Law et al., 1999; Takizawa et al., 2010; Valiyaveetil et al., 2007**).

L'importance physiologique d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ est attestée par une maladie hémorragique, la thrombasthénie de Glanzmann, qui résulte de l'absence ou la non-fonctionnalité de ce récepteur et se caractérise par l'incapacité des plaquettes à agréger (**Nurden, 2006**). De plus, l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ est la cible d'une classe de médicaments anti-thrombotiques très efficaces, qui sont utilisés principalement en situation aiguë, par exemple lors d'un infarctus du myocarde (voir section 5.2.2.2.) (**Yousuf and Bhatt, 2011**).

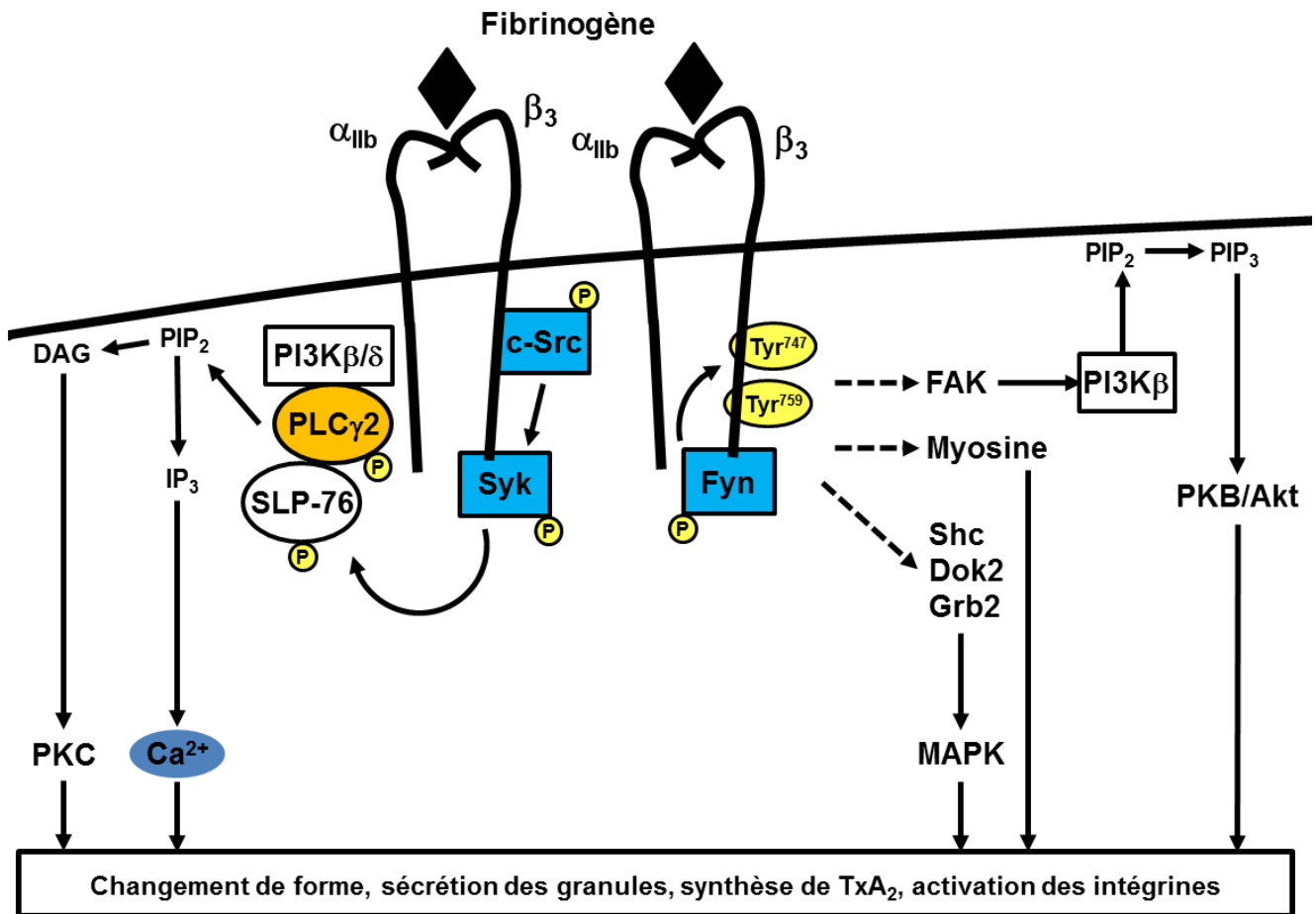


Figure 9 : Schématisation de la signalisation déclenchée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. DAG, diacylglycérol ; Dok2, *docking protein 2* ; FAK, *focal adhesion kinase* ; Grb2, *growth factor receptor-bound protein 2* ; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate ; MAPK, *mitogen-activated protein kinases* ; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PIP₃, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate ; SLP-76, *Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa* ; Syk, *spleen tyrosine kinase*.

b) $\alpha_V\beta_3$

L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ est ubiquitaire et exprimée notamment sur les plaquettes, les cellules endothéliales et les CML (**Kasirer-Friede et al., 2007**). Ce récepteur présente une structure similaire à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et reconnaît les sites RGD du FW, du fibrinogène, de la fibronectine et de la vitronectine, cette dernière étant son ligand privilégié. Il a été montré qu'à l'état activé, l' $\alpha_V\beta_3$ participe à l'adhérence plaquettaire sur une surface de vitronectine (**Paul et al., 2003**) ou de fibronectine (**McCarty et al., 2004**). Son rôle en hémostase et en thrombose reste inconnu, mais pourrait être modeste au vu de son très faible niveau d'expression (100 à 500 copies/plaquette) (**Kasirer-Friede et al., 2007**).

2.1.3.4. Les intégrines β_1

Les intégrines de la famille β_1 sont des récepteurs ubiquitaires, particulièrement abondants à la surface des lymphocytes, des cellules endothéliales et des CML. Les plaquettes expriment entre 2 000 et 4 000 copies des sous-types $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$, dont les ligands privilégiés sont respectivement le collagène, la fibronectine et la laminine (**Bergmeier and Hynes, 2012**).

a) $\alpha_2\beta_1$

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est le premier récepteur plaquettaire du collagène à avoir été identifié (**Varga-Szabo et al., 2008**). En raison d'un polymorphisme génétique fréquent, son niveau d'expression oscille entre 2 000 et 8 000 copies par plaquette (**Di Paola et al., 2005; Kunicki, 2001**). L' $\alpha_2\beta_1$ est considérée comme le principal récepteur responsable de l'adhérence stable des plaquettes au collagène (**Sarratt et al., 2005; Savage et al., 1998**). L'augmentation de l'affinité de l'intégrine par des signaux « *inside-out* » renforce ce processus (voir section 2.1.3.2.) (**Varga-Szabo et al., 2008**).

Un peptide sélectif d' $\alpha_2\beta_1$, GFOGER, a permis de mettre en évidence que cette intégrine est également capable de déclencher une signalisation « *outside-in* » (**Inoue et al., 2003**). Cette dernière présente des similitudes avec celles de GPVI et $\alpha_{IIb}\beta_3$, faisant successivement intervenir des Src kinases, la kinase Syk, la protéine adaptatrice SLP-76, la

PLC γ 2 et menant à la mobilisation des stocks internes de Ca²⁺ (**Inoue et al., 2003**). L'augmentation du Ca²⁺ cytosolique est amplifiée par une seconde voie impliquant la FAK, qui inhibe la pompe calcique de la membrane plasmique, PMCA (*Plasma membrane Ca²⁺ ATPase*). Ces signaux aboutissent au changement de forme des plaquettes qui passent d'une forme discoïde à sphérique avec émission de filopodes, avant de former des lamellipodes et de s'étaler (**Inoue et al., 2003**). Récemment, il a aussi été montré qu' $\alpha_2\beta_1$ stimule Rap1b via la PI3K p110 β (**Consonni et al., 2012**).

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ semble jouer un rôle modeste en hémostase. Deux cas de déficit en $\alpha_2\beta_1$ liés à des syndromes hémorragiques modérés ont été décrits, cependant ces patients présentaient également d'autres défauts plaquettaires ou de coagulation (**Kehrel et al., 1988; Nieuwenhuis et al., 1985**). De plus, les saignements étaient en partie hormono-dépendants car ils disparurent à la ménopause (**Kehrel et al., 1988; Nieuwenhuis et al., 1985**). Deux lignées de souris déficientes pour le gène de l'intégrine α_2 ont été générées (**Chen et al., 2002b; Holtkotter et al., 2002**). Le temps de saignement est normal pour l'une (**Holtkotter et al., 2002**) et significativement prolongé pour l'autre (**Sarratt et al., 2005**). Ces animaux ont permis d'identifier un rôle d' $\alpha_2\beta_1$ en thrombose artérielle. De manière surprenante, cette intégrine interviendrait dans la stabilité du thrombus plutôt que dans les étapes initiales de croissance de l'agrégat (**He et al., 2003; Kuijpers et al., 2007**). Par ailleurs, les polymorphismes à l'origine d'une élévation du niveau d'expression d' $\alpha_2\beta_1$ augmentent l'adhérence plaquettaire *in vitro* (**Kritzik et al., 1998**) et pourraient constituer des facteurs de risque thrombotiques (**Kunicki, 2001**).

b) $\alpha_5\beta_1$

L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ reconnaît les fibronectines, qu'elle lie par l'intermédiaire de leur séquence RGD (**Kasirer-Friede et al., 2007**). Ce récepteur ubiquitaire joue un rôle important dans la migration et la différenciation cellulaires, particulièrement au cours du développement. Chez la souris, l'absence d' $\alpha_5\beta_1$ conduit au décès au stade embryonnaire suite à des défauts dans la mise en place du mésoderme (**Yang et al., 1993**). Concernant les plaquettes, des expériences de perfusion de sang ont montré qu' $\alpha_5\beta_1$ permet une adhérence modeste sur une surface de fibronectine (**Beumer et al., 1994; Zaidi et al., 1996**), et ne mène pas à une forte activation (**McCarty et al., 2004**). L'importance de ce récepteur en hémostase et thrombose

est inconnue et son évaluation conditionnée au développement d'une lignée de souris n'exprimant pas l'intégrine α_5 spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire.

c) $\alpha_6\beta_1$

L'intégrine $\alpha_6\beta_1$ s'associe aux laminines, qui sont des constituants majeurs des membranes basales (voir section 3.3.3.1.) (**Hallmann et al., 2005**). Ce récepteur est ubiquitaire et joue un rôle majeur dans la structuration des épithéliums. Les patients ayant une sous-unité α_6 anormale souffrent d'épidermolyse bulleuse, une maladie rare très douloureuse caractérisée par une fragilité de l'épiderme, qui se décolle pour former des bulles (**Hogg and Bates, 2000**). Cette pathologie a été reproduite chez la souris par invalidation du gène codant pour α_6 (**Georges-Labouesse et al., 1996**). De plus, ces animaux présentent des anomalies cérébrales et décèdent dans la période néonatale (**Georges-Labouesse et al., 1998**). $\alpha_6\beta_1$ a aussi la particularité d'être surexprimée dans le cancer du sein (**Wewer et al., 1997**), de la prostate (**Sroka et al., 2010**) et les glioblastomes (**Lathia et al., 2010**), où elle favoriserait la prolifération et la dissémination métastatique des cellules tumorales.

Plusieurs études ont montré qu' $\alpha_6\beta_1$ permet une adhérence efficace des plaquettes sur une matrice de laminine en conditions statique et de flux (**Geberhiwot et al., 1999; Hindriks et al., 1992; Inoue et al., 2006; Nigatu et al., 2006; Sonnenberg et al., 1988**). Cette interaction génère une signalisation « *outside-in* » encore peu caractérisée, qui implique Syk, la PLC γ 2, une ou des PI3K ainsi que la petite protéine G Cdc42, et aboutit à un changement de forme des plaquettes avec émission de filopodes (**Chang et al., 2005; Ill et al., 1984; Inoue et al., 2006**). En outre, $\alpha_6\beta_1$ faciliterait la liaison de la laminine à la GPVI, responsable de l'étalement des plaquettes (**Inoue et al., 2006**). A ce jour, l'importance de cette intégrine en hémostase et en thrombose n'est pas connue.

2.2. Principaux récepteurs des activateurs solubles

2.2.1. Les récepteurs des nucléotides adényliques

L'ADP et l'ATP sont présents en fortes concentrations (~650 et 440 mM, respectivement) dans les granules denses (**Boneu and Cazenave, 1997**). Ils sont sécrétés lors de l'activation plaquettaire, qu'ils amplifient par l'intermédiaire des récepteurs purinergiques P2Y₁, P2Y₁₂ et P2X₁ (**Hechler and Gachet, 2011b**). P2Y₁ et P2Y₁₂ sont des RCPG activés par l'ADP, alors que P2X₁ est un récepteur canal stimulé par l'ATP.

2.2.1.1. Le récepteur P2Y₁

De nombreux tissus expriment le récepteur P2Y₁ dont le cœur, la paroi des vaisseaux sanguins, le système nerveux et les organes reproducteurs (**Hechler and Gachet, 2011b**). Sur les plaquettes, il est présent à raison d'environ 150 copies et joue un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse à l'ADP. P2Y₁ est couplé à une protéine G_q, responsable de l'activation de la PLC β et l'élévation du Ca²⁺ cytosolique (**Figure 10**). Ceci induit un changement de forme ainsi qu'une agrégation faible et transitoire des plaquettes (**Hechler and Gachet, 2011b**). P2Y₁ participe également à l'activité pro-coagulante des plaquettes (**Leon et al., 2004; Leon et al., 2003**) et à leur activation par le collagène (**Fabre et al., 1999; Leon et al., 2001; Mangin et al., 2004**). Chez la souris, l'absence de P2Y₁ ou son inhibition par des dérivés de l'adénosine comme le MRS2179 et le MRS2500 affecte peu le temps de saignement mais protège contre la thrombose artérielle dans des modèles variés (**Erhardt et al., 2006; Fabre et al., 1999; Hechler et al., 2006; Lenain et al., 2003; Leon et al., 2001; Leon et al., 1999**).

2.2.1.2. Le récepteur P2Y₁₂

L'expression de P2Y₁₂ est restreinte aux plaquettes, à certains leucocytes ainsi qu'aux CML et aux cellules microgliales (**Gachet, 2012**). Les plaquettes possèdent environ 425

exemplaires de ce récepteur à l'ADP, qui est couplé à une protéine de la famille Gi (**Figure 10**) (**Ohlmann et al., 2012**). Cette dernière active les PI3K p110 β et γ (**Gratacap et al., 2011**) et inhibe l'adénylate cyclase (AC), qui produit de l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPC) stimulant les protéine kinases A (PKA) (**Hechler and Gachet, 2011b**). P2Y₁₂ empêche la phosphorylation de la protéine VASP (*Vasodilator-stimulated phosphoprotein*) par les PKA (**Schwarz et al., 2001**), et induit la stimulation des PKC (**Guidetti et al., 2008**) et de Rap1b (**Lova et al., 2003; Woulfe et al., 2002**), menant à l'activation des intégrines et l'exposition des phospholipides pro-coagulants (**Hechler and Gachet, 2011b; Leon et al., 2003**).

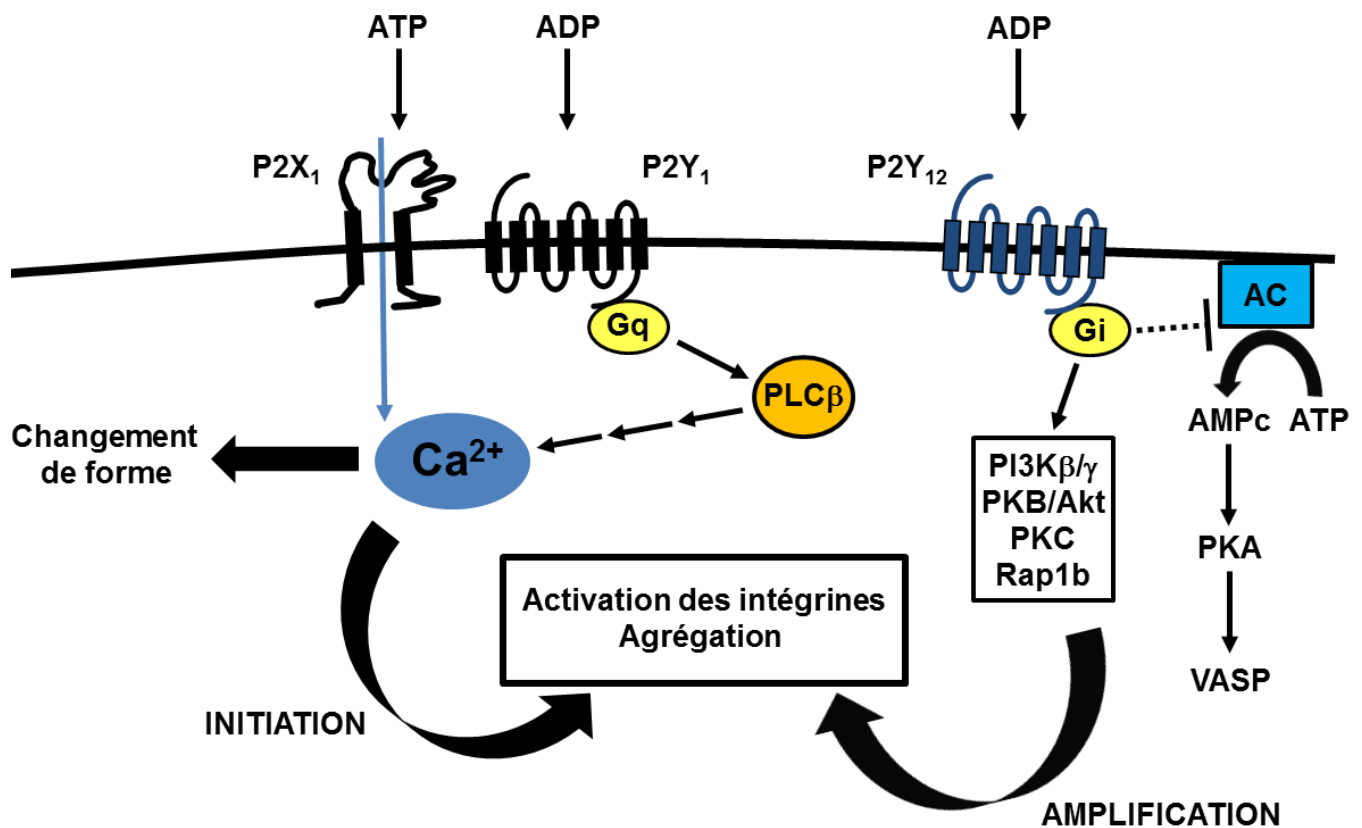


Figure 10 : Schématisation de la signalisation déclenchée par les récepteurs P2. AC, adénylate cyclase ; AMPc, adénosine 3',5'-monophosphate cyclique ; PKA, protéine kinase A ; VASP, *vasodilator-stimulated phosphoprotein*.

P2Y₁₂ joue un rôle critique dans l'amplification de l'agrégation initiée par P2Y₁ ou par les récepteurs à de nombreux activateurs tels que le TxA₂, la thrombine et le collagène **(Hechler and Gachet, 2011b)**. L'importance de P2Y₁₂ en hémostase est attestée par les syndromes hémorragiques dont souffrent les patients chez lesquels il est absent ou non-fonctionnel **(Cattaneo, 2011)**. De plus, les antagonistes de P2Y₁₂ comme le clopidogrel et les dérivés de l'ATP de type AR-C inhibent efficacement la thrombose chez la souris **(Eckly et al., 2011; Gachet, 2006; Nonne et al., 2005)**, le chien **(Yao et al., 1992)** ou encore le singe **(Yao et al., 1993)**. Chez l'homme, le clopidogrel est couramment utilisé dans le traitement et la prévention de la thrombose artérielle (voir section 5.2.2.3.) **(Yousuf and Bhatt, 2011)**.

2.2.1.3. Le récepteur P2X₁

Outre les plaquettes, qui en contiennent une centaine de copies **(MacKenzie et al., 1996)**, P2X₁ est présent dans de nombreux tissus incluant la paroi des vaisseaux sanguins, le système nerveux et l'appareil uro-génital **(Ralevic and Burnstock, 1998)**. Ce récepteur canal de l'ATP est responsable d'un influx rapide de Ca²⁺ et de Na⁺ extracellulaires causant notamment une dépolarisation membranaire **(Figure 10) (Mahaut-Smith et al., 2011)**. Ces réponses sont cependant transitoires car P2X₁ est très rapidement désensibilisé (voir section 2.3.). Concernant les plaquettes, la stimulation de P2X₁ entraîne un changement de forme mais n'est pas capable d'induire l'agrégation **(Mahaut-Smith et al., 2011)**. En revanche, P2X₁ amplifie l'agrégation déclenchée par d'autres activateurs comme le collagène ou la thrombine. Ce rôle de P2X₁ est particulièrement important dans des conditions où les contraintes de cisaillement sont élevées **(Gachet, 2006; Mahaut-Smith et al., 2011)**. Les souris déficientes pour le gène de P2X₁ ou traitées avec un antagoniste de ce récepteur ont un temps de saignement inchangé mais sont résistantes à la thrombose artérielle dans plusieurs modèles **(Erhardt et al., 2006; Hechler et al., 2003; Hechler et al., 2005)**. Par ailleurs, la surexpression de P2X₁ sur les plaquettes de souris transgéniques induit un phénotype prothrombotique **(Oury et al., 2003)**.

2.2.2. Les récepteurs des prostanoides

L'activation des plaquettes par le collagène ou la thrombine, mais pas l'ADP (**Cattaneo et al., 2002**), stimule les phospholipases A₂ (PLA₂), qui libèrent de l'acide arachidonique à partir des glycérophospholipides membranaires (**Landry and Gies, 2006**). Cet acide gras polyinsaturé active des PLC γ et est oxydé en plusieurs modulateurs des fonctions plaquettaires, les prostanoides (**Figure 11**). L'oxydation spontanée de l'acide arachidonique produit des isoprostanes (**Ting and Khasawneh, 2010**), alors que sa métabolisation par la COX-1 génère de la prostaglandine G₂ (PGG₂) puis de la prostaglandine H₂ (PGH₂) (**Landry and Gies, 2006**). Enfin, la thromboxane synthétase convertit la PGH₂ en TxA₂. Liposolubles, les isoprostanes et le TxA₂ diffusent rapidement hors des plaquettes, dont ils amplifient fortement l'activation via leur liaison aux RCPG de type TP (*Thromboxane/prostaglandin*) (**Giannarelli et al., 2010**).

Les récepteurs TP sont exprimés dans de nombreux tissus et organes, incluant la paroi des vaisseaux sanguins, le thymus, le rein, la rate et le placenta (**Nurden et al., 2003**). Il existe deux isoformes, α et β , issues du même gène par épissage alternatif et différant par leur distribution et leur signalisation (**Giannarelli et al., 2010**). La forme α prédomine dans les plaquettes, qui en possèdent environ 1 500 copies (**Nurden et al., 2003**). TP α est couplé à des protéines des familles Gq et G12, menant à la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire et à l'activation des PKC, des PI3K p110 β et γ , et de petites protéines G des types Rho et Ras (**Figure 12**) (**Giannarelli et al., 2010; Gratacap et al., 2011; Shock et al., 1997**). Ceci aboutit à la sécrétion des granules, au changement de forme des plaquettes et à leur agrégation irréversible. Les isoprostanes et le TxA₂ sont de puissants agonistes des récepteurs TP ; cependant, contrairement aux isoprostanes (demi-vie de 5 à 10 min), le TxA₂ est une molécule instable (demi-vie de 20 à 30 s), de durée d'action très courte (**Ting and Khasawneh, 2010**).

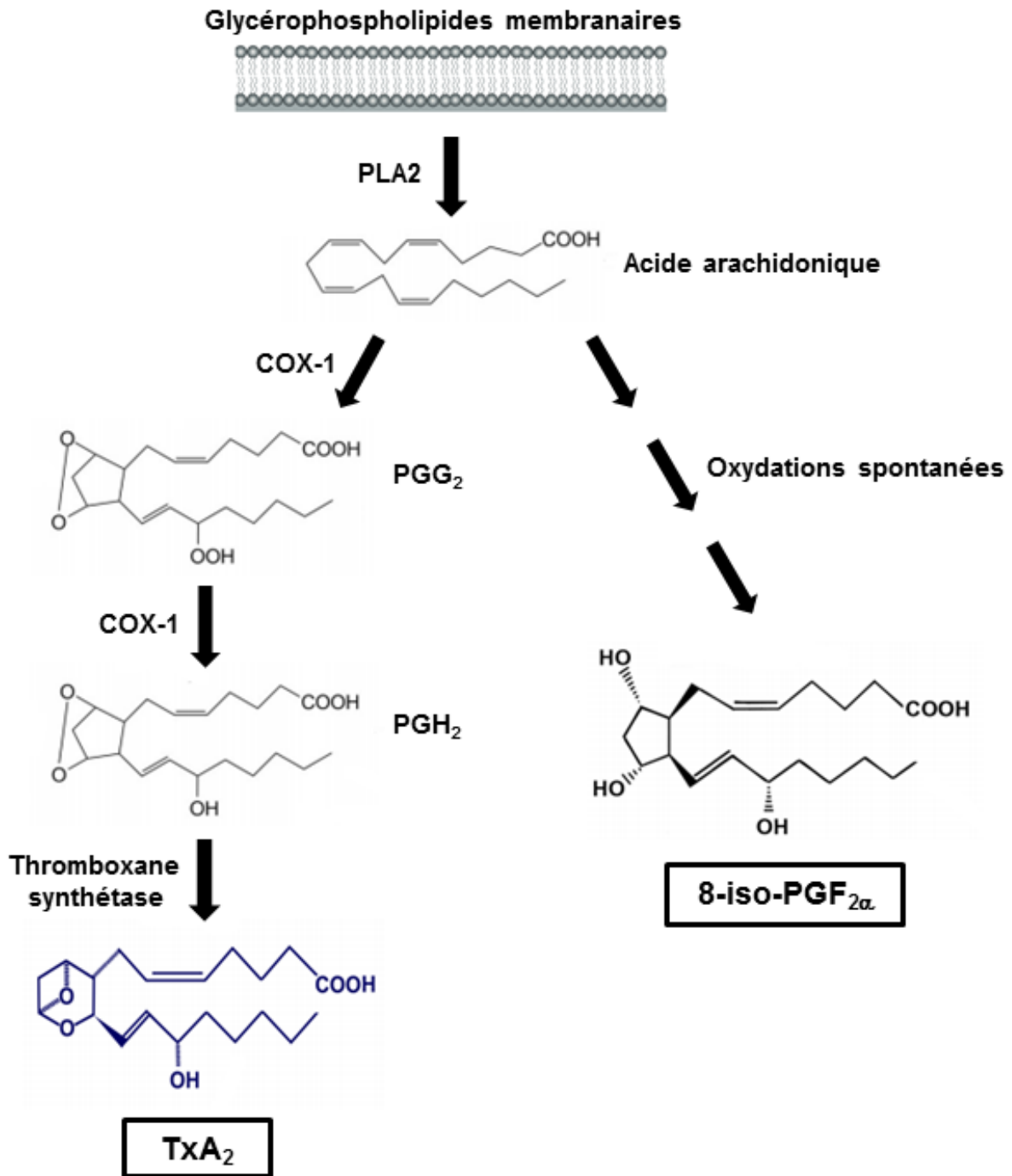


Figure 11 : Schématisation des grandes étapes de la biosynthèse des prostanoides dans les plaquettes. La COX-1 oxyde l'acide arachidonique en PGG₂, qui est réduite en PGH₂. La PGH₂ est ensuite convertie en TxA₂ par la thromboxane synthétase. L'acide arachidonique peut aussi s'oxyder spontanément en isoprostanes, qui sont des isomères des prostaglandines. Des soixante-quatre isoprostanes pouvant être générées, la 8-iso-PGF_{2α} est la plus abondante. COX-1, cyclo-oxygénase-1 ; 8-iso-PGF_{2α}, 8-iso-prostaglandine F_{2α} ; PGG₂, prostaglandine G₂ ; PGH₂, prostaglandine H₂ ; TxA₂, thromboxane A₂ (Adapté de Ting and Khasawneh, 2010).

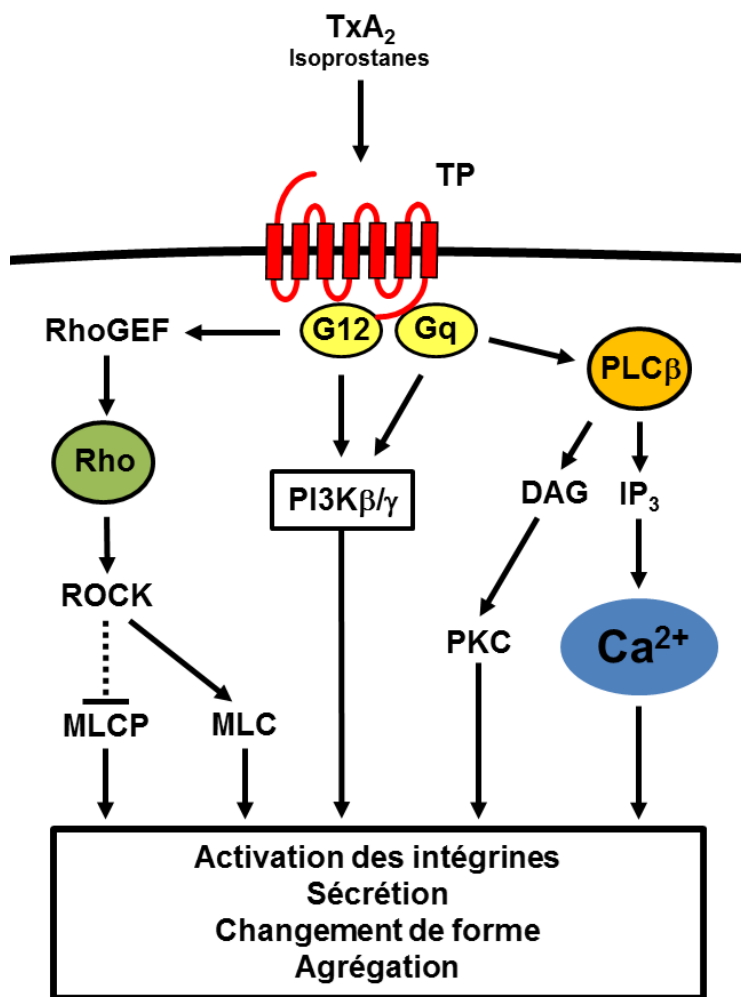


Figure 12 : Schématisation de la signalisation déclenchée par les récepteurs TP. DAG, diacylglycérol ; GEF, *guanine nucleotide exchange factor* ; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate ; MLC, *myosin light chain* ; MLCP, *myosin light chain phosphatase* ; ROCK, *Rho-associated protein kinase*.

Au début des années 1980, l'identification de défauts dans la voie du TxA₂ chez des patients souffrant de syndromes hémorragiques a révélé l'importance de ce médiateur dans l'hémostase (Defreyn et al., 1981; Lages et al., 1981; Samama et al., 1981; Wu et al., 1981). Ceci a été confirmé par l'étude des souris déficientes pour la COX-1 (Cathcart et al., 2008), la thromboxane synthétase (Yu et al., 2004) ou les récepteurs TP (Thomas et al., 1998), qui présentent toutes une augmentation du temps de saignement. De plus, la COX-1 est la cible de l'aspirine, un médicament anti-thrombotique de référence (voir section 5.2.2.1.) (Yousuf and Bhatt, 2011). Chez l'animal, des antagonistes des récepteurs TP sont plus efficaces que l'aspirine pour réduire la thrombose artérielle, suggérant qu'à la fois le TxA₂ et des isoprostanes peuvent jouer un rôle dans ce processus (Hong et al., 2006; Osende et al., 2004; Vilahur et al., 2007).

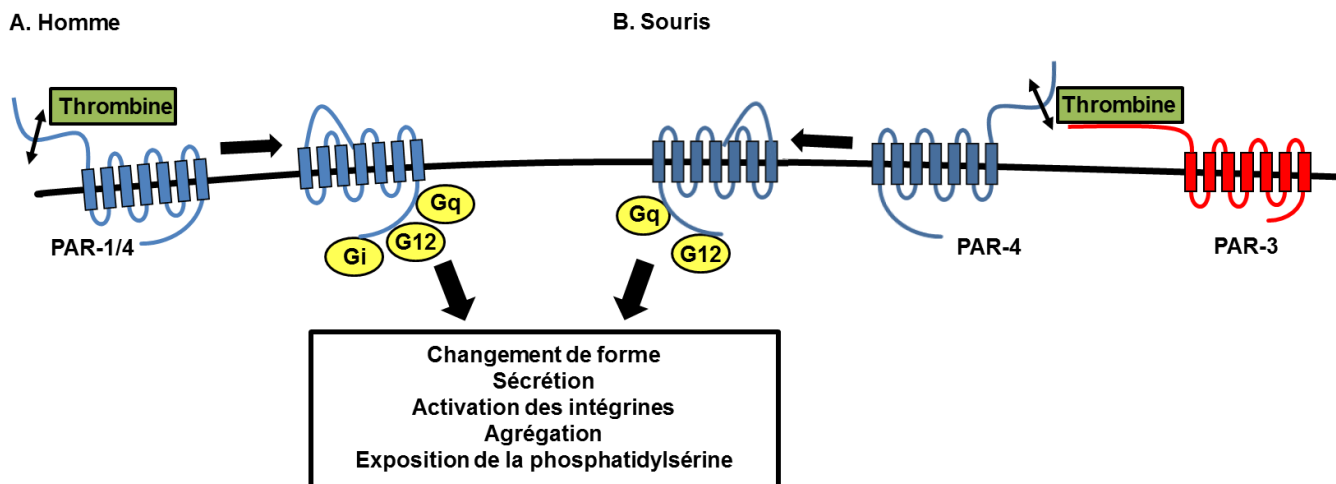


Figure 13 : Schématisation de l'activation des récepteurs PAR.

2.2.3. Les récepteurs de la thrombine

La thrombine est l'enzyme centrale de la coagulation et également un puissant activateur plaquettaire via sa liaison aux RCPG de la famille PAR (*Protease-activated receptor*). Les plaquettes humaines et de primates non humains expriment les sous-types PAR-1 et -4, alors que les plaquettes de souris expriment PAR-3 et -4 (Coughlin, 2005). En plus des plaquettes, les PAR sont présents sur les cellules endothéliales et les CML, dont ils stimulent la prolifération et l'activité de sécrétion (Leger et al., 2006).

Les plaquettes possèdent 1 500 à 2 000 copies de chaque PAR (Molino et al., 1997). PAR-1 est un récepteur de forte affinité, qui induit l'activation plaquettaire en réponse aux faibles concentrations de thrombine, tandis que PAR-4 y contribue seulement aux fortes concentrations (Coughlin, 2005). PAR-3 fonctionne comme un corécepteur, qui facilite l'activation de PAR-4 en augmentant la concentration locale de thrombine. La thrombine possède un mode d'action particulier : en clivant l'extrémité N-terminale extracellulaire de PAR-1 et -4, elle démasque des sites au niveau de la nouvelle extrémité, qui se replie et joue le rôle d'auto-agoniste (Figure 13) (Coughlin, 2005). Expérimentalement, les PAR peuvent être activés indépendamment de toute activité protéolytique par des peptides synthétiques mimant leur séquence cryptique (Faruqi et al., 2000). PAR-1 et -4 sont couplés à des protéines des familles Gq et G12, qui activent la PLC β , la PI3K p110 β et des petites protéines G de type Rho et Ras (Figure 13) (Angiolillo et al., 2010; Coughlin, 2005; Gratacap et al., 2011; Shock et al., 1997). PAR-1 est aussi couplé à une protéine Gi inhibant l'adénylate

cyclase (**Angiolillo et al., 2010**). Cette signalisation complexe explique les nombreux effets de la thrombine : contraction et changement de forme des plaquettes, sécrétion du contenu des granules, synthèse de TxA_2 , activation des intégrines et exposition des phospholipides pro-coagulants (**Angiolillo et al., 2010; Coughlin, 2005**). Les PAR ne peuvent être activés qu'une seule fois, après quoi ils sont rapidement endocytés puis dégradés dans les lysosomes (**Coughlin, 2005**).

Les souris déficientes pour le gène de PAR-3 ou -4 présentent une augmentation marquée du temps de saignement et sont protégées contre la thrombose artérielle dans plusieurs modèles (**Hamilton et al., 2004; Lee et al., 2012; Sambrano et al., 2001; Vandendries et al., 2007; Weiss et al., 2002**). Des greffes réciproques de moelle osseuse entre souris sauvages et PAR-4^{-/-} ont montré que ces défauts sont d'origine plaquettaire et ne proviennent pas d'altérations de la paroi vasculaire (**Hamilton et al., 2004**). L'inhibition de PAR-1 chez des primates non humains a mis en évidence que ce récepteur joue un rôle critique en thrombose artérielle (**Chintala et al., 2008; Chintala et al., 2010; Cook et al., 1995; Derian et al., 2003**). En revanche, son rôle est mineur en hémostase, ce qui pourrait être lié au fait que PAR-4 est toujours fonctionnel (**Chintala et al., 2008; Cook et al., 1995; Derian et al., 2003**).

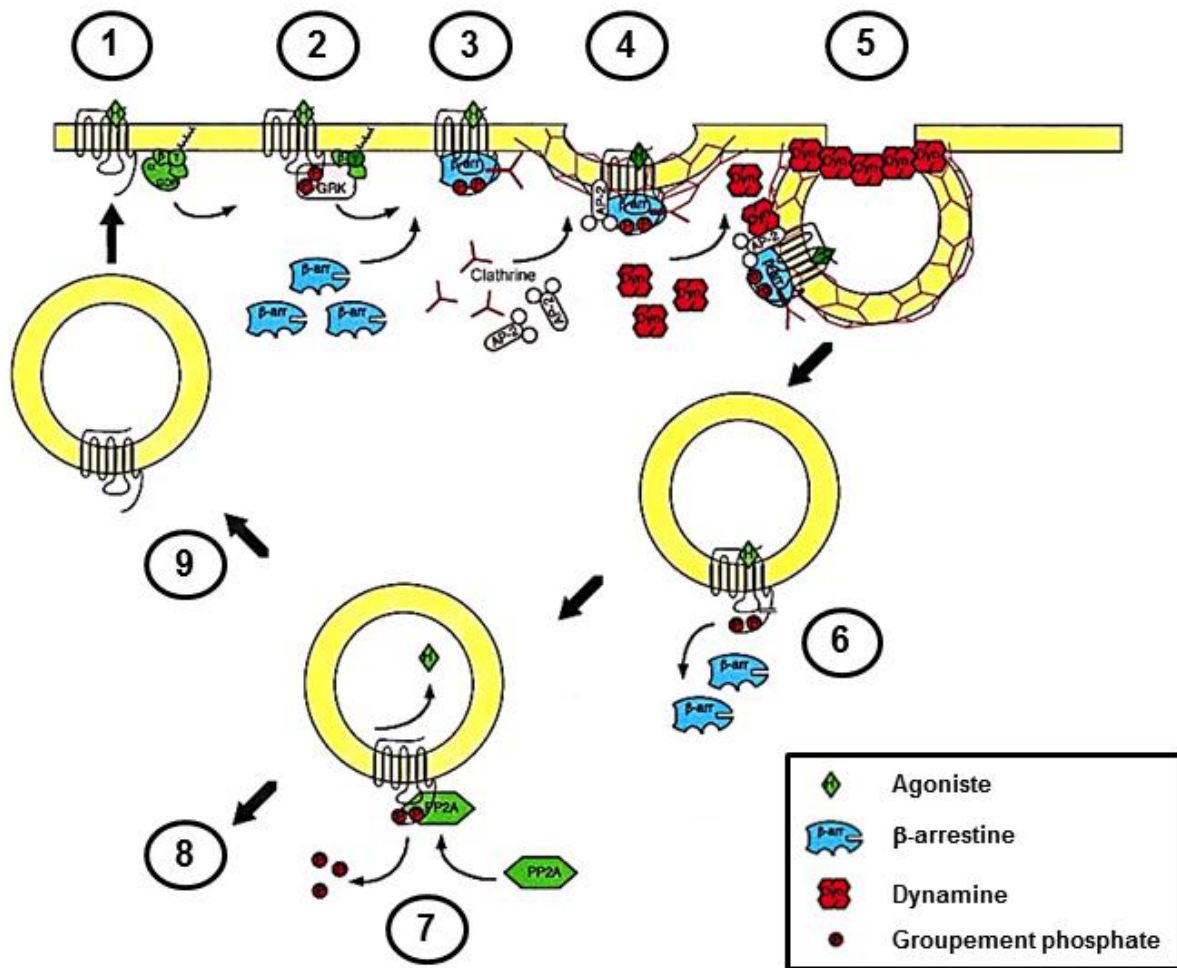


Figure 14 : Schématisation des grandes étapes de la désensibilisation des RCPG. 1) liaison d'un agoniste (H) au récepteur et stimulation de la protéine G ; 2) phosphorylation du récepteur par une GRK ; 3) liaison d'une β-arrestine (β-arr) et découplage du récepteur de la protéine G ; 4) formation d'un puits recouvert de clathrine ; 5) endocytose ; 6) dissociation de la β-arrestine ; 7) dissociation du ligand et déphosphorylation du récepteur ; 8) fusion de la vésicule avec les lysosomes et dégradation du récepteur ; 9) recyclage du récepteur à la membrane. AP-2, *clathrin adaptor protein-2* ; Dyn, dynamine ; PP2A, *protein phosphatase 2A* ; GRK, *G protein-coupled receptor kinase* (Adapté de Luttrell and Lefkowitz, 2002).

2.3. Régulation des récepteurs par désensibilisation

2.3.1. La désensibilisation

La désensibilisation se définit comme une diminution voire une absence de la réponse d'un récepteur suite à l'application continue ou répétée d'un agoniste (**Landry and Gies, 2006**). Elle traduit un découplage entre le récepteur et ses effecteurs intracellulaires, permettant d'éviter les effets potentiellement néfastes de leur stimulation prolongée. Bien qu'étant un phénomène général, la désensibilisation met en jeu différents mécanismes et acteurs en fonction du type de récepteur.

Dans la plaquette, plusieurs RCPG sont connus pour être rapidement désensibilisés une fois stimulés, en particulier P2Y₁ (**Baurand et al., 2000; Baurand et al., 2005; Hardy et al., 2005**), TP α (**Murray and FitzGerald, 1989; Okwu et al., 1992**) et les PAR (**Coughlin, 2005**). Alors que certaines études ont montré que P2Y₁₂ ne se désensibilise pas (**Baurand et al., 2000; Baurand et al., 2005**), d'autres travaux indiquent l'inverse (**Hardy et al., 2005; Mundell et al., 2008**). La désensibilisation des RCPG est un processus complexe, auquel participent de nombreuses protéines cytosoliques. Séquentiellement, on observe 1) la phosphorylation de résidus sérine et thréonine de l'extrémité C-terminale intracellulaire du récepteur par des *G protein-coupled receptor kinases* (GRK), des PKA ou des PKC ; 2) la reconnaissance des sites phosphorylés par une protéine de la famille des arrestines, qui empêche de manière stérique la liaison de la protéine G au récepteur ; 3) le recrutement par l'arrestine de plusieurs autres protéines comme la clathrine et la *clathrin adaptor protein-2* (AP-2), induisant la formation de puits recouverts puis l'endocytose du récepteur ; 4) la déphosphorylation du récepteur suivi de son recyclage à la membrane, ou la fusion des vésicules d'endocytose avec les lysosomes dont les enzymes dégradent le récepteur (**Figure 14**) (**Ferguson, 2001; Landry and Gies, 2006; Luttrell and Lefkowitz, 2002**).

2.3.2. Les arrestines

Les arrestines forment une famille de protéines cytosoliques composée de quatre membres. Les arrestines-1 et -4 ont une expression limitée respectivement aux bâtonnets et aux cônes de la rétine, alors que les arrestines-2 et -3, plus connues sous le nom de β -arr1 et β -arr2, sont ubiquitaires (DeWire et al., 2007; Ferguson, 2001). Les arrestines sont des protéines adaptatrices formées d'une seule chaîne polypeptidique comportant deux régions régulatrices (R1 et R2), qui interviennent dans leur stabilité, et trois domaines fonctionnels (A, P et B) interagissant avec des protéines variées (Figure 15) (Ferguson, 2001; Luttrell and Lefkowitz, 2002).

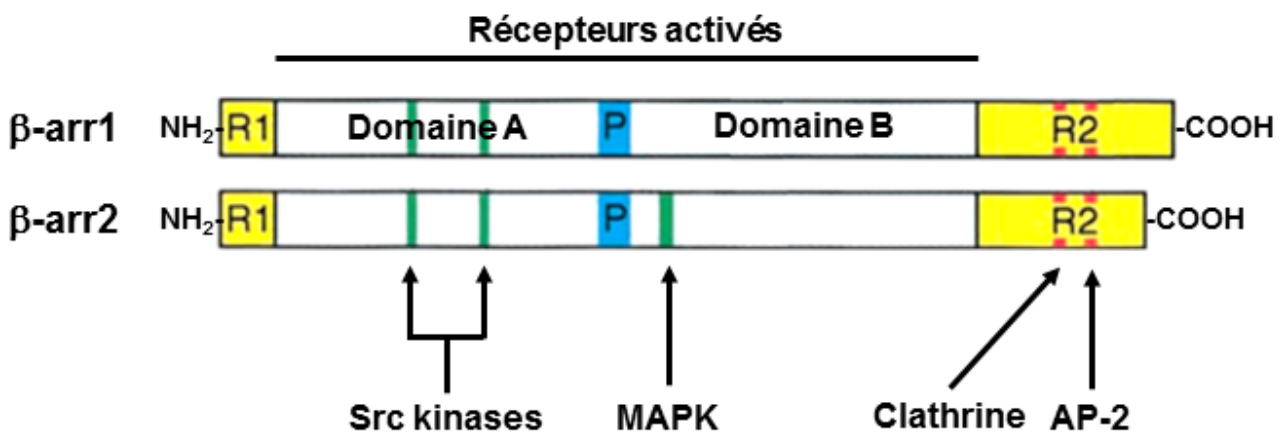


Figure 15 : Schématisation de la structure de β -arr1 et β -arr2 montrant les différents domaines et leurs principaux ligands. Les β -arrestines comportent trois domaines fonctionnels (A, B et P), qui interagissent avec des récepteurs activés et des protéines de signalisation de la famille des Src et des MAP kinases. Les deux régions régulatrices (R1 et R2) interviennent dans la stabilité des β -arrestines et leur liaison aux protéines de la machinerie d'endocytose. MAPK, *mitogen-activated protein kinases*, AP-2, *clathrin adaptor protein-2* (Adapté de Ferguson, 2001; Luttrell and Lefkowitz, 2002).

Les β -arrestines jouent un rôle majeur dans la désensibilisation de nombreux RCPG, notamment ceux de l'adrénaline, de la dopamine et des opioïdes (**Schmid and Bohn, 2009**). Concernant P2Y₁ et P2Y₁₂, des études dans des lignées cellulaires transfectées ont montré qu'à la fois β -arr1 et β -arr2 sont capables de s'associer à ces récepteurs, suggérant qu'elles induisent leur désensibilisation (**Hoffmann et al., 2008; Mundell et al., 2006; Reiner et al., 2009; Savi et al., 2006**). Les β -arrestines participent aussi à la désensibilisation d'autres types de récepteurs comme ceux à un domaine transmembranaire de l'IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) (**Lin et al., 1998**) et des LDL (*Low density lipoproteins*) (**Wu et al., 2003**). Enfin, les β -arrestines ont été décrites pour déclencher des cascades de signalisation indépendantes des protéines G. Ces voies impliquent notamment des MAPK, des Src kinases, des PI3K et la protéine kinase B/Akt, et régulent de nombreuses fonctions cellulaires dont l'adhérence, la migration et la prolifération (**DeWire et al., 2007; Luttrell and Lefkowitz, 2002**).

Alors que le rôle des β -arrestines dans les plaquettes restait inconnu au commencement de cette thèse, il a récemment été montré que les souris invalidées pour le gène de β -arr1 sont protégées contre la thrombose artérielle (**Li et al., 2011**). Ce défaut proviendrait au moins en partie d'une diminution de la réponse du récepteur PAR-4 (**Li et al., 2011**).

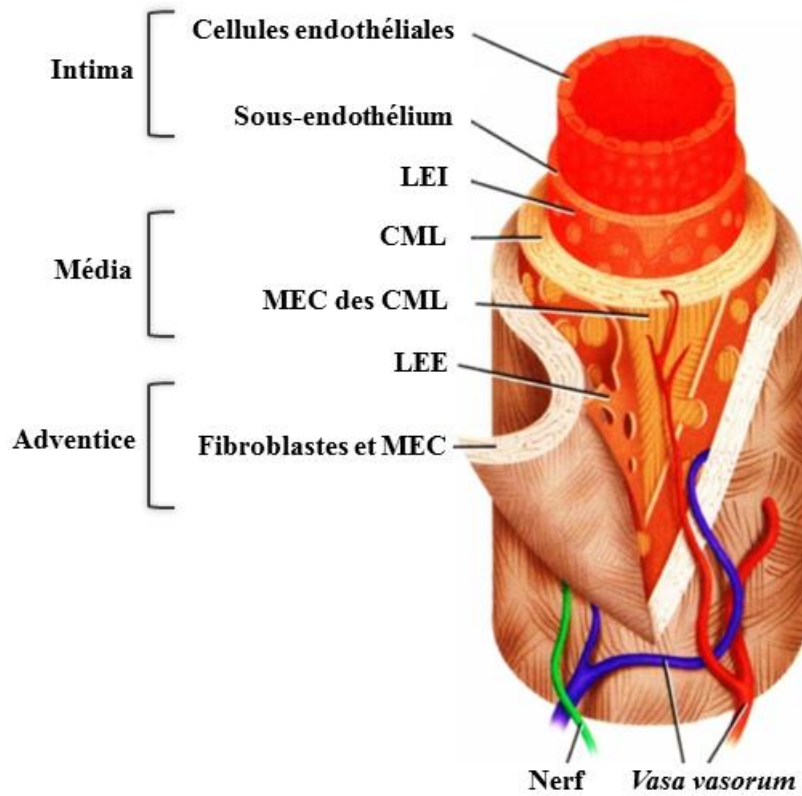


Figure 16 : Structure d'une artère saine. CML, cellules musculaires lisses ; LEE, limitante élastique externe ; LEI, limitante élastique interne ; MEC, matrice extracellulaire (d'après Eroschenko, 2000).

3. Structure, organisation, composition et réactivité hémostatique de l'artère saine

On distingue classiquement trois grands types de vaisseaux sanguins : les artères, les veines et les capillaires, qui présentent des spécialisations à différents niveaux de l'arbre vasculaire. Généralement, les composants primaires (cellules, macromolécules) sont les mêmes, mais leur organisation, leur richesse et leur qualité diffèrent selon la localisation et la fonction du vaisseau (**Toussaint et al., 2003**).

Cette partie a pour but de mettre en valeur la façon dont l'artère saine est structurée pour prévenir et arrêter le saignement. Après quelques notions d'histologie et de physiologie, nous nous focaliserons sur les deux principaux déterminants de la réponse hémostatique : la cellule endothéliale et la matrice extracellulaire (MEC).

3.1. Structure d'une artère

La paroi artérielle est organisée en trois couches ou tuniques concentriques (**Figure 16**) (**Kühnel, 2003; Toussaint et al., 2003**). La plus interne est l'intima, qui se compose d'une monocouche de cellules endothéliales disposées longitudinalement reposant sur une membrane basale et, plus en profondeur, sur un tissu conjonctif appelé sous-endothélium. La tunique médiane ou média comprend des CML orientées circonférentiellement et entourées d'une MEC riche en collagène, fibres élastiques et protéoglycanes. La couche la plus externe, à l'interface avec la graisse péri-artérielle, est l'adventice, constituée de fibres de collagène et élastiques associées à des fibroblastes, des nerfs et des microvaisseaux nourriciers appelés *vasa vasorum*. Les lames élastiques acellulaires fenêtrées qui séparent l'intima de la média et la média de l'adventice sont respectivement la limitante élastique interne (LEI) et externe (LEE) (**Eroschenko, 2000; Kühnel, 2003; Toussaint et al., 2003**).

3.2. Organisation du système artériel

Le système artériel forme un ensemble complexe de propagation du flux sanguin comportant trois principaux niveaux hiérarchiques qui se succèdent depuis la sortie du cœur à l'orifice aortique ou pulmonaire jusqu'aux réseaux capillaires (**Bou-Gharios et al., 2004; Kühnel, 2003; Toussaint et al., 2003**).

Les **artères élastiques** comprennent les gros vaisseaux, de 8 à 25 mm de diamètre, tels que l'aorte et ses branches (tronc brachio-céphalique, carotides communes, sous-clavières). Elles ont une média épaisse, pauvre en CML et riche de plusieurs dizaines de couches de lames élastiques concentriques. Leur élasticité en fait des vaisseaux dits de conductance, qui transforment le débit sanguin intermittent du cœur en flux continu, mais pulsatile.

Se ramifiant à partir des gros troncs précédents, les **artères musculaires**, comme les coronaires, les radiales et les fémorales, se caractérisent par un calibre moyen (2 à 7 mm) et une média composée de nombreux empilements concentriques de CML avec peu de fibres élastiques. Ces artères sont douées de propriétés vasomotrices remarquables leur permettant d'adapter la distribution du sang aux besoins tissulaires.

Ultimes ramifications de la voie artérielle s'ouvrant sur les lits capillaires, les **artérioles** ont un diamètre inférieur à 100 μm et leur média, pauvre en fibres élastiques, comprend une à trois couches de CML. La vasomotricité des artérioles contrôle le débit dans les capillaires et représente le principal déterminant de la résistance périphérique dont dépend la pression artérielle (**Bou-Gharios et al., 2004; Kühnel, 2003; Toussaint et al., 2003**).

3.3. Composition de l'artère saine

La paroi artérielle est composée de cellules endothéliales, de CML et de fibroblastes qui sont entourés par un réseau structuré et complexe de macromolécules, la MEC.

3.3.1. La cellule endothéliale

3.3.1.1. Généralités

Les cellules endothéliales dérivent de l'hémangioblaste, un précurseur mésodermique également à l'origine de la lignée hématopoïétique. Elles constituent l'endothélium, qui est un épithélium simple tapissant la face interne des vaisseaux lymphatiques et des cavités vasculaires : cœur, artères, veines, capillaires (**Kühnel, 2003; Toussaint et al., 2003**). Ce sont des cellules aplaties et polarisées c'est-à-dire ancrées sur une membrane basale et en contact avec le sang circulant au niveau apical. Leur renouvellement est très lent, six mois à un an, sauf au niveau des orifices vasculaires, des courbures et des bifurcations où les conditions hémodynamiques perturbées favorisent leur prolifération et leur apoptose (**Boneu and Cazenave, 1997; Chiu and Chien, 2011**).

Dans les artères, les cellules endothéliales sont unies par des desmosomes, qui assurent leur résistance mécanique, et par des jonctions étanches empêchant la circulation paracellulaire. Ces cellules forment une barrière de perméabilité sélective qui permet et régule les échanges entre le sang et les tissus (**Aird, 2005; Boneu and Cazenave, 1997**). L'endothélium est également le siège d'une activité importante de synthèse et de sécrétion, libérant par exemple du NO, un modulateur majeur du tonus vasculaire (**Aird, 2005; Boneu and Cazenave, 1997**). L'endothélium produit également la plupart des composants de la membrane basale et du sous-endothélium : collagènes, FW, laminines, fibronectines, TSP et certains protéoglycanes comme la décorine, le versican et le biglycan (**Boneu and Cazenave, 1997; Mazzucato et al., 2002; Varga-Szabo et al., 2008**). De plus, les cellules endothéliales contiennent des corps de Weibel-Palade, qui sont des granules de stockage issus de l'appareil de Golgi. L'exocytose de ces corps libère localement des protéines et médiateurs ayant des

fonctions très diverses dans l'hémostase, l'angiogenèse et l'inflammation. L'endothélium n'est donc pas une simple barrière physique, mais une véritable structure fonctionnelle, modulatrice de nombreux processus homéostatiques (Aird, 2005). Dans la suite de ce chapitre, seul le rôle de l'endothélium dans l'hémostase et la thrombose sera abordé.

Les cellules endothéliales synthétisent à la fois des substances pro- et anti-thrombotiques. A l'état normal, la balance est en faveur du versant anti-thrombotique afin de faciliter l'écoulement sanguin : on parle de thromborésistance et de cellule endothéliale au repos ou quiescente. Suite à l'intégration de stimuli physiologiques ou pathologiques, l'endothélium est activé et l'équilibre est inversé en faveur d'un phénotype thrombogène (Figure 17) (Aird, 2005).

3.3.1.2. Propriétés anti-thrombotiques de l'endothélium quiescent

La thromborésistance de la cellule endothéliale quiescente découle de propriétés passives, liées à la nature de sa membrane plasmique, et de processus actifs qui (i) empêchent l'adhérence et l'activation des plaquettes, (ii) relaxent les CML, (iii) inhibent la coagulation, et (iv) favorisent la fibrinolyse (Figure 17A) (Aird, 2005; Boneu and Cazenave, 1997).

L'hémocompatibilité de la membrane plasmique endothéliale est d'abord due à sa charge négative et à l'arrangement des phospholipides et des glycoprotéines, qui ne permettent pas l'interaction avec les plaquettes. D'autre part, l'endothélium exprime des protéines membranaires et sécrète des substances inhibant l'activation plaquettaire et la coagulation. Les ectonucléotidases membranaires CD39 et CD73 hydrolysent les agonistes ADP et ATP, générant de l'adénosine maintenant les plaquettes au repos. Cette action est renforcée par la libération de deux puissants inhibiteurs plaquettaires, le NO et la PGI₂, qui induisent également la relaxation des CML. La coagulation est inhibée par les protéoglycanes à héparane et/ou dermatane sulfate du glycocalyx couvrant la face exoplasmique. Ces protéoglycanes catalysent l'inhibition de la thrombine par l'antithrombine (AT) et le deuxième cofacteur de l'héparine (HCII), et adsorbent l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), favorisant son action. Par ailleurs, la cellule endothéliale exprime la thrombomoduline (TM), une protéine transmembranaire fixant la thrombine. Le complexe obtenu active la protéine C, qui dégrade les facteurs de coagulation Va et VIIIa, inhibant la

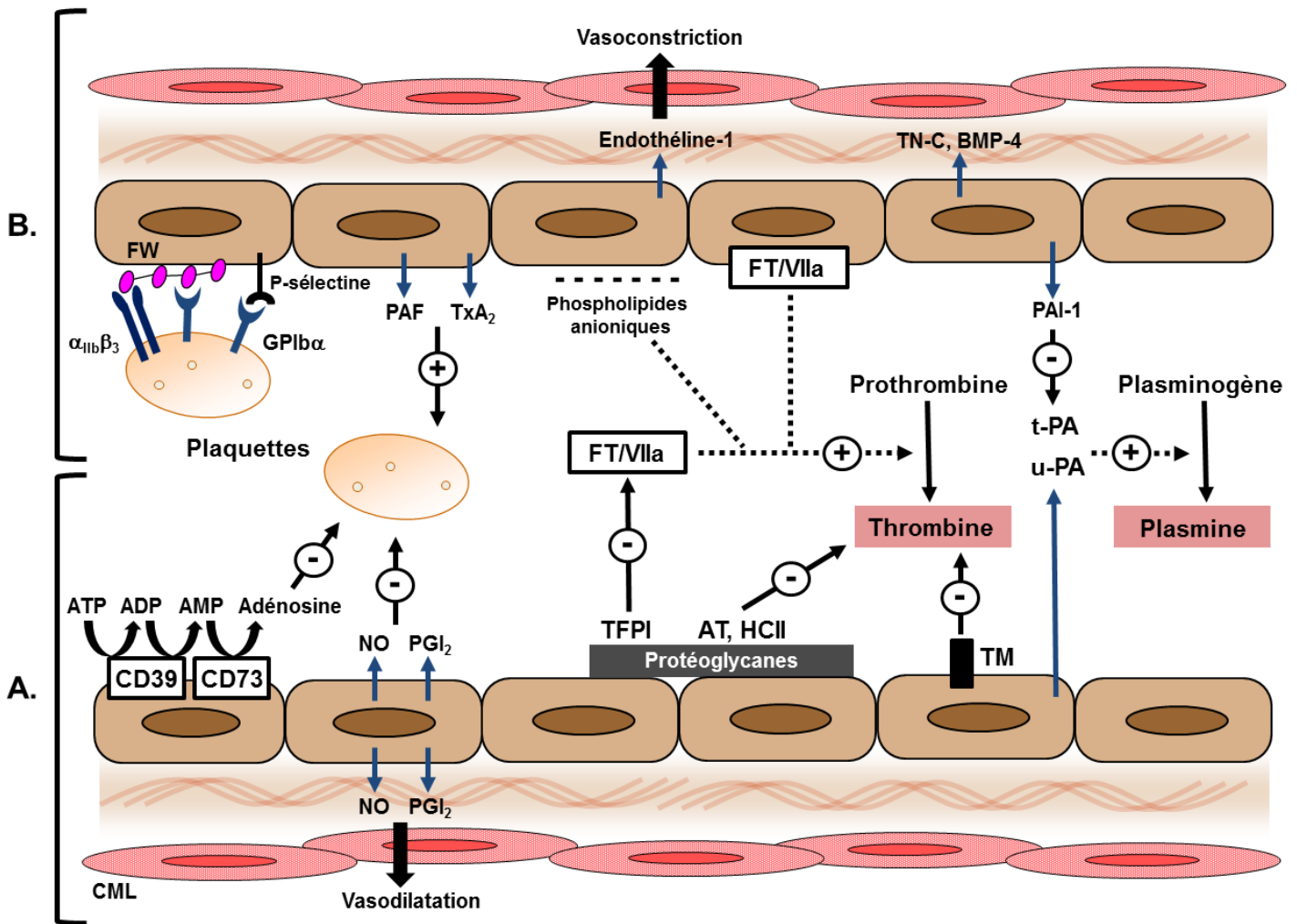


Figure 17 : Propriétés anti-thrombotiques de l'endothélium quiescent (A) et pro-thrombotiques de l'endothélium activé (B). AMP, adénosine 5'-monophosphate ; AT, antithrombine ; BMP-4, *bone morphogenic protein-4* ; CML, cellule musculaire lisse ; FT, facteur tissulaire ; HCII, *heparin cofactor II* ; PAF, *platelet-activating factor* ; PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1* ; TFPI, *tissue factor pathway inhibitor* ; t-PA, *tissue plasminogen activator* ; TM, thrombomoduline. u-PA, *urokinase plasminogen activator*.

génération de thrombine. Enfin, l'endothélium contribue à la fibrinolyse via la sécrétion des activateurs du plasminogène de type tissulaire (t-PA) et urokinase (u-PA), responsables de la conversion du plasminogène en plasmine (Aird, 2005; Boneu and Cazenave, 1997).

3.3.1.3. Propriétés pro-thrombotiques de l'endothélium activé

L'activation de la cellule endothéliale implique une multitude de stimuli physiques (flux sanguins perturbés, radiations) et chimiques tels que l'anoxie et les médiateurs hémostatiques (ADP, ATP, thrombine), inflammatoires (cytokines, endotoxines) et métaboliques (LDL (*Low density lipoproteins*) oxydées). L'activation peut être physiologique, par exemple au cours de l'hémostase, ou pathologique lorsqu'elle est liée à des facteurs tels que le tabagisme, l'hypertension, la dyslipidémie et le diabète (Aird, 2005; Chiu and Chien, 2011; Toussaint et al., 2003).

L'activation n'est pas un processus du type tout ou rien mais comprend un éventail de réponses pro-adhésives, pro-coagulantes et vasoconstrictrices (Figure 17B). La chronicité de l'état stimulé ou dysfonction endothéliale joue un rôle capital dans la pathogenèse de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (voir section 5.1.1.) (Aird, 2005; Toussaint et al., 2003).

La cellule endothéliale activée exprime à sa surface plusieurs molécules d'adhérence pour les plaquettes. Il s'agit principalement du FW et de la P-sélectine, tous deux issus de l'exocytose des granules de Weibel-Palade, et de protéines néo-synthétisées telles que la E-sélectine et ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) (Boneu and Cazenave, 1997). Les interactions FW/GPIIb α , P-sélectine/GPIIb α et sélectines/PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) induisent la capture des plaquettes suivie de leur roulement à la surface de l'endothélium (Frenette et al., 2000; Massberg et al., 2002). La stabilisation de l'adhérence repose sur l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, qui lie le FW ainsi que le fibrinogène plasmatique adsorbé sur ICAM-1 (Massberg et al., 2002; Massberg et al., 1999). En outre, l'endothélium activé sécrète vers le sous-endothélium des protéines absentes du vaisseau sain comme la TN-C (Zagzag et al., 1996) et la *bone morphogenic protein-4* (BMP-4) (Sorescu et al., 2003), auxquelles les plaquettes pourraient adhérer.

L'endothélium activé sécrète du TxA₂ et du *platelet-activating factor* (PAF), qui augmentent l'agrégabilité plaquettaire, et libère l'endothéline-1 contenue dans les corps de

Weibel-Palade, provoquant une vasoconstriction durable. L'activation plaquettaire et la vasoconstriction sont d'autant plus importantes que la production de NO est réduite (**Boneu and Cazenave, 1997**).

Enfin, la cascade de la coagulation est activée suite à l'exposition de facteur tissulaire et de phospholipides anioniques, tandis que l'expression de protéines anticoagulantes comme la thrombomoduline est diminuée. De plus, le système fibrinolytique est inhibé via la sécrétion de l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1) (**Boneu and Cazenave, 1997**).

3.3.2. Les CML et les fibroblastes

Localisées dans la média, les CML sont des cellules mononucléées, fusiformes et entourées d'une membrane basale (**Bou-Gharios et al., 2004; Toussaint et al., 2003**). Elles sont connectées entre elles par des desmosomes et des jonctions de type intermédiaire. Les CML présentent un phénotype soit sécrétoire, produisant les composants de la MEC, soit contractile lorsque prédomine le matériel myofilaementaire. Dans l'artère saine, les CML sont majoritairement contractiles, incapables de migrer et possèdent des capacités de prolifération et de sécrétion faibles. Disposées circonférentiellement, leur fonction principale est de contrôler le tonus vasculaire en réponse à divers médiateurs d'origine nerveuse (Ex. acétylcholine), hormonale (Ex. angiotensine II) ou locale (Ex. NO).

Localisés dans l'adventice, les fibroblastes sont des cellules fusiformes ou étoilées, dotées de longs prolongements cytoplasmiques et arrangées longitudinalement. Ils synthétisent les composants de la MEC et peuvent, dans certaines conditions, migrer dans la média et s'y différencier en CML (**Bou-Gharios et al., 2004**).

Les CML et les fibroblastes possèdent des propriétés pro-coagulantes car ils expriment constitutivement du facteur tissulaire à leur surface et en sécrètent après activation (**Mackman, 1997; Mackman, 2004**). Les stimuli sont des cytokines et des facteurs de croissance comme le TGF β (*Transforming growth factor β*) et le PDGF (*Platelet-derived growth factor*), générés lors de l'hémostase et au cours des réactions inflammatoires. La stimulation des CML et des fibroblastes entraîne également leur migration, leur prolifération

et la formation de tissu conjonctif (**Bou-Gharios et al., 2004**). Ces réponses permettent la cicatrisation de la lésion mais peuvent aussi contribuer à l'athérosclérose (voir section 5.1.1).

3.3.3. La MEC

La MEC est composée de quatre types de macromolécules : les édifices fibreux collagéniques et élastiques, les glycoprotéines et les protéoglycanes (**Toussaint et al., 2003**). L'association de certains de ces constituants peut former des structures spécialisées comme la membrane basale. La MEC est un ensemble complexe et dynamique qui (i) soutient la paroi vasculaire, (ii) régule les fonctions des cellules endothéliales, des CML et des fibroblastes, et (iii) détermine la réponse thrombogène lors d'une lésion en induisant l'adhérence et l'activation des plaquettes. La composition de la MEC varie en fonction du territoire vasculaire et change au cours du développement, du vieillissement et de pathologies comme l'athérosclérose. Ce chapitre est consacré à la description des constituants de la MEC de l'artère saine et à leurs rôles dans l'hémostase. Certaines glycoprotéines pariétales étant également présentes dans le plasma, nous présenterons les fonctions des deux composantes.

3.3.3.1. La membrane basale

La membrane basale est une spécialisation de la MEC entourant les cellules endothéliales et les CML et synthétisée par elles (**Kalluri, 2003; Kühnel, 2003**). En microscopie électronique à transmission, elle apparaît constituée de trois couches superposées faisant 15 à 50 nm d'épaisseur chacune (**Alberts et al., 2002**). La première, nommée *lamina lucida*, correspond à un réseau de laminines au contact des cellules (**Figure 18**). Elle est suivie, vers l'extérieur, de la *lamina densa* composée de feuilletts de collagène IV. Les polymères de laminine et de collagène IV sont reliés par une glycoprotéine, le nidogène, et des protéoglycanes, le perlécan et l'agrine. La dernière couche, la *lamina reticularis*, contient de la fibronectine et des fibres de collagène III ancrées dans la *lamina densa* par des microfibrilles de collagène VII. De plus, du FW est présent dans les trois parties au niveau endothélial (**Bergmeier and Hynes, 2012**). La membrane basale joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité vasculaire en permettant la fixation des cellules via des récepteurs tels

que les intégrines et l' α -dystroglycan. Elle intervient également dans l'angiogenèse en régulant la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales (Kalluri, 2003).

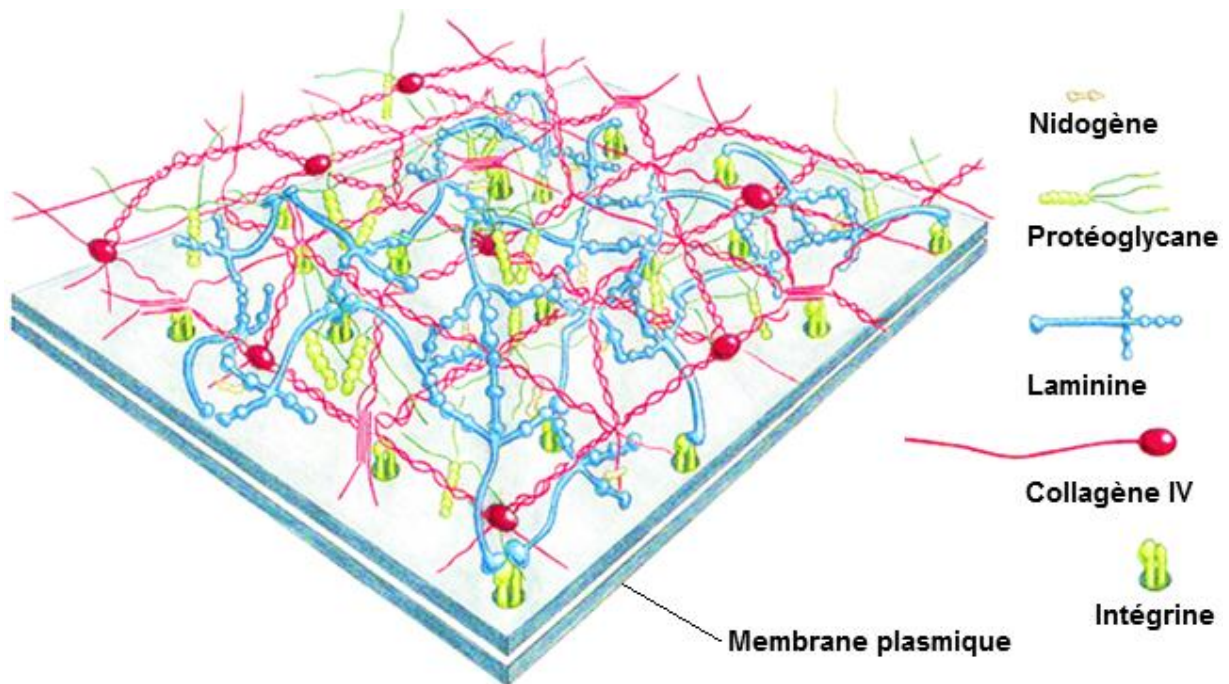


Figure 18 : Schématisation de la membrane basale (la *lamina reticularis* n'est pas représentée) (D'après Alberts et al., 2002).

3.3.3.2. Les collagènes

L'unité élémentaire de collagène est un polypeptide appelé chaîne α , enroulé en hélice gauche et constitué de la répétition de motifs GXY, où X et Y sont souvent la proline et l'hydroxyproline (Farndale et al., 2004; Toussaint et al., 2003). Les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes en sont les principales sources. Après traduction, les chaînes α subissent d'importantes modifications (hydroxylations, glycosylations) puis s'associent par trois en une superhélice droite appelée procollagène, qui est sécrétée dans la MEC. Le clivage des extrémités N- et C-terminales convertit alors le procollagène en tropocollagène, qui s'organise en polymères insolubles (Figure 19) (Cau and Seïte, 2001; De Jaeger and Cherin, 2012). Treize types de collagènes composés de combinaisons de chaînes α codées par une trentaine de gènes ont été décrits dans les vaisseaux (De Jaeger and Cherin, 2012). Schématiquement, on distingue les collagènes :

- 1) Formant des fibrilles à striation périodique s'assemblant en fibres puis faisceaux (I, III, V),
- 2) Formant des microfibrilles sans striation périodique (VI, VII),
- 3) Non fibrillaires formant des réseaux plans superposés (IV, VIII),
- 4) FACIT (*Fibril-associated collagens with interrupted triple helices*), qui sont associés aux fibrilles (XII, XIV, XV, XVI, XVIII, XIX).

Les collagènes fibrillaires I et III représentent 90% des collagènes artériels et sont des composants majeurs de la média et l'adventice. Le sous-endothélium contient essentiellement les types III et VI auxquels s'associe du collagène XII. Le collagène IV et, en moindre quantité les types III et VII, constituent les membranes basales. Les autres collagènes sont minoritaires (Farquharson and Robins, 1989; Fauvel-Lafeve, 1999; Toussaint et al., 2003). Les collagènes ont un rôle structural essentiel car ils forment une charpente assurant la rigidité du vaisseau et sa résistance à l'étirement. Les anomalies du collagène III fragilisent particulièrement la paroi et prédisposent aux anévrismes et dissections artérielles, aortique notamment (syndrome d'Ehlers-Danlos) (Perdu et al., 2006).

Les collagènes fibrillaires sont les éléments les plus thrombogènes de la paroi vasculaire (Varga-Szabo et al., 2008). La perfusion de sang sur collagène I ou III entraîne la formation rapide de gros agrégats (Parsons et al., 1986; Ross et al., 1995; Saelman et al., 1994; Savage et al., 1998). Ce processus implique la GPIIb α , qui reconnaît le FW plasmatique

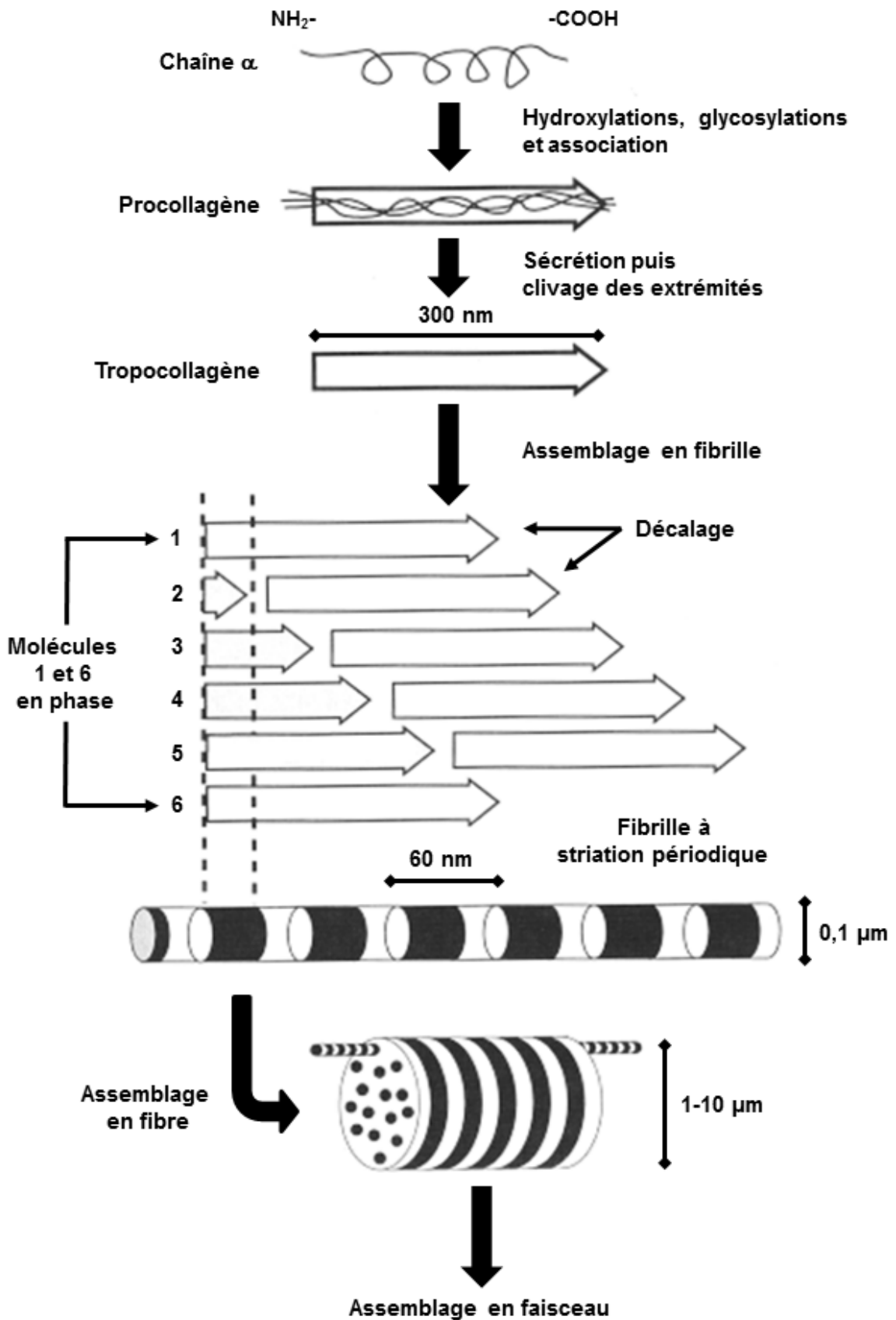


Figure 19 : Schématisation des grandes étapes de la biosynthèse des collagènes fibrillaires à striation (d'après Cau and Seïte, 2001).

adsorbé sur les fibres de collagène, ainsi que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (voir section 2.1.3.5.) et la GPVI (voir section 2.1.2.) (Varga-Szabo et al., 2008). La réactivité remarquable des collagènes I et III dépend à la fois de leurs structures primaire, tertiaire et quaternaire. D'une part, les séquences GPO et GFOGER sont nécessaires pour lier respectivement la GPVI et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (Farndale et al., 2004). Des peptides synthétiques en triple hélice contenant la séquence GPO comme le CRP (*Collagen-related peptide*) sont de puissants activateurs plaquettaires via l'engagement de la GPVI (Farndale et al., 2004). D'autre part, la dénaturation de l'organisation en triple hélice ou en fibre empêche la liaison aux récepteurs malgré une séquence primaire conservée (Morton et al., 1994; Ross et al., 1998; Savage et al., 1999).

Le collagène de type IV ne forme pas de fibrilles mais des tétramères organisés en feuillets superposés structurant la membrane basale des cellules endothéliales et des CML (Figure 18) (Toussaint et al., 2003). C'est l'un des premiers collagènes exposés suite à une lésion de l'endothélium (Hechler et al., 2010). *In vitro*, les plaquettes adhèrent au collagène IV immobilisé dans des conditions de flux variés et forment des agrégats plus petits que sur collagène III (Parsons et al., 1986; Polanowska-Grabowska et al., 1999; Saelman et al., 1994). L'adhérence implique l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ et la GPIb α , qui lie le FW adsorbé sur le collagène IV (Henrita van Zanten et al., 1996; Saelman et al., 1994).

Le collagène VI est localisé dans le sous-endothélium où il s'assemble en microfibrilles liant le FW (Denis et al., 1993). Par l'intermédiaire de l'axe GPIb α /FW et de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, il permet l'adhérence des plaquettes et la formation d'agrégats de grande taille mais uniquement en présence de flux faibles ($< 500 \text{ s}^{-1}$) (Ross et al., 1998; Ross et al., 1995; Saelman et al., 1994).

3.3.3.3. Les fibres élastiques

Les fibres élastiques sont composées d'un cœur insoluble et amorphe de polymères d'élastine, stabilisé par un maillage périphérique de microfibrilles constituées de glycoprotéines comme les fibrillines (Toussaint et al., 2003). Dans les artères, les fibres sont synthétisées par les CML et s'organisent en deux feuillets épais de part et d'autre de la média, à savoir la LEI et la LEE (voir section 3.1.) (Kühnel, 2003). De plus, les artères élastiques comme l'aorte contiennent de nombreuses couches de fibres élastiques dans leur média, reconnaissables à leur aspect en « tôle ondulée » au microscope en coupe transversale (Figure

20) (Kühnel, 2003). Disposées circonférentiellement, les fibres élastiques assurent la distensibilité des artères, permettant l'amortissement et la propagation de l'onde de pression cardiaque (Bou-Gharios et al., 2004). Des défauts du tissu élastique comme le syndrome de Marfan fragilisent la paroi, augmentant notamment le risque d'anévrisme aortique (Bolar et al., 2012). *In vitro*, il a été observé qu'une surface de fibres élastiques purifiées permet l'adhérence des plaquettes via l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en condition de flux faibles (Ross et al., 1998).

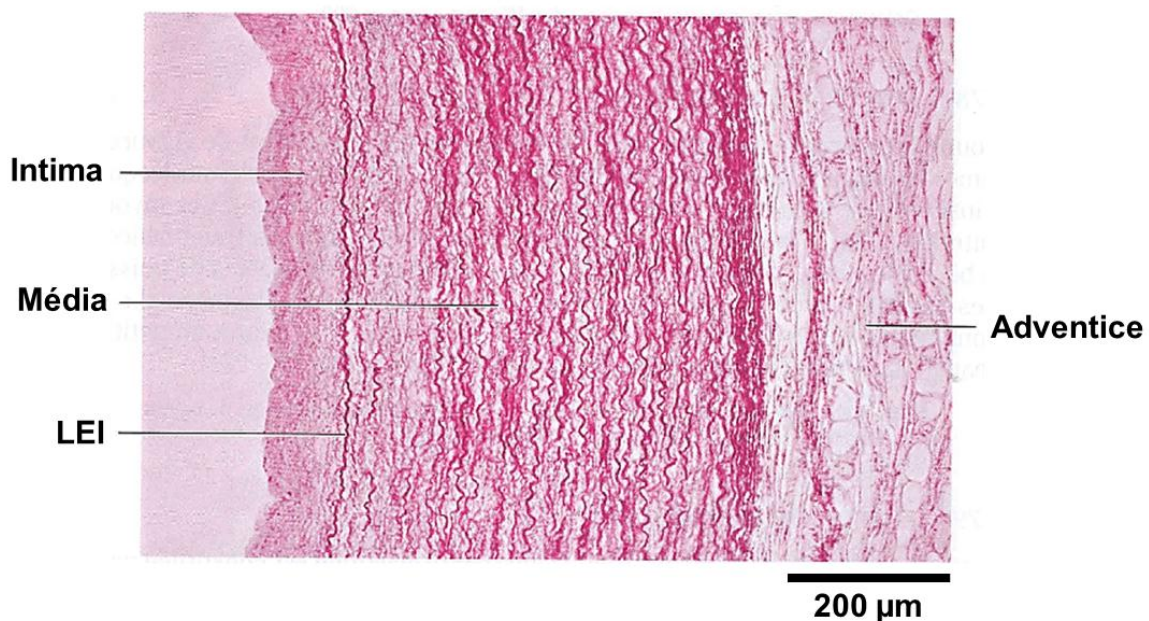


Figure 20 : Coupe transversale d'une aorte thoracique humaine montrant l'aspect caractéristique « en tôle ondulée » des fibres élastiques de la LEI et de la média. Image de microscopie optique obtenue avec une coloration hématoxyline-éosine. LEI, limitante élastique interne (D'après Kühnel, 2003).

3.3.3.4. Les glycoprotéines

a) Le FW

Le FW est une glycoprotéine multimérique pouvant atteindre 20 000 kDa, synthétisée par la cellule endothéliale et par le mégacaryocyte (**Ruggeri, 1999**). Il est libéré constitutivement par la cellule endothéliale, majoritairement sous la forme de multimères de bas poids moléculaire, vers le sous-endothélium et le plasma. Le FW plasmatique (5 à 7 $\mu\text{g/mL}$) circule associé au facteur de coagulation VIII. Lors d'une lésion vasculaire, ce FW est capturé par des glycoprotéines de la paroi, notamment les collagènes I, III, IV et VI. Le FW est également présent sous forme de multimères de très haut poids moléculaire dans les granules α des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, d'où il est sécrété après stimulation (**Ruggeri, 1999**).

Chaque monomère de FW comprend plusieurs domaines fonctionnels (**Figure 21**) : un domaine A1 qui permet son association à la GPIIb α et au collagène VI, un domaine A3 liant les collagènes I, III et IV, un domaine D3 liant le facteur VIII, et enfin un module C1 contenant un motif RGD qui interagit avec les intégrines $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ et $\alpha_{\text{V}}\beta_3$ (**Ruggeri, 1999**). La région CK (*Cysteine knot*) C-terminale permet la dimérisation dans le réticulum endoplasmique. La multimérisation a lieu dans les compartiments du Golgi entre les domaines D3 N-terminaux. Un site de clivage pour la métalloprotéase plasmatique ADAMTS13 (*A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeat-13*) est situé sur le domaine A2, permettant de contrôler la taille des multimères (**Ruggeri, 1999; Zhang et al., 2009**).

Le FW assure l'adhérence et l'agrégation des plaquettes en liant la GPIIb α et l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activée, et intervient également dans la coagulation puisqu'il transporte et protège le facteur VIII (**Ruggeri, 1999**). Dans les conditions normales de circulation, les plaquettes n'interagissent pas de manière détectable avec le FW plasmatique car celui-ci possède une conformation globulaire peu favorable à la liaison de la GPIIb α . Lors d'une lésion, le FW s'adsorbe sur le collagène (**Savage et al., 1998**), la laminine (**Inoue et al., 2008**), la fibronectine (**Beumer et al., 1995**), le fibrinogène et la fibrine (**Endenburg et al., 1995; Hantgan et al., 1990**). Du FW est aussi exposé à la surface des plaquettes activées ayant sécrété leurs granules α (**Kulkarni et al., 2000**). Lorsque le FW est immobilisé, les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin induisent le passage à une forme étendue avec exposition des domaines A1 (**Di**

Stasio and De Cristofaro, 2010; Siedlecki et al., 1996). L'interaction domaine A1/GPIb α ayant une cinétique d'association élevée, elle permet le recrutement et le ralentissement des plaquettes circulantes, que ce soit au niveau du sous-endothélium (**Savage et al., 1996**) ou à la surface d'un agrégat (**Kulkarni et al., 2000**). *In vitro*, la perfusion de sang sur FW immobilisé sur une surface de verre entraîne l'adhérence réversible des plaquettes et leur roulement dans le sens du flux (**Savage et al., 1996**). En condition statique, l'association entre le FW immobilisé et la GPIb α peut être obtenue par l'ajout d'inducteurs non physiologiques tels que la botrocétine ou la ristocétine (**Andrews et al., 1989; Chopek et al., 1986**).

De par ses multiples fonctions et localisations, le FW occupe une place importante dans l'hémostase, illustrée par l'existence de deux pathologies : la maladie de Willebrand, syndrome hémorragique le plus fréquent chez l'homme, due à un déficit quantitatif ou qualitatif du FW (**Keeney and Cumming, 2001**), et le purpura thrombotique thrombopénique (PTT) qui résulte de l'accumulation plasmatique de multimères de très haut poids moléculaire, hyperadhésifs, suite à un défaut de clivage par ADAMTS13. Cette maladie grave entraîne des thromboses dans la microcirculation suivies d'une anémie hémolytique et d'une thrombopénie provoquant des ecchymoses (**Galbusera et al., 2006**).

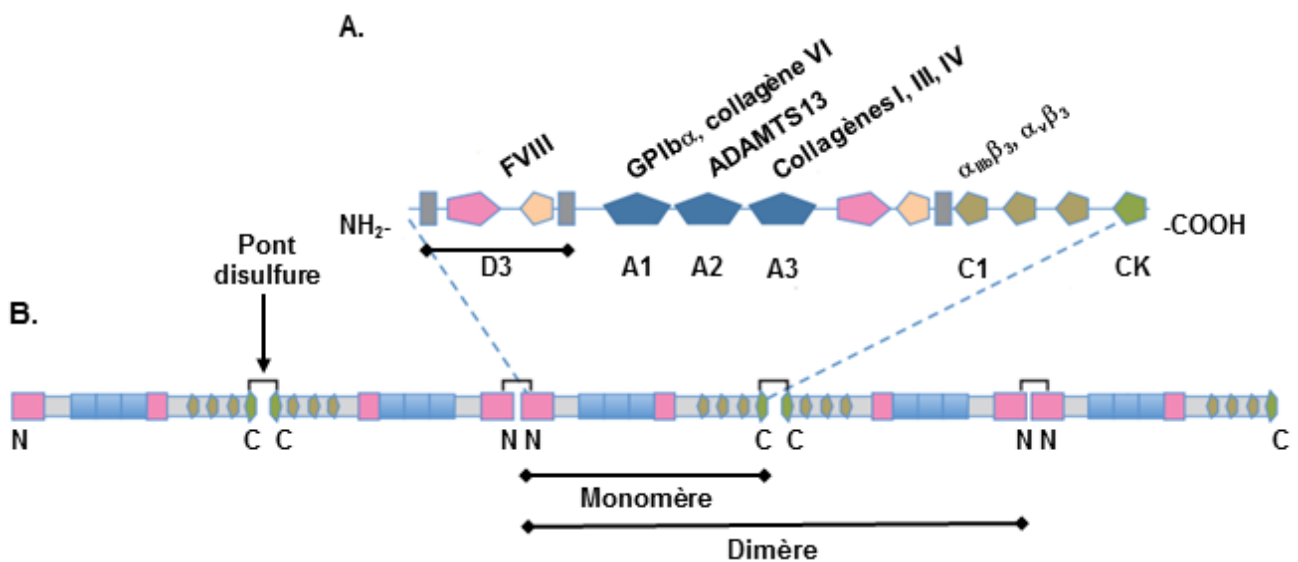


Figure 21 : Schématisation d'un monomère (A) et d'un multimère (B) de FW montrant les principaux domaines fonctionnels et leurs ligands. ADAMTS13, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeat-13 (Adapté de Bergmeier and Hynes, 2012).

b) Les laminines

Les laminines sont des constituants majeurs des membranes basales (voir section 3.3.3.1.). Ce sont des hétérotrimères cruciformes d'environ 800 kDa, constitués de chaînes α , β et γ (**Figure 22**) (**Hallmann et al., 2005**). Les régions C-terminales des chaînes sont reliées par enroulement en superhélice et forment le corps de la croix, l'extrémité de la chaîne α étant globulaire et composant le domaine G. Les régions N-terminales sont libres et forment les bras courts de la croix. Des gènes distincts codent pour cinq chaînes α , quatre β et trois γ . Il existe dix-huit isoformes de laminine, nommées d'après la nature de leurs sous-unités (**Tableau 2**) (**Aumailley et al., 2005**). Par exemple, la laminine-111 (LN111) contient les chaînes α_1 , β_1 et γ_1 . Les chaînes ont une structure commune comprenant des domaines globulaires et des répétitions de type EGF (*Epidermal growth factor*) qui permettent : i) l'assemblage des lamines en réseau, ii) leur interaction avec d'autres constituants de la MEC comme le nidogène et des protéoglycanes, et iii) la liaison à des récepteurs cellulaires tels que l' α -dystroglycan et les intégrines de la famille β_1 (**Hallmann et al., 2005**).

Les vaisseaux contiennent quatre isoformes majeures, localisées dans les membranes basales entourant les cellules endothéliales et les CML : les LN411, 421, 511 et 521 (**Hallmann et al., 2005; Kelleher et al., 2004; Petajaniemi et al., 2002; Sorokin et al., 1997**). Les artérioles, capillaires et veinules expriment également les LN211, 221 (**Sasaki et al., 2002**) et 3B11 (**Mori et al., 2010**). Les laminines forment un réseau structurant la membrane basale (**Figure 18**) (**Hallmann et al., 2005**). De plus, elles modulent l'angiogenèse en contrôlant l'adhérence, la prolifération, la migration et l'apoptose des cellules pariétales (**Simon-Assmann et al., 2011**). Les souris invalidées pour le gène de la chaîne α_4 présentent une maturation vasculaire anormale se traduisant par une fragilité de la paroi et des saignements spontanés fréquents (**Thyboll et al., 2002**), soulignant l'importance des laminines.

Les laminines sont idéalement localisées pour interagir avec les plaquettes lors d'une lésion. Plusieurs études ont montré que ces dernières adhèrent sur une matrice de laminine en conditions statique et de flux par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ (**Geberhiwot et al., 1999; Hindriks et al., 1992; Ill et al., 1984; Inoue et al., 2006; Nigatu et al., 2006; Polanowska-Grabowska et al., 1999; Sonnenberg et al., 1988**). De plus, les laminines peuvent lier le FW plasmatique, permettant de recruter les plaquettes via la GPIb α en présence de flux élevés (**Inoue et al., 2008**). L'engagement d' $\alpha_6\beta_1$ favoriserait en retour l'interaction entre la GPVI et

les laminines, induisant l'activation des plaquettes, leur changement de forme et leur étalement (Inoue et al., 2006). La limite majeure de presque tous ces travaux est qu'ils ont utilisé soit de la LN111, qui n'est pas présente dans la paroi vasculaire (Kelleher et al., 2004; Simon-Assmann et al., 2011; Virtanen et al., 2000), soit un mélange de plusieurs isoformes d'origine placentaire (Wondimu et al., 2006). Deux études ont rapporté que les laminines vasculaires 411 et 511 permettent l'adhérence plaquettaire en condition statique, la LN511 étant plus réactive (Geberhiwot et al., 1999; Nigatu et al., 2006). L'importance des laminines dans l'adhérence et l'activation des plaquettes *in vivo* reste inconnue.

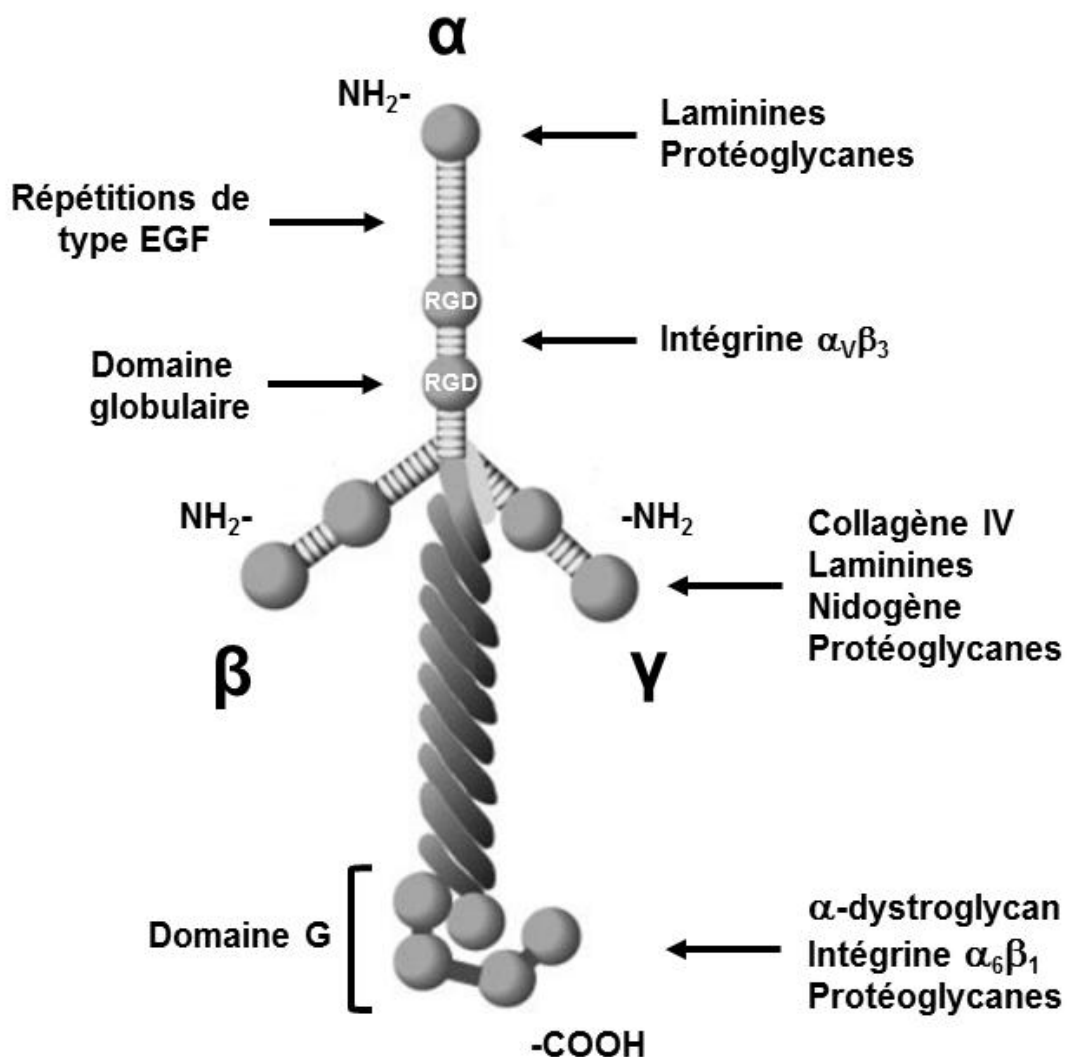


Figure 22 : Schématisation d'une molécule de laminine montrant les différents domaines et leurs principaux ligands. Sur son bras court, la chaîne α possède deux sites RGD capables de lier l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. La liaison de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ se fait au niveau du domaine G en C-terminal de la chaîne α (Adapté de Aumailley et al., 2005; Hallmann et al., 2005).

Nom	Composition
LN111	$\alpha_1\beta_1\gamma_1$
LN121	$\alpha_1\beta_2\gamma_1$
LN211	$\alpha_2\beta_1\gamma_1$
LN213	$\alpha_2\beta_1\gamma_3$
LN221	$\alpha_2\beta_2\gamma_1$
LN3A11	$\alpha_{3A}\beta_1\gamma_1$
LN3A21	$\alpha_{3A}\beta_2\gamma_1$
LN3A32	$\alpha_{3A}\beta_3\gamma_2$
LN3B11	$\alpha_{3B}\beta_1\gamma_1$
LN3B21	$\alpha_{3B}\beta_2\gamma_1$
LN3B32	$\alpha_{3B}\beta_3\gamma_2$
LN411	$\alpha_4\beta_1\gamma_1$
LN421	$\alpha_4\beta_2\gamma_1$
LN423	$\alpha_4\beta_2\gamma_3$
LN511	$\alpha_5\beta_1\gamma_1$
LN521	$\alpha_5\beta_2\gamma_1$
LN522	$\alpha_5\beta_2\gamma_2$
LN523	$\alpha_5\beta_2\gamma_3$

Tableau 2 : Nomenclature des 18 isoformes de laminine. La chaîne α_3 existe sous deux variants d'épissage, α_{3A} et α_{3B} . Les isoformes exprimées dans la paroi vasculaire apparaissent en jaune (d'après Aumailley et al., 2005; Hallmann et al., 2005; Kelleher et al., 2004; Mori et al., 2010; Petajaniemi et al., 2002; Sasaki et al., 2002; Sorokin et al., 1997).

c) Les TSP

Les TSP sont composées de monomères de 145 kDa s'associant par des ponts disulfures en homotrimères (TSP-1 et -2) ou homopentamères (TSP-3, -4 et -5) (**Figure 23**). Chaque monomère possède de nombreux domaines d'interaction avec d'autres protéines de la MEC telles que les collagènes, les fibronectines et le FW, et avec des récepteurs cellulaires, notamment CD36, CD47 et des intégrines (**Adams, 2001; Stenina et al., 2007**).

Les TSP sont fortement exprimées durant le développement et peu abondantes à l'état adulte, sauf dans quelques tissus comme les vaisseaux, où quatre isoformes sont présentes : les TSP-1, -2, -4 et -5 (**Adams, 2001; Reed et al., 1995; Stenina et al., 2003**). La TSP-1 est synthétisée par les mégacaryocytes, les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes (**Bonnefoy et al., 2006; Reed et al., 1995**). Elle est localisée dans le sous-endothélium et la média, dans les granules α des plaquettes ainsi que dans le plasma à de faibles concentrations (100-300 ng/mL) (**Bonnefoy et al., 2006; Reed et al., 1995**). Les TSP-2 et -4, sécrétées par les cellules endothéliales et les CML, sont présentes dans l'intima et, plus faiblement, dans la média (**Reed et al., 1995; Stenina et al., 2003**). Enfin, la TSP-5 a été exclusivement mise en évidence dans la média où elle est associée aux CML (**Riessen et al., 2001**).

Les TSP sont décrites pour réguler l'adhérence, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaires, mais leurs fonctions dans l'homéostasie vasculaire restent mal connues. Lors des phénomènes de remodelage tissulaire comme la cicatrisation, les TSP-1 et -2 modulent l'angiogenèse (**Adams, 2001**). Les souris déficientes en TSP-2 présentent une augmentation du temps de saignement attribuée à des défauts d'organisation des fibres de collagène dans la paroi vasculaire, et à une maturation anormale des plaquettes dans la moelle osseuse (**Kyriakides et al., 2003**). De tels défauts ne sont pas observés chez les souris invalidées pour le gène de la TSP-1 (**Bonnefoy et al., 2006; Lawler et al., 1998**).

Plusieurs études ont montré un rôle de la TSP-1 dans l'adhérence et l'activation plaquettaires. La TSP-1 immobilisée assure une adhérence efficace des plaquettes en condition de flux élevés par interaction directe avec la GPIIb α et CD36 (**Agbanyo et al., 1993; Jurk et al., 2003**). En outre, sous forme soluble ou immobilisée, la TSP-1 peut interagir avec CD47, favorisant l'activation des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_2\beta_1$ (**Chung et al., 1997; Chung et al., 1999; Lagadec et al., 2003**). La TSP-1 pourrait aussi lier CD148, un récepteur à activité tyrosine phosphatase régulant la signalisation de la GPVI et de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Senis et al., 2009**;

Takahashi et al., 2012). Dans un modèle de lésion artérielle, les souris déficientes en TSP-1 forment des thrombi instables comparativement aux sauvages, défaut qui est corrigé par l'injection d'anticorps anti-ADAMTS13 (Bonney et al., 2006). La TSP-1 pourrait protéger le FW en s'y liant, empêchant sa dégradation par ADAMTS13 (Bonney et al., 2006; Wang et al., 2010). Un rôle de la TSP-1 pariétale dans l'adhérence plaquettaire *in vivo* a aussi été proposé (Bergmeier et al., 2006; Ni et al., 2000).

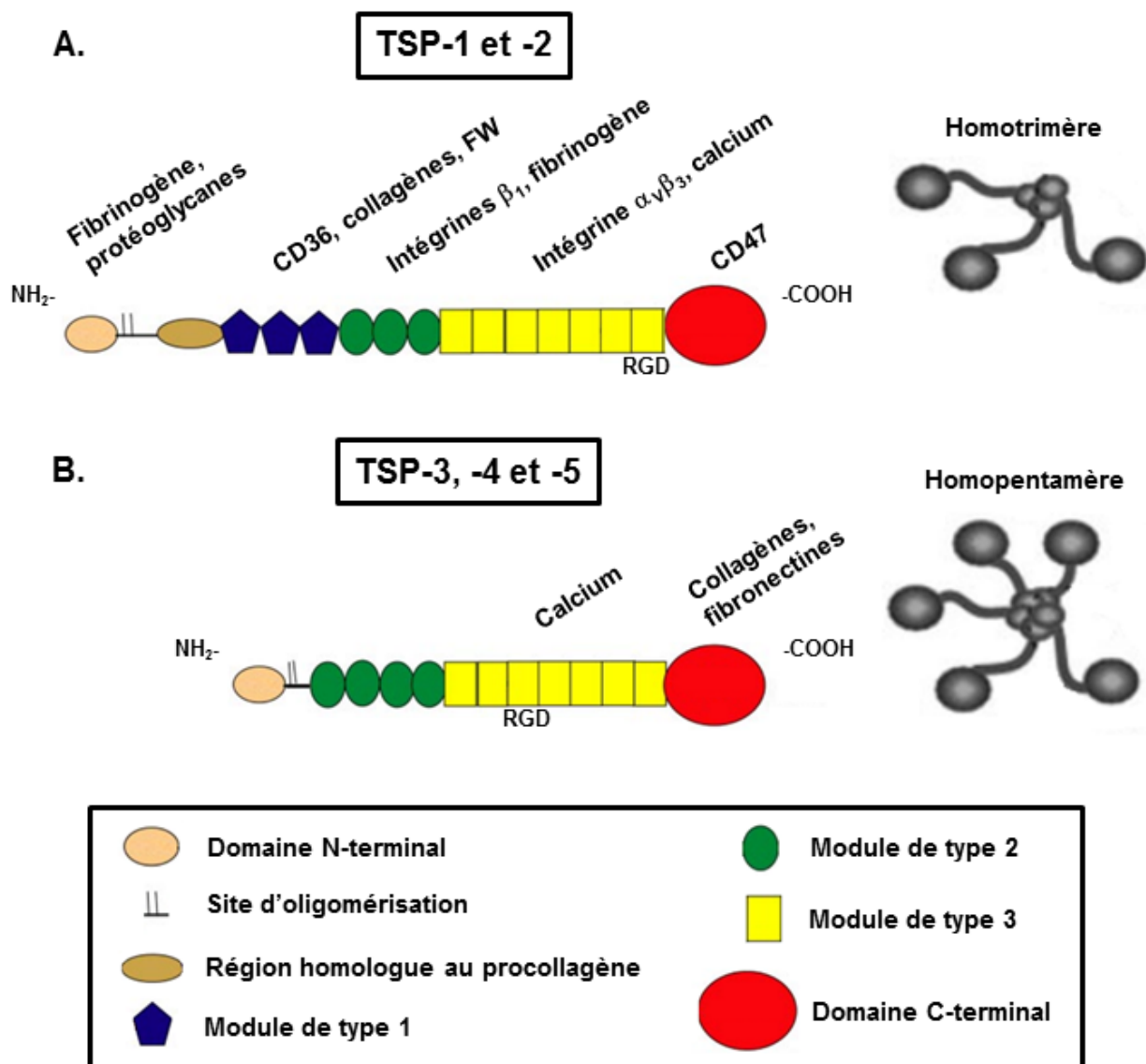


Figure 23 : Schématisation des monomères de TSP montrant les différents domaines et leurs principaux ligands connus. Les TSP-1 et -2 s'organisent en homotrimères, alors que les TSP-3, -4 et -5, de taille inférieure, s'assemblent en homopentamères. Les schémas à droite sont basés sur des images de microscopie électronique à transmission obtenues par une technique d'ombrage rotatoire (Adapté de Adams, 2001; Stenina et al., 2007).

d) Les fibronectines

Les fibronectines sont composées de monomères de 250 kDa s'associant par des ponts disulfures en dimères en forme de « V » (**Cho and Mosher, 2006; To and Midwood, 2011**). Les monomères, codés par un gène unique, comprennent quatre types de modules répétés (I, II, III plus une région variable) portant des sites d'auto-assemblage, d'interaction avec d'autres composants de la MEC comme les collagènes, la fibrine et les protéoglycanes, et une séquence RGD de liaison aux intégrines (**Figure 24**). Il existe deux formes majeures de fibronectine, produites par épissage alternatif : la fibronectine plasmatique, sécrétée par le foie, et la fibronectine dite cellulaire, d'origine variée (Ex. fibroblastes, mégacaryocytes) et présente notamment dans la paroi vasculaire et les granules α des plaquettes. La fibronectine plasmatique est soluble et circule à une concentration de 300 $\mu\text{g/mL}$, alors que la forme cellulaire est assemblée en fibrilles insolubles (**Cho and Mosher, 2006; Singh et al., 2010; To and Midwood, 2011**).

Dans la paroi artérielle, la fibronectine est synthétisée par les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes, et déposée sous forme de fibrilles dans la membrane basale, le sous-endothélium, la média et l'adventice (**De Jaeger and Cherin, 2012; Glukhova et al., 1989; To and Midwood, 2011**). Une fraction de la fibronectine sous-endothéliale serait d'origine plasmatique et polymériserait lors de son incorporation dans la MEC (**Cho and Mosher, 2006; Moretti et al., 2007; Singh et al., 2010**). Les souris déficientes en fibronectine présentent de sévères malformations vasculaires et décèdent au stade embryonnaire, soulignant l'importance de cette protéine dans l'organisation et les fonctions de la MEC (**George et al., 1993**). En particulier, la fibronectine fibrillaire favorise l'adhérence et la quiescence des cellules endothéliales (**Christopher et al., 1999**).

In vitro, une matrice de fibronectine permet l'adhérence et l'activation des plaquettes en conditions statique (**Ill et al., 1984; McCarty et al., 2004; Savage and Ruggeri, 1991**) et de flux peu élevés (**Agbanyo et al., 1993; Beumer et al., 1994; Bültmann et al., 2010; Polanowska-Grabowska et al., 1999**). Dans ce dernier cas cependant, l'adhérence reste modeste comparée à d'autres protéines comme le FW ou la TSP-1 (**Agbanyo et al., 1993; Polanowska-Grabowska et al., 1999; Zaidi et al., 1996**). Elle repose sur les intégrines $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$, qui génèrent une signalisation calcique conduisant à l'étalement des plaquettes (**Beumer et al., 1994; McCarty et al., 2004**). En présence de flux, la GPIIb α participerait à l'adhérence en liant le FW plasmatique adsorbé sur la fibronectine (**Beumer et al., 1995**). Un

rôle de la GPVI dans l'adhérence plaquettaire sur fibronectine a aussi été montré (**Bültmann et al., 2010**). Chez la souris, l'absence de fibronectine plasmatique induit une diminution de la taille et de la stabilité des thrombi formés après une lésion artérielle (**Matuskova et al., 2006**; **Ni et al., 2003**). Il a été proposé qu'à la surface des plaquettes activées, la fibronectine plasmatique et celle sécrétée par les granules α forment un polymère qui renforce le réseau de fibrine et stabilise le thrombus (**Cho and Mosher, 2006**).

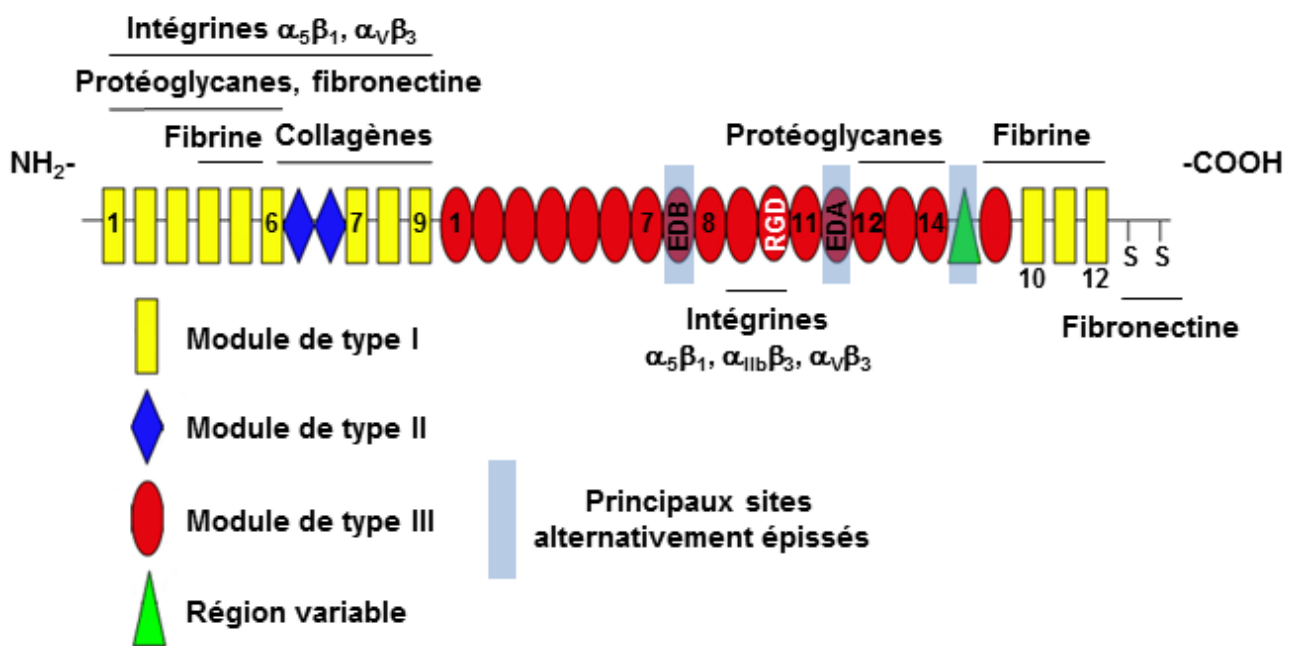


Figure 24 : Schématisation d'un monomère de fibronectine montrant les différents domaines et leurs principaux ligands. La fibronectine possède douze modules de type I, deux de type II, dix-sept de type III (le dixième contient une séquence RGD) et une région variable. Trois sites peuvent être alternativement épissés, générant une vingtaine d'isoformes : la région variable et deux modules de type III nommés ED (*Extra domain*) A et EDB. La dimérisation se fait par deux ponts disulfures entre les extrémités C-terminales (**Adapté de To and Midwood, 2011**).

e) Le fibrinogène

Le fibrinogène se compose de trois chaînes polypeptidiques ($A\alpha$, $B\beta$, γ) assemblées en un homodimère de 340 kDa par des ponts disulfures entre leurs domaines N-terminaux (**Figure 25**) (**Kreis and Vale, 1999; Salsmann et al., 2006**). Chaque monomère possède trois sites de liaison pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$: deux séquences RGD, situées sur la chaîne $A\alpha$, et le dodécapeptide, qui correspond aux douze acides aminés de l'extrémité C-terminale de la chaîne γ . Le fibrinogène est sécrété par les hépatocytes dans le plasma où il circule à de fortes concentrations (3 mg/mL). Ce fibrinogène peut être endocyté par les plaquettes, qui le stockent dans les granules α (**Kreis and Vale, 1999**), et par les cellules endothéliales, qui le déposent dans le sous-endothélium par diacytose (**Kurozumi et al., 1984; Smith, 1995**).

Le fibrinogène plasmatique joue un rôle clef dans l'agrégation plaquettaire en formant un pontage entre les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquettes adjacentes (**Kreis and Vale, 1999**). L'interaction du fibrinogène soluble avec l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ nécessite l'activation préalable de l'intégrine. Cependant, lorsque le fibrinogène est immobilisé au niveau de la paroi vasculaire ou sur une surface de verre, il subit un changement de conformation permettant sa reconnaissance par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ non-activée (**Savage and Ruggeri, 1991; Savage et al., 1996; Sivaraman and Latour, 2010**). En condition statique, cette interaction assure une adhérence efficace des plaquettes s'accompagnant d'une activation puis de leur étalement (**Savage and Ruggeri, 1991**). En présence de flux, l'adhérence sur fibrinogène fait intervenir non seulement l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ mais également le complexe GPIb-V-IX, qui lie le FW adsorbé sur le fibrinogène (**Endenburg et al., 1995; Hantgan et al., 1990**). Malgré la participation de ces deux récepteurs, l'adhérence reste faible et limitée aux taux de cisaillement peu élevés (**Polanowska-Grabowska et al., 1999; Savage et al., 1996; Zaidi et al., 1996**). Le fibrinogène est aussi le principal substrat de la thrombine, dont l'action protéolytique démasque des sites d'auto-association permettant l'assemblage d'un réseau de fibrine enserrant et stabilisant l'agrégat plaquettaire (**Kreis and Vale, 1999**). De plus, la fibrine possède des propriétés adhésives similaires au fibrinogène, suggérant quelle pourrait participer au recrutement des plaquettes à la surface d'un thrombus (**Endenburg et al., 1995; Hantgan et al., 1990**).

L'importance physiologique du fibrinogène est soulignée par les syndromes hémorragiques associés à ses anomalies qualitatives ou quantitatives comme l'afibrinogénémie, qui est l'absence totale de fibrinogène (**Boneu and Cazenave, 1997**). Les

patients afibrinogénémiques conservent cependant une agrégation plaquettaire résiduelle médiée par la liaison du FW plasmatique à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (De Marco et al., 1986).

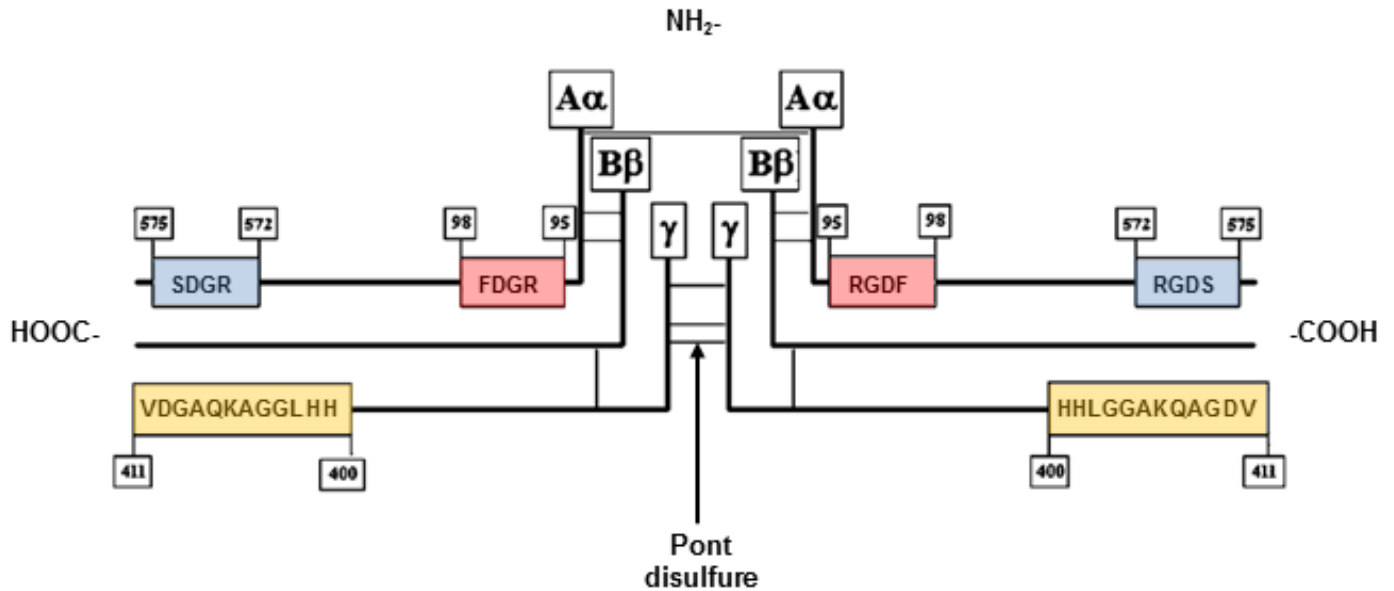


Figure 25 : Schématisation de la molécule de fibrinogène montrant les trois sites de liaison pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (d'après Salsmann et al., 2006).

f) La vitronectine

La vitronectine est une glycoprotéine monomérique de 75 kDa dont les domaines N- et C-terminaux portent des sites d'auto-assemblage, d'interaction avec diverses protéines telles que les collagènes fibrillaires, la protéine C et le PAI-1, et une séquence RGD de liaison aux intégrines β_3 (Figure 26) (Preissner and Reuning, 2011). La vitronectine est sécrétée par les hépatocytes dans le plasma où elle circule à une concentration de 350 $\mu\text{g/mL}$. Elle peut être endocytée par les cellules endothéliales, qui la déposent dans la paroi vasculaire, et par les plaquettes, qui la stockent dans les granules α . La vitronectine plasmatique est sous une forme globulaire inactive, qui s'organise au contact des plaquettes et cellules endothéliales activées en polymères réactifs (Preissner and Reuning, 2011). De tels polymères sont également trouvés dans la média et les limitantes élastiques des artères ainsi que dans les granules α (Lanzer and Topol, 2002; Stockmann et al., 1993; van Aken et al., 1997).

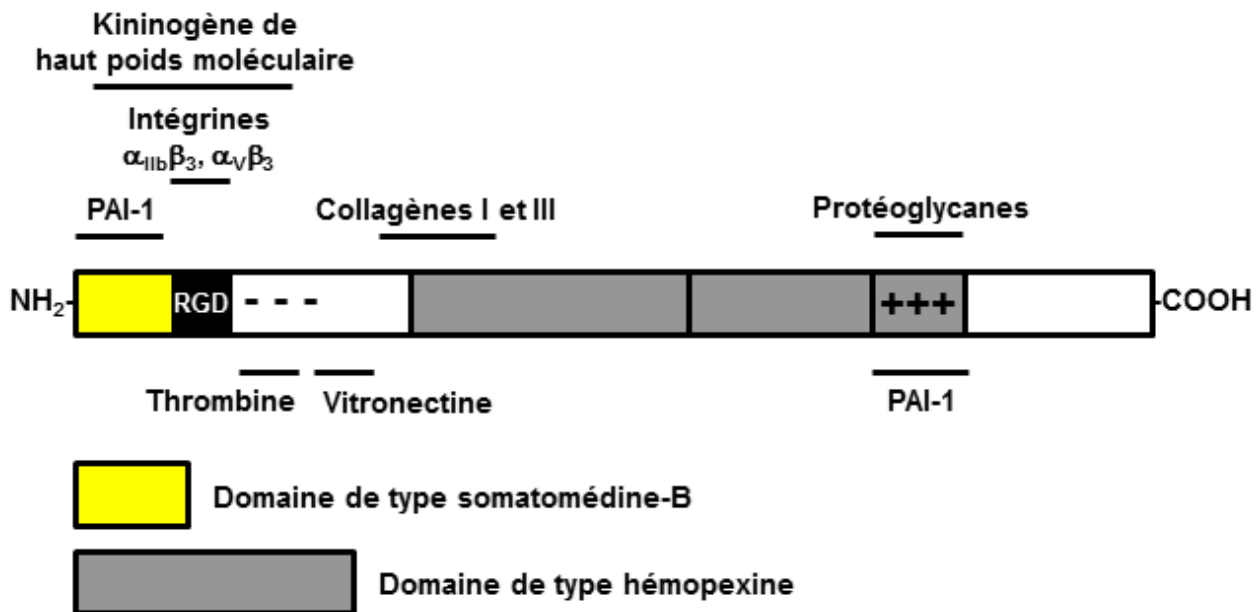


Figure 26 : Schématisation de la molécule de vitronectine montrant les différents domaines et leurs principaux ligands. La région N-terminale se compose d'un domaine de type somatomédine-B, suivi d'une séquence RGD et d'un motif riche en acides aminés acides. Le centre de la molécule est formé de deux modules analogues à l'hémopexine. Le second module contient un motif riche en acides aminés basiques à son extrémité C-terminale (Adapté de Preissner and Reuning, 2011).

Sous forme monomérique, la vitronectine immobilisée ne permet pas l'adhérence des plaquettes (Savage and Ruggeri, 1991; Zaidi et al., 1996). Cependant, une adhérence efficace médiée par les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_V\beta_3$ peut être obtenue en condition statique par pré-activation des plaquettes par l'ADP ou la thrombine (Paul et al., 2003; Savage and Ruggeri, 1991; Thiagarajan and Kelly, 1988). Lorsqu'elle se polymérise à la surface des plaquettes activées, la vitronectine acquiert à la fois des propriétés pro- et anti-thrombotiques (Preissner and Reuning, 2011). D'une part, elle contribuerait à la croissance et la stabilisation du thrombus via (i) sa liaison aux intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_V\beta_3$, (ii) son incorporation au réseau de fibrine qu'elle renforce, et (iii) la stabilisation du PAI-1, retardant la fibrinolyse. D'autre part, la vitronectine inhibe la thrombine en interagissant directement avec celle-ci et en catalysant l'activité antithrombine du PAI-1 (Preissner and Reuning, 2011). Dans plusieurs modèles de lésion artérielle, les souris déficientes en vitronectine présentent soit une diminution (Eitzman et al., 2000; Konstantinides et al., 2001; Reheman et al., 2005), soit une augmentation (Fay et al., 1999) de la thrombose. Une explication est que l'importance relative des effets pro- et anti-thrombotiques dépend du contexte lésionnel, particulièrement de la génération de thrombine.

3.3.3.5. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont constitués d'une protéine sur laquelle sont attachés un ou plusieurs glycosaminoglycanes (GAG) (Toussaint et al., 2003). Ces derniers sont de très longs polymères, non ramifiés, de disaccharides portant des carboxylates et/ou des sulfates. Ayant une capacité forte de rétention d'eau en raison de leur caractère anionique marqué, les GAG peuvent occuper jusqu'à 75% du volume de la MEC (De Jaeger and Cherin, 2012). Les protéoglycanes sont classés d'après la nature du GAG prédominant, qui peut être le chondroïtine sulfate (Ex. versican), l'héparane sulfate (Ex. perlécan, agrine), le dermatane sulfate (Ex. décorine, biglycan) ou le kératane sulfate (Ex. fibromoduline, lumican) (Toussaint et al., 2003). Les protéoglycanes sont sécrétés par les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes. Ce sont des constituants ubiquitaires de la MEC vasculaire sauf le perlécan et l'agrine qui sont spécifiques des membranes basales. La MEC vasculaire contient aussi du hyaluronane, un GAG particulier qui n'est pas lié de manière covalente à une protéine (Toussaint et al., 2003).

Dans les artères, les protéoglycanes jouent un rôle structural majeur car ils organisent et hydratent la MEC, assurant sa résistance aux variations de pression, et permettent la fixation des cellules. D'autre part, ils modulent la prolifération, la migration et l'activité de synthèse des cellules. Les protéoglycanes participent notamment à la rétention dans la matrice de cytokines, facteurs de croissance et lipoprotéines, à la modulation de l'angiogenèse, et à l'inhibition de la coagulation en activant l'antithrombine et le deuxième cofacteur de l'héparine (Boneu and Cazenave, 1997; Toussaint et al., 2003).

Des expériences de perfusion de sang sur des matrices de protéoglycanes purifiés ont révélé que la décorine, le versican et le biglycan assurent l'adhérence plaquettaire (Mazzucato et al., 2002). Les récepteurs impliqués restent inconnus sauf pour la décorine, qui lie directement l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (Guidetti et al., 2002). La décorine et le biglycan participent aussi indirectement à la thrombogénicité des fibres de collagènes en contrôlant leur assemblage (Danielson et al., 1997). Enfin, les plaquettes adhèrent sur le hyaluronane en condition statique via CD44, un récepteur membranaire qui est lui-même un protéoglycane de type héparane sulfate (Koshiishi et al., 1994). L'importance des interactions plaquette/protéoglycanes et plaquette/hyaluronane *in vivo* reste inconnue.

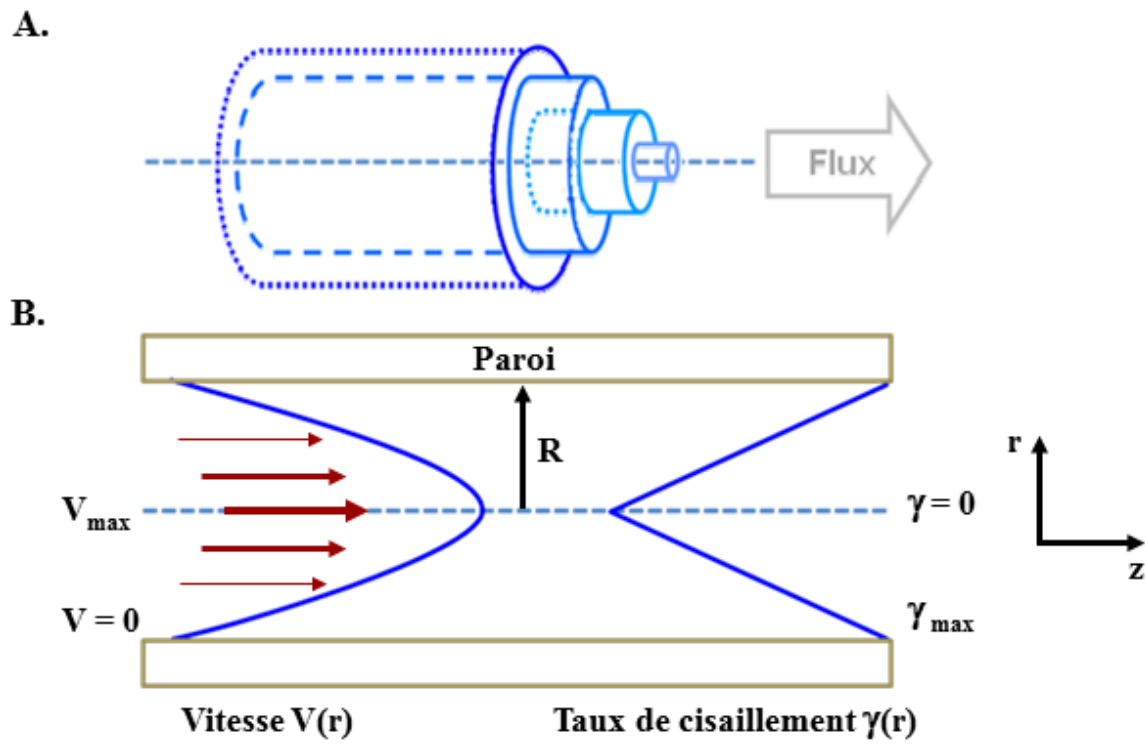


Figure 27 : Représentation de l'écoulement (A), de la vitesse et du taux de cisaillement (B) d'un fluide newtonien dans un cylindre.

4. Flux sanguin et fonctions plaquettaires

L'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes sont modulées par les conditions hémorhéologiques, qui dépendent principalement du débit sanguin, de la géométrie vasculaire et de la viscosité du sang.

4.1. **Eléments de rhéologie sanguine**

Selon les lois établies par Poiseuille, un fluide newtonien se déplace dans un cylindre selon un flux laminaire, modélisé comme une infinité de couches coaxiales c'est-à-dire dont l'axe de symétrie est identique à celui du cylindre (**Figure 27A**) (**Goldsmith and Turitto, 1986**). En raison de sa viscosité intrinsèque, responsable de frictions entre les différentes couches, un fluide newtonien présente un profil de vitesse parabolique, cette dernière étant maximale au centre et nulle à la paroi (**Figure 27B**). Deux paramètres sont couramment utilisés pour caractériser l'écoulement laminaire :

1) **Le taux de cisaillement**, défini comme le gradient de vitesse relatif entre deux couches de fluide contiguës ou entre la paroi et la couche de fluide immédiatement adjacente. Inversement proportionnel à la vitesse, il est maximal à la paroi et nul au centre du cylindre (**Figure 27B**). Il est estimé d'après l'équation :

$$\gamma(r) = 4.Q.r / (\pi.R^4) \quad \gamma(r) = \text{le taux de cisaillement (s}^{-1}\text{)}$$

$$Q = \text{le débit (m}^3\text{/s)}$$

$$r = \text{la distance par rapport au centre (m)}$$

$$R = \text{le rayon du cylindre (m)}$$

2) **La contrainte de cisaillement**, qui représente la force par unité de surface exercée dans le sens du flux entre deux couches de fluide contiguës ou sur la paroi. Elle est estimée d'après l'équation :

$$\tau(r) = \gamma(r) \cdot \eta \quad \tau(r) = \text{la contrainte de cisaillement (dyne/cm}^2\text{)}$$

$$\gamma(r) = \text{le taux de cisaillement (s}^{-1}\text{)}$$

$$\eta = \text{la viscosité du fluide (poise)}$$

Pour un fluide newtonien, la viscosité ne dépend que de la température et de la pression atmosphérique et est indépendante des conditions de cisaillement. Le sang est un fluide non newtonien car sa viscosité diminue lorsque le taux de cisaillement augmente en raison de la présence des globules rouges et de leur capacité à se déformer (**Goldsmith and Turitto, 1986**). Toutefois, la viscosité varie peu à proximité de la paroi vasculaire et, de ce fait, lorsqu'on s'intéresse aux interactions des plaquettes avec le sous-endothélium, le sang peut être considéré comme un fluide newtonien, de viscosité égale à 0.038 poise (**Kroll et al., 1996; Nesbitt et al., 2006**). Dans ces conditions, on observe que la diminution du rayon (R) vasculaire s'accompagne d'une forte augmentation du taux et de la contrainte de cisaillement à la paroi. Ainsi, leurs valeurs sont faibles dans les veines et les grosses artères, élevées dans les artérioles et la microcirculation et extrêmes au niveau de la gorge d'une sténose (**Tableau 3**) (**Goldsmith and Turitto, 1986; Kroll et al., 1996**).

4.2. Impact du flux sanguin sur les fonctions plaquettaires

Une conséquence importante de l'écoulement du sang est la migration des globules rouges au centre du vaisseau, créant une zone riche en leucocytes et en plaquettes à proximité de la paroi. Ce phénomène, appelé margination, facilite l'interaction des plaquettes avec le sous-endothélium (**Aarts et al., 1988; Goldsmith and Turitto, 1986; Turitto and Weiss, 1980**).

Le flux peut également moduler la conformation des protéines adhésives, modifiant leurs propriétés. Par exemple, les contraintes de cisaillement déplient les molécules de FW globulaires immobilisées au site de lésion, exposant le domaine A1 d'interaction avec la GPIb α (Di Stasio and De Cristofaro, 2010; Siedlecki et al., 1996). Le flux régule aussi les domaines A2 (Zhang et al., 2009) et A3 (Schneider et al., 2007), favorisant leur reconnaissance par respectivement la protéase ADAMTS13 et le collagène.

Enfin, les conditions hémorhéologiques déterminent l'importance relative des récepteurs dans l'adhérence, l'activation et l'agrégation plaquettaires. Alors qu'en présence de flux faibles les intégrines et la GPIb α participent à l'étape initiale de capture des plaquettes, seule la GPIb α , qui possède une cinétique d'association élevée avec le FW, est impliquée dans ce processus en condition de flux élevés (Savage et al., 1996; Varga-Szabo et al., 2008). Par ailleurs, les gradients de cisaillement, observés notamment au niveau d'une sténose (voir section 5.1.2.), augmentent la signalisation initiée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, un processus appelé mécanotransduction (Goncalves et al., 2005). Enfin, les taux de cisaillement extrêmes ($> 10\,000\text{ s}^{-1}$) déclenchent une agrégation plaquettaire médiée par l'axe GPIb α /FW et indépendante d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Moake et al., 1986; Nesbitt et al., 2009; Ruggeri et al., 2006).

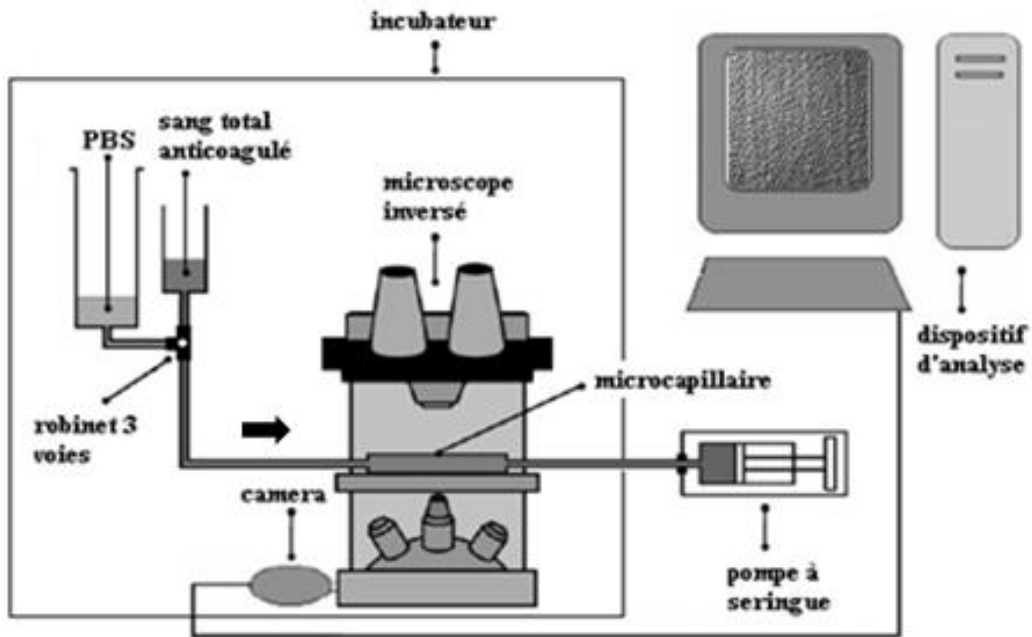
Vaisseaux	Taux de cisaillement moyen à la paroi (s^{-1})	Contrainte de cisaillement moyenne à la paroi (dyne/cm^2)
Veines	20 – 200	0.76 – 7.6
Coronaire gauche	290	11
Carotide commune	270	10.3
Artère fémorale	300	11.4
Artérioles	500 – 1 600	19 – 61
Capillaires	260 – 2 000	10 – 76
Gorge d'une sténose	500 – 20 000	19 – 760

Tableau 3 : Taux et contrainte de cisaillement moyens mesurés à la paroi de différents vaisseaux humains (d'après Gay and Zhang, 2008; Goldsmith and Turitto, 1986; Kroll et al., 1996; Siegel et al., 1994).

4.3. Modèles d'étude des fonctions plaquettaires en condition de flux

Plusieurs systèmes d'étude en condition de flux furent développés au cours des années 1970. Il s'agit notamment du viscosimètre (**Brown et al., 1975**) et du système rotatoire de Cazenave (**Cazenave et al., 1975**), qui permettent d'appliquer des contraintes de cisaillement à une suspension plaquettaire. La première chambre de perfusion fut mise au point par Baumgartner et consiste en un cylindre dans lequel sont placés des segments de vaisseaux animaux éversés dont l'endothélium a été dénudé (**Baumgartner, 1973**). Du sang anti-coagulé est ensuite aspiré à travers le cylindre à l'aide d'une pompe programmable. L'observation des plaquettes adhérentes se fait *a posteriori* par réalisation de coupes histologiques (**Baumgartner, 1973; Baumgartner et al., 1976**). En 1983, Sakariassen développa une chambre de perfusion utilisant des lamelles de verre recouvertes de protéines adhésives purifiées. Les plaquettes adhérentes peuvent cette fois être visualisées directement au microscope (**Sakariassen et al., 1983**). Par la suite sont apparues des chambres présentant une géométrie complexe comme une marche (**Skilbeck et al., 2001**), une bifurcation (**Szymanski et al., 2008**) ou encore une sténose (**Tovar-Lopez et al., 2010**). Les travaux présentés dans cette thèse sont basés sur une variante, développée au début des années 1990, qui utilise des microcapillaires de verre de section rectangulaire recouverts de protéines purifiées (**Cooke et al., 1993; Mulvihill et al., 1987; Poot et al., 1988**). Ceux-ci sont collés sur la platine d'un microscope inversé, et relié par des tubulures en silicone en amont à un réservoir de sang et en aval à une pompe à seringue aspirante. Différents débits peuvent être appliqués afin de reproduire les taux de cisaillement rencontrés dans divers territoires vasculaires. Les plaquettes adhérentes sont visualisées en temps réel par fluorescence ou via différentes techniques en champ clair comme le contraste interférentiel différentiel (DIC). Une caméra CCD (*Charge-coupled device*) couplée au microscope permet l'enregistrement vidéo suivi de l'analyse par un logiciel d'imagerie (**Figure 28**) (**Kulkarni et al., 2004**).

A.



B.

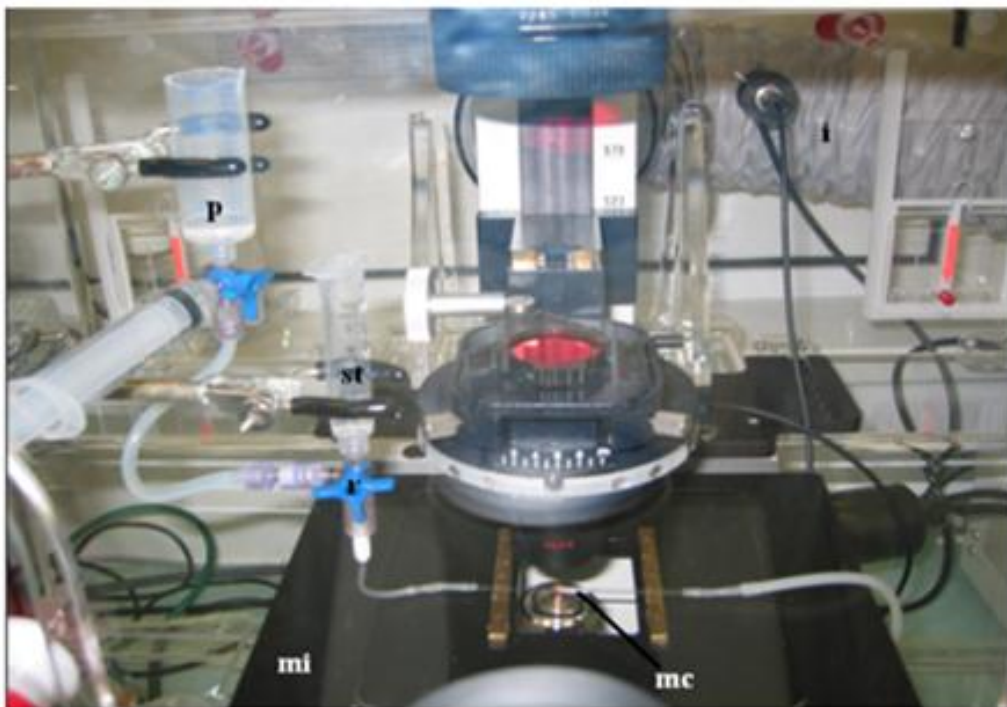


Figure 28 : Schématisation (A) et photographie (B) du dispositif de perfusion de sang au travers de microcapillaires de verre. i, incubateur ; mc, microcapillaire ; mi, microscope inversé ; p, PBS (pour le lavage du système) ; r, robinet trois voies ; st, sang total anticoagulé.

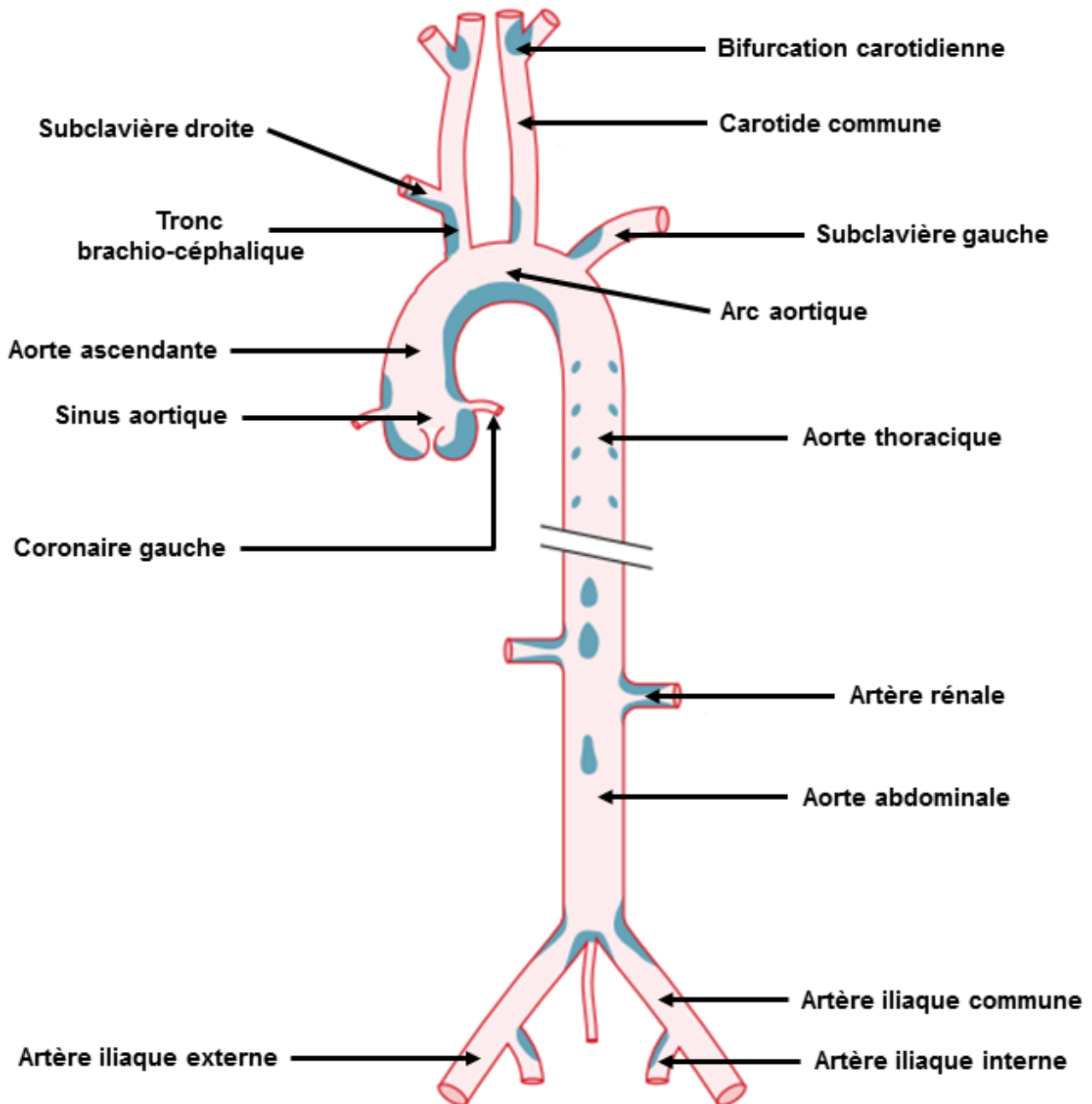


Figure 29 : L'athérosclérose atteint préférentiellement les embranchements et courbures des artères de moyen et gros calibre. Schématisation de l'aorte et ses branches montrant les principales zones développant des plaques d'athérosclérose (en gris) chez les souris déficientes pour le récepteur du LDL nourries avec un régime riche en gras pendant une année (D'après Chiu and Chien, 2011).

5. La thrombose artérielle

La thrombose artérielle est la complication majeure et la plus grave de l'athérosclérose, un processus pathologique au cours duquel une artère est graduellement épaissie par une plaque fibreuse puis calcifiée.

5.1. L'athérosclérose

5.1.1. Physiopathologie

Proposé par le médecin allemand Felix Marchand en 1904 (**Marchand, 1904**), le terme athérosclérose désigne une pathologie complexe et dégénérative de la paroi des artères de moyen et gros calibre telles que l'aorte, les coronaires, les carotides et les fémorales (**Libby et al., 2011; Sabbah and Lacotte, 2011**). L'athérosclérose se développe sur plusieurs décennies et est favorisée par de nombreux facteurs, notamment la sédentarité, le tabagisme, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie et le diabète (**Sabbah and Lacotte, 2011**).

L'athérosclérose atteint préférentiellement les embranchements et courbures artérielles, où les conditions hémorhéologiques sont perturbées, favorisant l'infiltration dans l'intima de lipides comme les LDL suivie de leur oxydation (**Figure 29 et 30A**) (**Chiu and Chien, 2011; Tabas et al., 2007**). Ceci induit une dysfonction endothéliale, caractérisée par l'expression de molécules d'adhérence pour les leucocytes, particulièrement les monocytes. Après diapédèse, ces derniers se différencient en macrophages phagocytant les LDL oxydées pour former des cellules spumeuses (**Figure 30B**) (**Berliner and Watson, 2005; Libby, 2002; Libby et al., 2011**). Ainsi se constituent, dès l'adolescence, les premières lésions d'athérosclérose ou stries lipidiques, qui s'organisent progressivement en un « cœur » riche en cristaux de cholestérol et débris de cellules apoptotiques. Parallèlement, la sécrétion de cytokines et facteurs de croissance par les macrophages spumeux induit la migration des CML de la média vers l'intima où elles prolifèrent. De plus, les CML acquièrent un phénotype sécrétoire et produisent une MEC constituant une chape fibreuse qui stabilise la plaque en

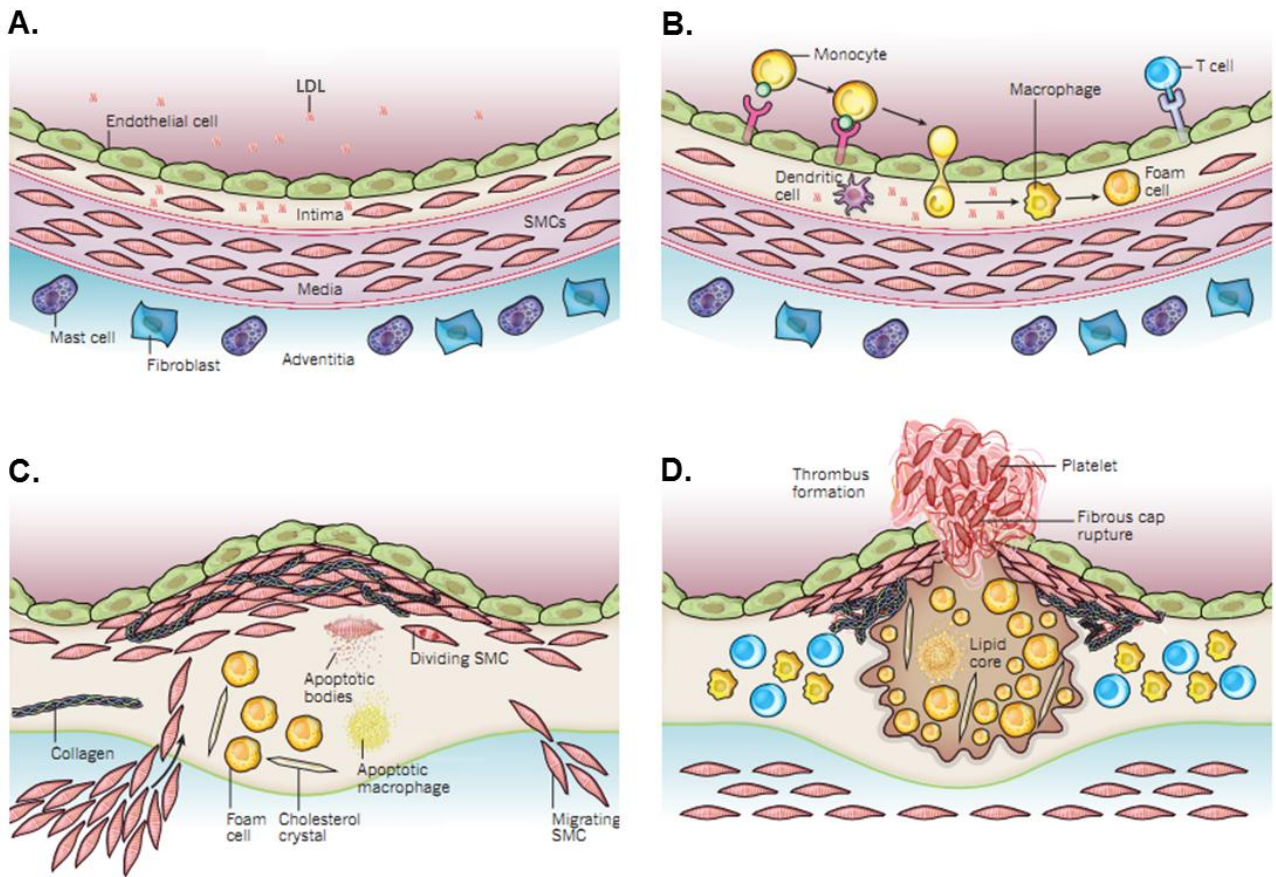


Figure 30 : Schématisation des principales étapes du développement de l'athérosclérose.
 LDL, *low density lipoproteins* ; SMCs, *smooth muscle cells* (D'après Libby et al., 2011).

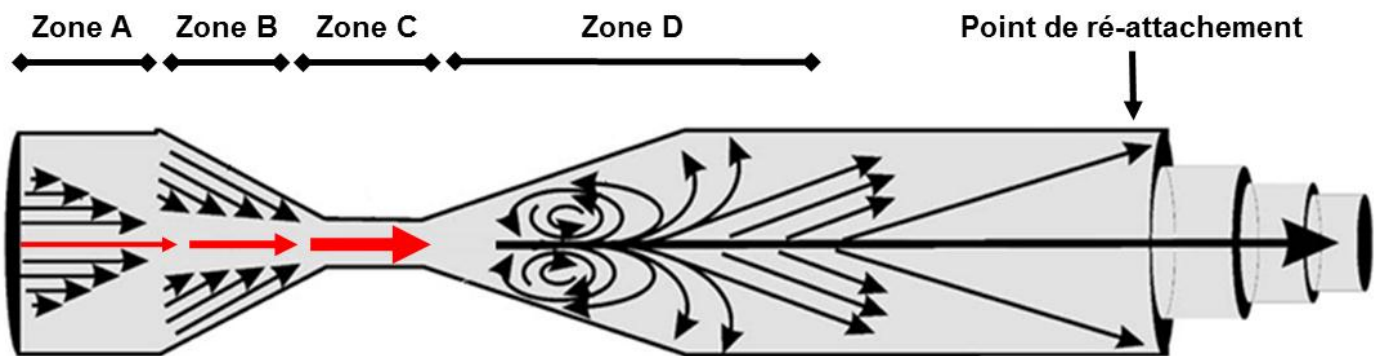


Figure 31 : Représentation des profils de vitesse du flux sanguin au niveau d'une sténose. Le point de ré-attachement correspond à la zone où l'écoulement redevient laminaire (d'après Nesbitt et al., 2006).

isolant le cœur lipidique de la lumière de l'artère (**Libby, 2002; Libby et al., 2011**). Ce stade correspond à la plaque d'athérosclérose fibro-lipidique, observée chez de nombreux individus à partir de 40 ans (**Figure 30C**) (**Sabbah and Lacotte, 2011**). Ultérieurement, l'accumulation continue de lipides peut conduire à la dégradation de la chape par des *matrix metalloproteinases* (MMP) et à l'apoptose massive des CML (**Libby, 2002; Libby et al., 2011**). Ceci fragilise la plaque, qui est alors particulièrement sujette à une érosion de l'endothélium ou la rupture, conduisant à la formation d'un thrombus (**Figure 30D**) (**Shah, 2003**).

5.1.2. Impact de l'athérosclérose sur la rhéologie sanguine

Aux étapes précoces, le développement d'une plaque ne rétrécit pas la lumière de l'artère car cette dernière s'adapte par un élargissement compensatoire appelé remodelage excentrique (**Libby, 2002; Sabbah and Lacotte, 2011**). Lorsque la plaque devient trop volumineuse, ce processus n'est plus suffisant et une sténose apparaît, qui a pour conséquence de diminuer le débit sanguin et modifier profondément les conditions hémorhéologiques locales (**Nesbitt et al., 2006**). Une décélération du flux sanguin survient dans la région pré-sténotique (**Figure 31, zone A**), suivie d'une accélération (**Figure 31, zone B**) avec des vitesses extrêmes au niveau de la gorge de la sténose (**Figure 31, zone C**). Enfin, la région post-sténotique présente des flux très perturbés caractérisés par des turbulences, avec des zones de stase et de flux inverses et oscillatoires (**Figure 31, zone D**) (**Gay and Zhang, 2008; Nesbitt et al., 2006; Siegel et al., 1994**).

5.1.3. Impact de l'athérosclérose sur la composition de la paroi artérielle

Les plaques d'athérosclérose contiennent un matériel fortement thrombogène incluant des lipides activateurs des plaquettes comme l'acide lysophosphatidique (**Oliver and Davies, 1998**), du facteur tissulaire (**Mackman, 2004**) et des concentrations élevées de collagènes

fibrillaires (**Katsuda et al., 1992; van Zanten et al., 1994**). D'autres protéines adhésives sont également surexprimées dans les plaques, notamment les LN221, 511 et 521 (**Rauch et al., 2011**), les TSP-1 et -4 (**Frolova et al., 2010; Moura et al., 2008**) et la vitronectine (**van Aken et al., 1997**). Enfin, les plaques renferment des isoformes particulières telles que des variants d'épissage de la fibronectine contenant les domaines EDA et/ou EDB (**Figure X**) (**Glukhova et al., 1989; Matter et al., 2004; Pedretti et al., 2010**), et de nombreuses protéines absentes du sous-endothélium sain comme l'ostéonectine, l'ostéopontine (**Dhore et al., 2001**), la périostine (**Bagnato et al., 2007**) ou encore la TN-C (**Kenji et al., 2004; Pedretti et al., 2010; von Lukowicz et al., 2007; Wallner et al., 1999**).

5.1.4. La TN-C, une glycoprotéine de la MEC surexprimée dans les plaques d'athérosclérose

La TN-C est une glycoprotéine de la MEC des vertébrés composée de monomères s'associant par des ponts disulfures en un hexamère de grande taille appelé hexabrachion (**Figure 32A**) (**Jones and Jones, 2000**). Chaque monomère, dont le poids moléculaire fluctue entre 180 et 320 kDa selon le type d'épissage, est formé de l'assemblage de 4 types de domaines (**Figure 32B**). La courte région N-terminale, riche en cystéines, permet l'oligomérisation de la TN-C par des ponts disulfures. Elle est suivie de 14,5 répétitions d'un module de type EGF, puis de 8 répétitions d'un motif fibronectine de type III (FN-III) contenant de nombreux sites de N-glycosylation. Neuf répétitions FN-III supplémentaires peuvent être ajoutées par épissage alternatif, générant une grande variété d'isoformes (**Jones and Jones, 2000**). Les domaines FN-III interagissent avec de multiples molécules de la MEC parmi lesquelles des facteurs de croissance (**Bornstein and Sage, 2002**), les collagènes (**Jones and Jones, 2000**), les fibronectines (**Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003**) et des glycosaminoglycanes (**Weber et al., 1995**). Ces domaines lient également des récepteurs de la famille des immunoglobulines (**Zisch et al., 1992**) et des intégrines (**Joshi et al., 1993; Schnapp et al., 1995; Yokosaki et al., 1994**). Enfin, la région globulaire C-terminale est similaire aux chaînes β et γ du fibrinogène et comporte un site de liaison du Ca^{2+} de type EF-hand. Il a été montré que cette région lie certaines intégrines (**Joshi et al., 1993; Yokoyama et al., 2000**) ainsi que l'héparine (**Fischer et al., 1995**).

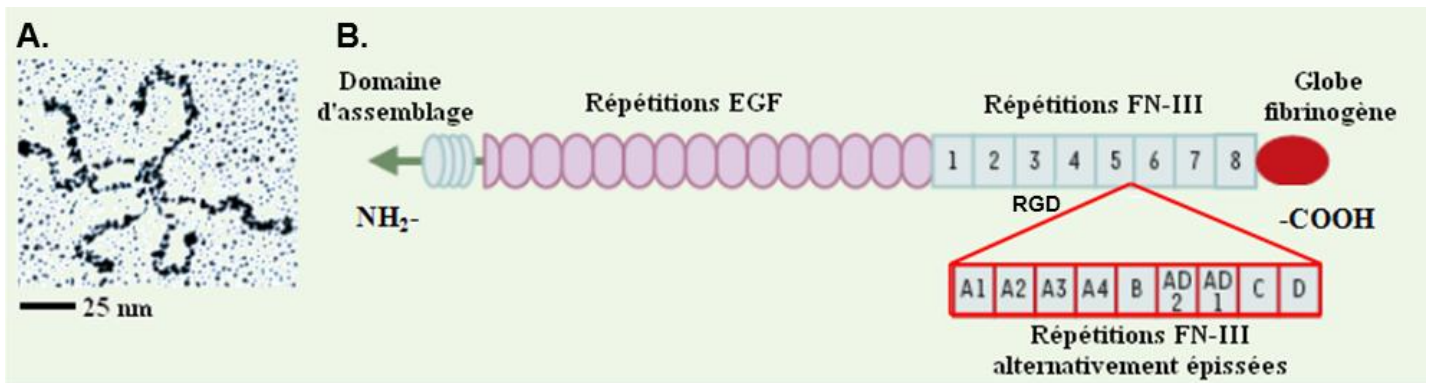


Figure 32 : Image de microscopie électronique à transmission d'un hexabrachion de TN-C obtenue par une technique d'ombrage rotatoire (A) et schématisation d'un monomère de TN-C (B) (d'après Jones and Jones, 2000).

De nombreux types cellulaires ont été décrits pour synthétiser la TN-C, notamment les fibroblastes (Jones and Jones, 2000), les macrophages (Wallner et al., 1999), les CML (Mackie et al., 1992), les mégacaryocytes (Tablin et al., 1998) et certaines lignées tumorales (Jones and Jones, 2000). Des quantités élevées de TN-C sont exprimées durant l'ontogenèse, particulièrement lors de la mise en place des systèmes nerveux, squelettique et vasculaire (Garcion et al., 2002; Hsia and Schwarzbauer, 2005). En revanche, cette protéine est peu présente chez l'adulte sauf au niveau des tendons, des ligaments et en faible quantité dans le sang (1 µg/mL) (Hsia and Schwarzbauer, 2005; Schienk et al., 1995). La TN-C est surexprimée lors du processus de cicatrisation et dans des situations pathologiques, au cours d'états infectieux ou inflammatoires ou encore durant la progression tumorale (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003; Midwood and Orend, 2009).

Bien que la TN-C présente une distribution spatio-temporelle finement régulée et une structure très conservée chez les vertébrés, sa délétion n'induit aucun défaut majeur chez la souris (Hsia and Schwarzbauer, 2005; Saga et al., 1992). Une explication serait l'existence d'une redondance fonctionnelle avec d'autres ténascines, notamment celle de type X (Hsia and Schwarzbauer, 2005; Jones and Jones, 2000).

Alors que la TN-C est absente de la paroi vasculaire saine, plusieurs travaux font état de sa surexpression dans les plaques d'athérosclérose, principalement celles qui sont évoluées et instables voire rompues (Kenji et al., 2004; Pedretti et al., 2010; von Lukowicz et al., 2007; Wallner et al., 1999). *In vitro*, la TN-C stimule la sécrétion de MMP par les macrophages et les CML (Wallner et al., 1999; Wallner et al., 2004), et induit l'apoptose

des CML (Wallner et al., 2004), suggérant qu'elle pourrait contribuer à la fragilisation des plaques. De manière surprenante, de récentes études chez la souris ont révélé que la TN-C limite l'étendue des lésions d'athérosclérose, en partie en réduisant la diapédèse monocytaire et l'inflammation (Wang et al., 2007; Wang et al., 2012).

Initialement, la TN-C était considérée comme une protéine antiadhésive en raison de sa capacité à promouvoir le détachement des cellules *in vitro*, qui passent d'un état de forte adhérence à un état d'adhérence intermédiaire à la matrice (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003). Cette propriété facilite des fonctions telles que la migration ou l'apoptose et jouerait un rôle important lors des remaniements tissulaires (Jones and Jones, 2000). Le mode d'action de la TN-C peut être direct via sa liaison à des récepteurs membranaires, entraînant une signalisation menant à une réorganisation du cytosquelette ou une expression génique. La TN-C peut aussi agir indirectement en empêchant la liaison d'autres protéines matricielles aux cellules. Il a par exemple été montré que la TN-C masque des sites de liaison de l'héparine (Fischer et al., 1995) et de la fibronectine (Orend and Chiquet-Ehrismann, 2000).

A l'inverse, la TN-C a également été décrite pour posséder des propriétés adhésives, favorisant la croissance, la prolifération ou encore la survie des cellules (Jones and Jones, 2000; Orend and Chiquet-Ehrismann, 2000). Cela est le cas pour les cellules endothéliales, qui adhèrent et s'étalent sur une matrice de TN-C par l'intermédiaire des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_2\beta_1$ (Joshi et al., 1993; Sriramarao et al., 1993), et certaines lignées tumorales, qui y adhèrent via d'autres intégrines, notamment $\alpha_8\beta_1$ et $\alpha_9\beta_1$ (Prieto et al., 1992; Schnapp et al., 1995; Yokosaki et al., 1996; Yokosaki et al., 1994). Enfin, la TN-C permet l'attachement des lymphocytes en condition de flux faibles (Clark et al., 1997).

5.1.5. Les complications de l'athérosclérose

L'athérosclérose débute dès l'enfance et évolue pendant longtemps de façon asymptomatique. Les premières complications peuvent être liées à la sténose qui accompagne la progression d'une plaque. La diminution du débit sanguin entraîne une souffrance des tissus en aval de la lésion pouvant se traduire par des douleurs, par exemple une angine de

poitrine lorsqu'il y a obstruction d'une artère coronaire (**Baudry, 2011; Sabbah and Lacotte, 2011**). Ultérieurement, l'érosion ou la rupture d'une plaque peut conduire à l'occlusion d'une artère par un thrombus ou un embolie. Ceci entraîne une nécrose tissulaire, dont les principales manifestations sont les syndromes coronariens aigus (angine de poitrine instable, infarctus du myocarde, mort subite), les accidents vasculaires cérébraux et les ischémies aiguës des membres inférieurs (**Jackson, 2011; Jobin, 1995b; Sabbah and Lacotte, 2011**).

Le coût socio-économique des complications de l'athérosclérose est considérable. Responsable de la majorité des 17.3 millions de décès d'origine cardiovasculaire en 2008, la thrombose artérielle représente la première cause de mortalité dans le monde (**Figure 33**) (**OMS, 2011**). En raison d'une forte progression dans les pays émergents, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que plus de 23 millions d'individus décéderont des suites d'un infarctus du myocarde ou d'une ischémie cérébrale en 2030 (**OMS, 2011**). Par ailleurs, la thrombose artérielle est une cause majeure d'invalidité, notamment d'insuffisance cardiaque et de démence (**Sabbah and Lacotte, 2011**). Concernant l'impact économique des maladies cardiovasculaires, celles-ci représentent le poste le plus important des dépenses de santé des pays développés. En France, leur coût pour le régime général a été évalué à 17,9 milliards d'euros en 2007 (**Sécurité Sociale, 2010**).

Total : 56 millions

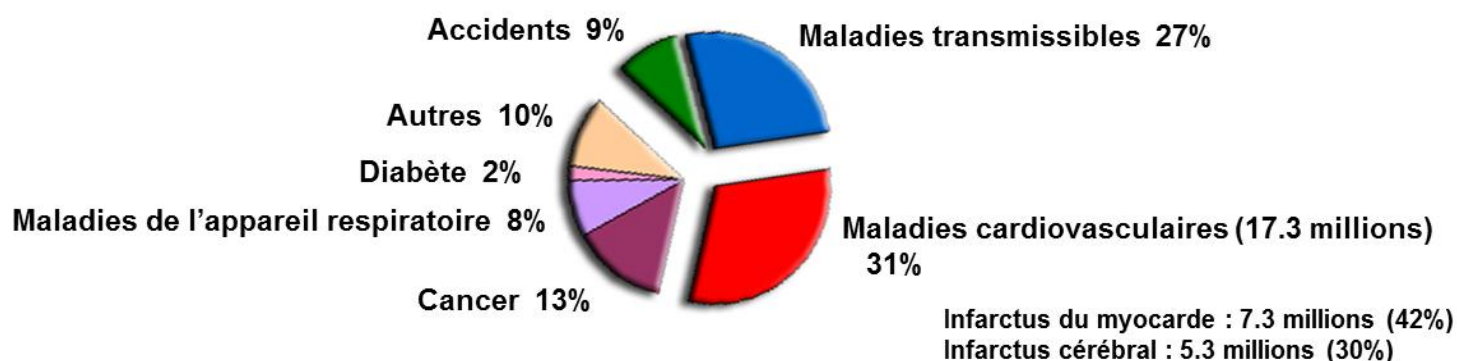


Figure 33 : Principales causes de décès dans le monde en 2008 (d'après l'OMS, 2011).

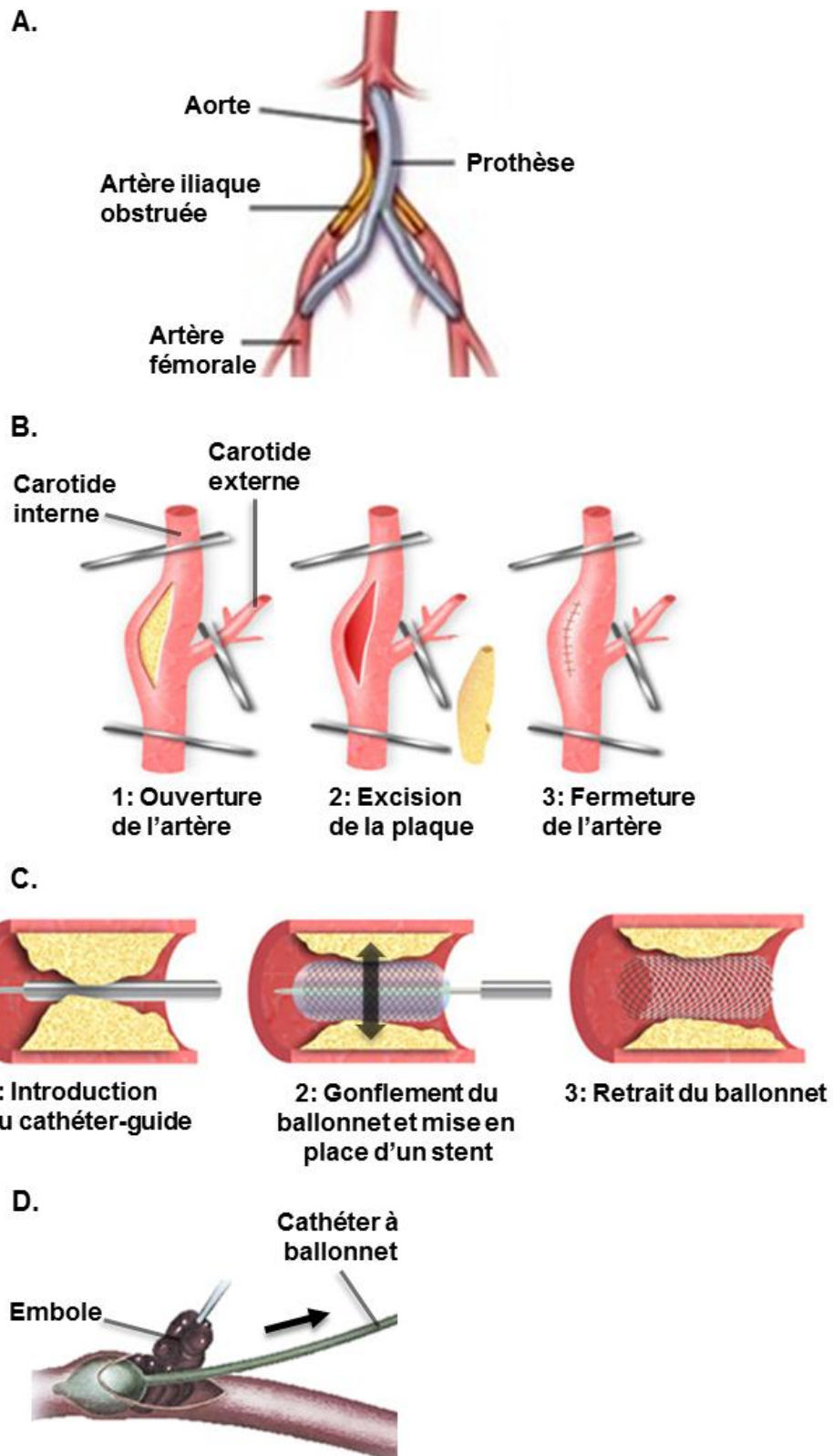


Figure 34 : Principales techniques de revascularisation chirurgicale. Schématisation d'un pontage aorto-fémoral (A), d'une endartériectomie carotidienne (B), d'une angioplastie avec pose de stent (C) et d'une embolectomie par la méthode de Fogarty (D) (Adapté de Baudry, 2011; Sabbah and Lacotte, 2011).

5.2. Traitement et prévention de la thrombose artérielle

Le traitement de la thrombose artérielle est fonction de sa localisation et de sa sévérité, et associe deux approches complémentaires, la chirurgie et les médicaments, afin de désobstruer l'artère et prévenir sa ré-occlusion (**Baudry, 2011; Sabbah and Lacotte, 2011**). Ces thérapies sont aussi employées dans un but préventif chez les patients à haut risque thrombotique comme ceux souffrant d'angine de poitrine ou avec un antécédent d'infarctus cardiaque ou cérébral.

5.2.1. Les interventions chirurgicales

Le pontage est une procédure fréquemment employée pour traiter les obstructions des artères coronaires et de la cuisse, comme l'iliaque et la fémorale (**Figure 34A**) (**Sabbah and Lacotte, 2011**). Il s'agit de court-circuiter la portion sténosée en interposant une prothèse ou un greffon, généralement un court segment artériel ou veineux prélevé dans le thorax ou la jambe. Le greffon étant relié en amont à l'aorte ou l'une de ses branches, on parle de pontage aorto-coronaire ou aorto-fémoral. Concernant la sténose carotidienne, la technique de référence est l'endarterectomie, qui consiste à ouvrir la paroi artérielle afin d'en exciser les couches internes contenant la plaque d'athérosclérose (**Figure 34B**) (**Baudry, 2011; Sabbah and Lacotte, 2011**).

Beaucoup moins invasives et plus rapides, les interventions transluminales percutanées sont de plus en plus employées, quelle que soit l'artère (coronaire, carotide, iliaque ou fémorale) (**Sabbah and Lacotte, 2011**). Elles utilisent un tube flexible appelé cathéter-guide, qui est introduit dans la circulation par une petite incision, souvent au niveau de l'aîne, puis dirigé jusqu'au rétrécissement artériel. A son extrémité, le cathéter comporte un ballonnet dont le gonflement permet de comprimer la plaque d'athérosclérose et d'élargir l'artère (**Figure 34C**). Cette procédure, appelée angioplastie, est généralement complétée par l'implantation d'une endoprothèse métallique cylindrique comparable à un ressort (stent), afin de maintenir l'artère ouverte après retrait du ballonnet (**Figure 34C**) (**Baudry, 2011; Sabbah and Lacotte, 2011**). L'athérectomie est une variante dans laquelle le cathéter est doté d'une

lame ou d'une fraiseuse permettant d'éliminer la plaque par meulage (Baudry, 2011; Sabbah and Lacotte, 2011). Concernant les embolies obstruant une artère d'un membre, elles peuvent être extraites par la méthode dite de Fogarty. Celle-ci utilise un cathéter à ballonnet, qui est introduit dans l'artère en amont de l'obstruction, puis poussé en aval de l'embolie. Le ballonnet est alors gonflé, puis le cathéter est retiré de façon à ramener les embolies jusqu'au point d'incision (Figure 34D) (Sabbah and Lacotte, 2011).

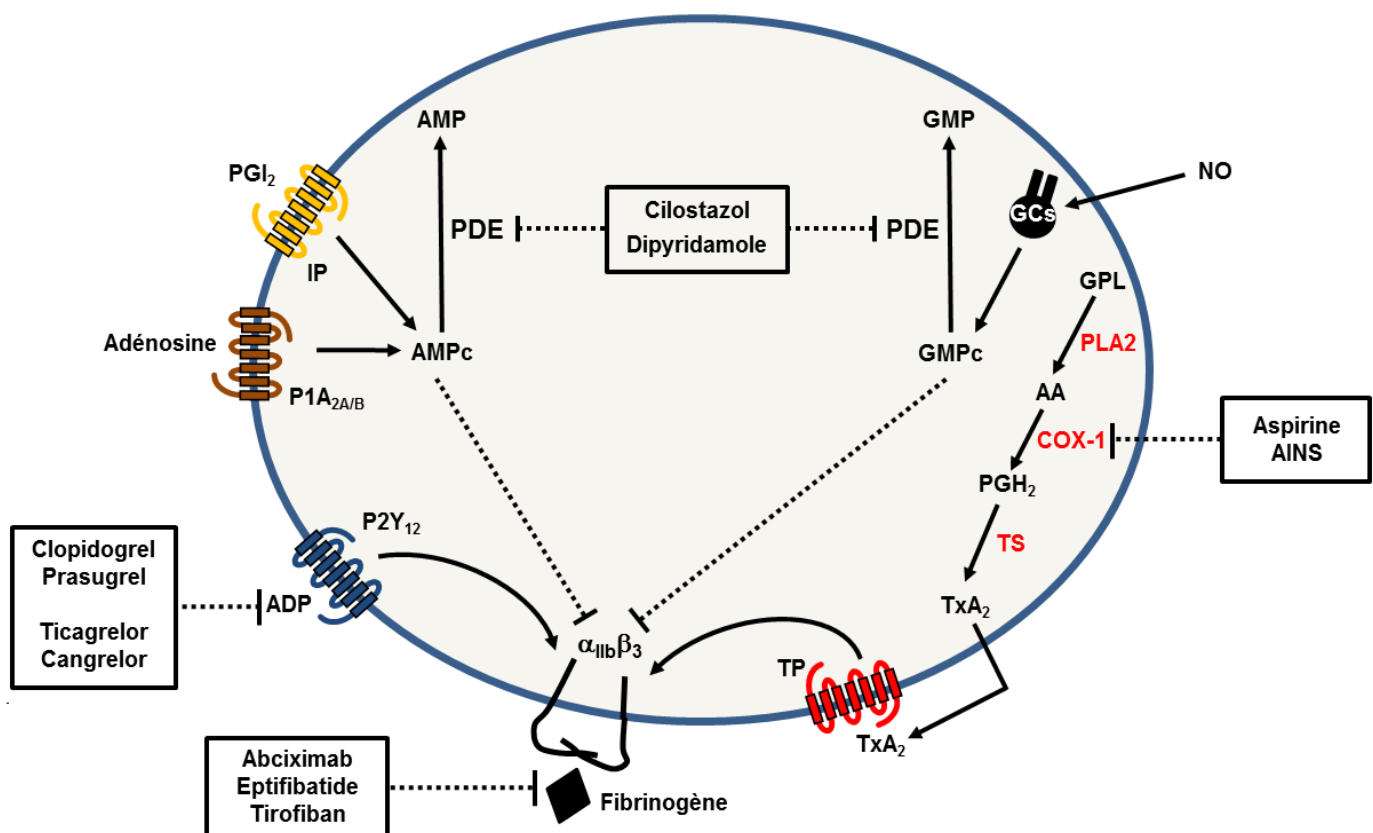


Figure 35 : Mécanisme d'action des antiplaquettaires actuellement utilisés en clinique.

AA, acide arachidonique ; AINS, anti-inflammatoires non stéroïdiens ; AMP, adénosine 5'-monophosphate ; AMPc, adénosine 3',5'-monophosphate cyclique ; COX-1, cyclo-oxygénase-1 ; GCS, guanylate cyclase soluble ; GMP, guanosine 5'-monophosphate ; GMPc, guanosine 3',5'-monophosphate cyclique ; GPL, glycérophospholipides ; IP, *prostacyclin receptor* ; NO, monoxyde d'azote ; PDE, phosphodiesterase des nucléotides cycliques ; PGH₂, prostaglandine H₂ ; PGI₂, prostacycline ; PLA2, phospholipase A2 ; TP, *thromboxane/prostaglandin receptor* ; TS, thromboxane synthétase.

5.2.2. Les antiplaquettaires

Les antiplaquettaires représentent la pierre angulaire de la prise en charge médicamenteuse de la thrombose artérielle. Ils sont particulièrement indiqués lors des syndromes coronariens aigus, chez les patients subissant une intervention transluminale percutanée, et en prévention secondaire après un premier accident ischémique (**Sabbah and Lacotte, 2011; Yousuf and Bhatt, 2011**). Les antiplaquettaires ciblent l'agrégation plaquettaire, qu'ils bloquent soit directement (antagonistes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$), soit indirectement en réduisant l'activation des plaquettes (antagonistes du récepteur P2Y₁₂, inhibiteurs des COX ou des phosphodiésterases des nucléotides cycliques (PDE)) (**Figure 35**) (**Bhatt and Topol, 2003; Yousuf and Bhatt, 2011**). Afin d'obtenir un effet additif, ces molécules sont fréquemment associées entre elles et/ou à un anticoagulant, qui peut être l'héparine ou un inhibiteur du facteur Xa comme le fondaparinux (**Baudry, 2011; Sabbah and Lacotte, 2011**). Dans de rares cas, un thrombolytique peut aussi être utilisé, essentiellement à la phase aiguë d'un infarctus cérébral (**Baudry, 2011; Sabbah and Lacotte, 2011; Stoll et al., 2008**). Il s'agit généralement d'une forme recombinante du t-PA comme l'altéplase.

5.2.2.1. Les inhibiteurs des COX

Les inhibiteurs des COX sont représentés par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), dont le chef de file est l'acide acétylsalicylique, plus connu sous le nom d'aspirine. Ils inhibent indistinctement les deux formes de COX quel que soit le type cellulaire et possèdent, outre leurs propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires, une activité antiagrégante (**Landry and Gies, 2006**).

Depuis plus de 40 ans, l'aspirine est l'antiplaquettaire de première intention (**Mackman, 2008**). Administrée oralement, elle est rapidement et presque complètement absorbée au niveau de l'estomac et du duodénum (**Patrono et al., 2005**). L'aspirine est une pro-drogue, qui est hydrolysée par des estérases de la muqueuse gastro-intestinale et du foie en acide salicylique. En acétylant irréversiblement un résidu sérine de la COX-1 plaquettaire, l'acide salicylique empêche la synthèse de TxA₂ et réduit l'activation et l'agrégation des plaquettes (**Figures 11 et 35**) (**Patrono et al., 2005**). Le bénéfice de l'aspirine sur la réduction

des décès a été démontré à la fois pour les syndromes coronariens aigus et en prévention secondaire après un infarctus myocardique ou cérébral (**Bhatt and Topol, 2003**). Son intérêt en prévention primaire reste controversé en raison notamment d'une augmentation du risque de saignement (**Bartolucci et al., 2011; Yousuf and Bhatt, 2011**). En France, l'aspirine est recommandée en prévention primaire lorsque le risque cardiovasculaire, apprécié avec des scores multifactoriels, est élevé (**Haute Autorité de Santé, 2012**). En pratique, l'aspirine est administrée à des doses faibles comprises entre 75 et 100 mg/jour, celles plus élevées n'ayant pas montré de supériorité clinique (**Patrono et al., 2005; VIDAL, 2012; Yousuf and Bhatt, 2011**). Par ailleurs, cela permet de préserver la synthèse de PGI₂ par la COX-2 endothéliale et de limiter la toxicité gastrique et rénale.

Les autres AINS comme le naproxène et le flurbiprofène inhibent réversiblement et de manière très variable la COX-1. Seul le flurbiprofène (Cébutid[®]) est utilisé comme antiplaquettaire, avec un emploi limité à la prévention secondaire lorsque l'aspirine est contre-indiquée (**Avouac et al., 2003; VIDAL, 2012**).

5.2.2.2. Les antagonistes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Les antagonistes d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ inhibent directement l'agrégation en empêchant la liaison du fibrinogène, de la fibrine et du FW aux plaquettes activées (**Figure 35**) (**Mackman, 2008; Michelson, 2010**). Trois molécules sont couramment utilisées : l'abciximab (ReoPro[®]), composé du fragment Fab (*Antigen-binding*) recombinant d'un anticorps monoclonal murin humanisé (c7E3), l'éptifibatide (Integrilin[®]), un heptapeptide cyclique contenant une séquence KGD, et le tirofiban (Agrastat[®]), une petite molécule non peptidique dérivée de la tyrosine (**Bhatt and Topol, 2003**). Ces médicaments doivent être administrés par voie intraveineuse et sont par conséquent réservés à l'usage hospitalier (**VIDAL, 2012**). Les anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ sont des anti-thrombotiques très efficaces, utilisés dans la prise en charge des syndromes coronariens aigus et des patients subissant une intervention coronarienne percutanée (**Sabbah and Lacotte, 2011; VIDAL, 2012; Yousuf and Bhatt, 2011**). Leur principale limite est qu'ils induisent un fort risque hémorragique, empêchant notamment leur utilisation en traitement chronique (**Yousuf and Bhatt, 2011**). Une thrombopénie est par ailleurs observée chez 3 à 4% des patients sous abciximab (**Le Beller and Alhenc-Gelas, 2004**). Le développement d'anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ actifs par voie orale a été abandonné en raison d'un effet paradoxal activateur des plaquettes augmentant le taux de mortalité (**Bhatt and Topol, 2003**).

5.2.2.3. Les antagonistes du récepteur P2Y₁₂

Les antagonistes du récepteur P2Y₁₂ inhibent l'amplification de l'activation et de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. Ces médicaments comprennent les thiénoypyridines et des agents plus récents comme le ticagrelor et le cangrelor (**Figure 35**) (**Yousuf and Bhatt, 2011**).

La famille des thiénoypyridines regroupe trois générations de molécules administrées par voie orale. Ce sont toutes des pro-drogues, qui sont transformées par des enzymes hépatiques telles que les cytochromes P450 (CYP) et les estérases en métabolites actifs inhibant irréversiblement le récepteur P2Y₁₂ (**Gachet, 2006; Savi et al., 2006; Yousuf and Bhatt, 2011**). La ticlopidine (Ticlid[®]) est l'ancêtre historique mais du fait de nombreux effets indésirables, notamment un risque de neutropénie, n'est presque plus employée aujourd'hui (**Bhatt and Topol, 2003**). Commercialisé au début des années 2000, le clopidogrel (Plavix[®]) est un anti-thrombotique puissant et efficace, mais n'est administré qu'à des doses inhibant 40 à 50 % de l'agrégation plaquettaire à l'ADP afin de minimiser le risque hémorragique (**Bhatt and Topol, 2003; Gachet, 2006; Jackson and Schoenwaelder, 2003**). Actuellement, la combinaison clopidogrel/aspirine constitue le traitement de référence des syndromes coronariens aigus et des patients subissant une intervention transluminale percutanée comme l'angioplastie avec pose de stent (**Bhatt et al., 2006; Bhatt and Topol, 2003; Haute Autorité de Santé, 2012; VIDAL, 2012; Yousuf and Bhatt, 2011**). Comparée aux anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$, cette bithérapie présente un risque de saignement inférieur pour une efficacité la plupart du temps comparable (**Sabbah and Lacotte, 2011; Yousuf and Bhatt, 2011**).

Le clopidogrel occupe une place majeure dans l'arsenal thérapeutique ; cependant, il existe une hétérogénéité de réponse à cette molécule, qui procure un niveau de protection insuffisant chez 20 à 30 % des patients (**Sofi et al., 2010; Yousuf and Bhatt, 2011**). Cette variabilité est souvent due au fait que ces derniers sont porteurs de variants génétiques non fonctionnels de certains CYP impliqués dans l'activation métabolique du clopidogrel, en particulier le CYP2C19 (**Choi and Kermode, 2011; Fabre and Gurney, 2010; Yousuf and Bhatt, 2011**). Un polymorphisme d'une estérase, la paraoxonase-1, a également été proposé (**Bouman et al., 2011**) mais est controversé (**Camps et al., 2011; Cuisset et al., 2011**). Une limite majeure du clopidogrel est que seulement 15% environ de la quantité administrée est effectivement transformée en métabolite actif (**Choi and Kermode, 2011; Yousuf and Bhatt, 2011**). Métabolisées différemment et plus efficacement, les thiénoypyridines de dernière

génération comme le prasugrel (Efient[®]) pourraient représenter des alternatives intéressantes. Le prasugrel a démontré une efficacité clinique supérieure au clopidogrel et possède aussi un délai d'action plus court, mieux adapté aux situations aiguës (**Choi and Kermode, 2011; Haute Autorité de Santé, 2012; Wiviott et al., 2008; Wiviott et al., 2007; Yousuf and Bhatt, 2011**). Cependant, les patients sous prasugrel ont également un risque hémorragique plus élevé (**Wiviott et al., 2007**).

Le ticagrelor, le cangrelor et l'élinogrel sont de nouvelles molécules aux structures variées, qui inhibent directement et réversiblement le récepteur P2Y₁₂ et se caractérisent par un délai et une durée d'action courts (**Choi and Kermode, 2011; Yousuf and Bhatt, 2011**). Le ticagrelor est administré oralement et présenterait un meilleur rapport bénéfice/risque que le clopidogrel, particulièrement dans le traitement des syndromes coronariens aigus (**Choi and Kermode, 2011; Haute Autorité de Santé, 2012; Yousuf and Bhatt, 2011**). En décembre 2010, il a obtenu l'autorisation de mise sur le marché sous le nom de marque Brilique[®]. Le cangrelor (AR-C69931MX) est un analogue structural de l'ATP administré par voie intraveineuse, qui est en cours d'évaluation (**Choi and Kermode, 2011; Yousuf and Bhatt, 2011**). Concernant l'élinogrel, son développement a été suspendu en janvier 2012 après que les premières études cliniques n'ont pu établir sa supériorité par rapport au clopidogrel (**Novartis, 2012; Welsh et al., 2012; Yousuf and Bhatt, 2011**).

5.2.2.4. Les inhibiteurs des PDE

En réponse à la PGI₂, à l'adénosine et au NO, les plaquettes et les CML produisent des nucléotides cycliques comme l'AMPc et la guanosine 3',5'-monophosphate cyclique (GMPc) (**Landry and Gies, 2006**). Ces seconds messagers mènent à l'inhibition des fonctions plaquettaires et la relaxation des CML (**Johnston-Cox et al., 2011; Schwarz et al., 2001**). En inhibant les PDE impliquées dans leur dégradation, des agents tels que le cilostazol et le dypiridamole produisent un effet antiagrégant et vasodilatateur (**Figure 35**). De plus, ces deux molécules augmentent la concentration plasmatique d'adénosine en bloquant sa recapture par les globules rouges, les plaquettes et les cellules endothéliales (**Yeung and Holinstat, 2012**). Associé à l'aspirine, le dypiridamole est efficace en prévention secondaire après un infarctus cérébral, avec un risque hémorragique minime (**Choi and Kermode, 2011; Verro et al., 2008; VIDAL, 2012**). Concernant le cilostazol, il est principalement utilisé dans le traitement des ischémies des membres inférieurs (**Choi and Kermode, 2011**). Administré de façon

chronique, cet agent inhiberait également la progression des plaques d'athérosclérose en diminuant la dysfonction endothéliale (Lee et al., 2005; Yoshikawa et al., 2008).

5.2.3. Considérations socio-économiques et industrielles

5.2.3.1. Impact socio-économique des antiplaquettaires

Les antiplaquettaires ont prouvé leur efficacité et, combinés à la chirurgie et aux mesures hygiéno-diététiques comme la lutte antitabac, ont contribué à une réduction remarquable de la morbi-mortalité d'origine cardiovasculaire (Muller-Nordhorn et al., 2008; Wagner et al., 2011). En France, on estime qu'entre 1995 et 2005 l'amélioration des traitements a permis de diminuer de moitié la mortalité par infarctus du myocarde (Danchin et al., 2007). Cette baisse, également observée dans d'autres pays occidentaux (Muller-Nordhorn et al., 2008), se poursuivrait depuis à un rythme de 5% par an environ (Wagner et al., 2011). Parallèlement, le segment des antiplaquettaires est devenu très stratégique pour l'industrie pharmaceutique. Alors que les ventes mondiales d'antiplaquettaires avoisinaient les 3 milliards d'euros en 2001 (Collins and Hollidge, 2003), elles se sont élevées à plus de 11 milliards d'euros en 2010 (Huber et al., 2011). Cette croissance soutenue a largement contribué à la compétitivité et la performance de certains grands industriels. Le cas du clopidogrel est emblématique : second médicament le plus vendu au monde en 2010 avec environ 8 milliards d'euros de revenus (Huber et al., 2011), il a participé à hauteur de respectivement 7 et 34% au chiffre d'affaires de Sanofi-Aventis et Bristol-Myers Squibb (Bristol-Myers Squibb, 2011; Sanofi-Aventis, 2011). Porté par le vieillissement de la population, la mondialisation et l'accès grandissant aux soins des populations des pays émergents, le marché des antiplaquettaires devrait dépasser les 14 milliards d'euros à l'horizon 2015 (Visiongain, 2012).

5.2.3.2. La recherche médicamenteuse face aux mutations de l'industrie pharmaceutique

L'industrie pharmaceutique a longtemps basé son modèle de croissance sur le succès de quelques produits vedettes, les *blockbusters* (Gallot et al., 2009). Elle doit aujourd'hui

affronter un important déficit d'innovation et une concurrence accrue des médicaments génériques liée à l'expiration des principaux brevets, notamment celui protégeant le clopidogrel. Face à ces évolutions, les grands groupes ont repensé leur stratégie et adopté une politique d'acquisitions et de partenariats, qui privilégie les dynamiques sociétés du secteur des biotechnologies (**Gallot et al., 2009**). Ces entreprises sont perçues comme des relais de croissance privilégiés car elles sont la source des principales innovations thérapeutiques actuelles et possèdent d'intéressants réservoirs de molécules. Deux défis majeurs restent cependant à surmonter : (i) l'explosion des coûts de recherche et développement, qui dépassent désormais fréquemment le milliard d'euros (**Mouille, 2008**), et (ii) un environnement réglementaire de plus en plus contraignant, où la seule démonstration de la « non-infériorité » d'un nouvel agent par rapport au traitement conventionnel, ne suffit plus à obtenir l'autorisation de mise sur le marché (**Garattini and Bertele, 2007; Mouille, 2008**). A ces difficultés s'ajoute la pression des agences de santé nationales qui, soucieuses de contenir leurs dérives budgétaires, voient dans la baisse du prix des médicaments et la taxation accrue des industriels de puissants leviers d'action (**Mouille, 2008**).

Dans ce contexte de tensions, le retour sur investissement est plus que jamais incertain, et la prise de risque, loin d'être minimale, doit être mûrement réfléchi. L'abandon récent de l'élinogrel, pourtant à un stade de développement avancé, est la juste illustration des défis à relever (**Novartis, 2012; Welsh et al., 2012; Yousuf and Bhatt, 2011**). Tout l'enjeu est d'identifier des pistes innovantes susceptibles de mener à des candidats médicaments aux modes d'action originaux et ayant une réelle valeur ajoutée clinique.

5.2.4. Un besoin non couvert en antiplaquettaires plus efficaces et mieux tolérés

Malgré leur succès, les antiplaquettaires actuels ont pour inconvénients principaux (i) de présenter une efficacité clinique limitée, et (ii) d'augmenter le risque de saignement.

5.2.4.1. Le bénéfice limité des médicaments actuels

La thrombose artérielle reste un enjeu majeur de santé publique. En France, encore 13% des malades pris en charge pour infarctus du myocarde décèdent lors de la première année, dont 7% à la phase aiguë (**Haute Autorité de Santé, 2011**). Après une angioplastie coronaire avec pose de stent et malgré l'administration d'antiplaquettaires, plus du tiers des patients souffrent d'un événement ischémique dans l'année qui suit (**Collet et al., 2012**). Concernant l'infarctus cérébral, les antiplaquettaires sont peu efficaces et la thrombolyse par altéplase est la seule option thérapeutique d'urgence (**Sabbah and Lacotte, 2011; Stoll et al., 2008**). Cependant, du fait de critères d'inclusion drastiques, en particulier de la nécessité d'être traité dans les trois heures suivant l'apparition des symptômes, moins de 10% des patients sont éligibles à la thrombolyse. Après un premier accident ischémique, l'administration d'aspirine ou de clopidogrel ne diminue le taux de récurrence dans l'année que de 25% environ (45% en bithérapie) (**Choi and Kermode, 2011; Eusébio et al., 2010; Fabre and Gurney, 2010; Jackson and Schoenwaelder, 2003**). Avec 36 539 décès en 2009, l'infarctus du myocarde était toujours la première cause de mortalité en France, et l'accident vasculaire cérébral (31 986 décès) la troisième (**INSEE, 2011**).

Plusieurs raisons ont été évoquées pour expliquer le manque d'efficacité des antiplaquettaires, comme la difficulté des anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ à agir au niveau d'un thrombus déjà constitué, ou le fait que l'aspirine et le clopidogrel n'inhibent que partiellement l'activation et l'agrégation des plaquettes (**Jackson and Schoenwaelder, 2003**). L'absence de réponse de certains patients au clopidogrel jouerait aussi un rôle non négligeable (**El Ghannudi et al., 2011; Morel et al., 2011; Sofi et al., 2010**). Enfin, il faut noter que le clopidogrel n'est pas utilisé au maximum de son potentiel afin de limiter le risque de saignement (**Jackson and Schoenwaelder, 2003**).

5.2.4.2. Le risque hémorragique iatrogène

Tous les antiplaquettaires actuels augmentent le risque hémorragique (**Yousuf and Bhatt, 2011**). Les saignements sont généralement mineurs (Ex. hématurie, hématomène, épistaxis) mais peuvent être beaucoup plus graves, avec parfois une issue fatale, lorsqu'ils sont intracrâniens ou rétropéritonéaux (**Serebruany et al., 2004; VIDAL, 2012**). Une méta-analyse incluant 51 essais de supériorité chez 338 191 patients traités pour syndromes

ischémiques a montré que 1.7% des patients sous aspirine, 2.1% sous clopidogrel et 3.6% sous anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ souffrent de saignements majeurs (**Serebruany et al., 2004**). Avec la bithérapie clopidogrel/aspirine, ce taux est porté à 4.5% (**Eusébio et al., 2010**). Par ailleurs, certaines études rétrospectives récentes ont révélé qu'en pratique réelle, l'incidence des saignements majeurs pouvait être jusqu'à quatre fois supérieure à celle observée dans les essais cliniques (**Eusébio et al., 2010**).

Avec les médicaments actuels, la balance entre un risque hémorragique réduit et un bénéfice anti-thrombotique appréciable peut être délicate à trouver, particulièrement chez les patients âgés, de faible poids, diabétique ou insuffisants rénaux (**Basra et al., 2011; Chassot et al., 2012**). En prévention primaire, le rapport bénéfice/risque n'est pas suffisamment favorable pour préconiser la généralisation des antiplaquettaires (**Yousuf and Bhatt, 2011**). En prévention secondaire après un infarctus cérébral, le risque d'hémorragies intracrâniennes graves est dangereusement élevé, et seule l'aspirine, éventuellement combinée au dipyridamole, est recommandée (**Choi and Kermode, 2011**). Le cas des patients sous antiplaquettaires qui doivent subir une intervention chirurgicale ou endoscopique est fréquent et complexe. La crainte d'hémorragies excessives, particulièrement en neurochirurgie, conduit souvent à interrompre temporairement les antiplaquettaires, mais cela expose à un phénomène de rebond avec un risque accru d'évènements ischémiques (**Chassot et al., 2012; Haute Autorité de Santé, 2012**). Un dilemme similaire se pose lors d'une revascularisation par pontage ou endartériectomie. Bien qu'améliorant significativement le pronostic de l'ischémie, les antiplaquettaires comme le clopidogrel majorent les saignements graves, qui peuvent aller jusqu'à nécessiter une ré-opération (**Baracchini et al., 2011; Chassot et al., 2012; Sharpe et al., 2010; Trachiotis, 2010**). En l'absence de consensus, il revient aux chirurgiens d'individualiser précisément chaque risque avant de choisir.

5.3. Nouvelles approches antiplaquettaires

Ces dernières années, plusieurs stratégies potentiellement capables d'inhiber la thrombose tout en préservant l'hémostase ont été proposées (**Jackson, 2011**). A ce stade, seules quelques molécules innovantes sont entrées en clinique et très peu ont fait l'objet d'une

étude de phase III. Dans cette partie, les principales pistes explorées et agents actuellement en développement sont présentés (**Figure 36**).

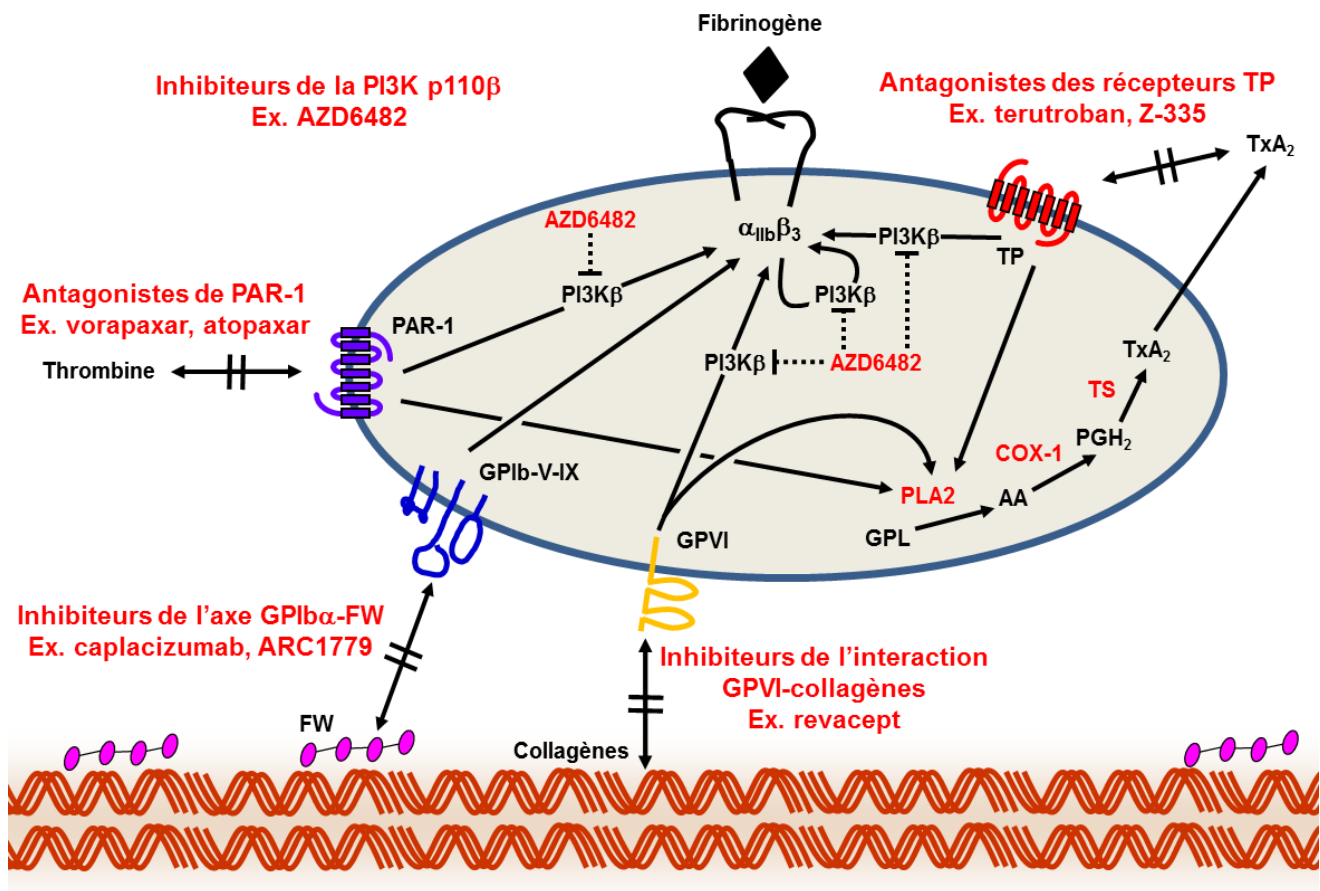


Figure 36 : Mécanisme d'action des antiplaquettaires en développement clinique. AA, acide arachidonique ; COX-1, cyclo-oxygénase-1 ; GPL, glycérophospholipides ; PAR, *protease-activated receptor* ; PGH₂, prostaglandine H₂ ; PLA2, phospholipase A2 ; TP, *thromboxane/prostaglandin receptor* ; TS, thromboxane synthétase.

5.3.1. Les antagonistes des récepteurs TP

D'un point de vue théorique, le blocage des récepteurs TP présente deux avantages majeurs par rapport à l'aspirine. D'une part, cela permet de préserver l'activité des COX, notamment au niveau gastrique et rénal, limitant la toxicité systémique. D'autre part, le ciblage des récepteurs TP pourrait empêcher l'activation et l'agrégation des plaquettes induites non seulement par le TxA₂, mais aussi par les isoprostanes, suggérant un effet anti-

thrombotique accru (voir section 2.2.2.). Cette hypothèse est supportée par le fait que chez l'animal un antagoniste réversible des récepteurs TP, le terutroban, est plus efficace que l'aspirine pour réduire la thrombose artérielle (**Hong et al., 2006; Osende et al., 2004; Vilahur et al., 2007**). Il a également été montré que cet agent prolonge le temps de saignement de manière comparable à l'aspirine (**Vilahur et al., 2007**), et inhibe la progression des lésions d'athérosclérose, en partie en réduisant la dysfonction endothéliale, l'infiltration monocytaire et la prolifération des CML (**Giannarelli et al., 2010; Verbeuren, 2006**). Malgré ces résultats précliniques encourageants, une étude de phase III évaluant le bénéfice du terutroban en prévention secondaire après un infarctus cérébral a récemment été stoppée en raison de son absence de supériorité par rapport à l'aspirine (**Bousser et al., 2011**). Un autre antagoniste des récepteurs TP, Z-335 (**Yeung and Holinstat, 2012**), ainsi que des composés inhibant à la fois les TP et la thromboxane synthétase (**Celestini and Violi, 2007**) sont aussi en cours d'évaluation chez l'homme.

5.3.2. Les antagonistes du récepteur PAR-1

Chez l'animal, différents antagonistes réversibles de PAR-1 comme le vorapaxar et l'atopaxar inhibent la thrombose artérielle sans prolonger le temps de saignement (**Chintala et al., 2008; Chintala et al., 2010; Cook et al., 1995; Derian et al., 2003; Kogushi et al., 2011**). Des études de phase I ont confirmé que le vorapaxar et l'atopaxar ne compromettent pas l'hémostase (**Kosoglou et al., 2012; Serebruany et al., 2009**). Associé à la bithérapie clopidogrel/aspirine chez des patients subissant une intervention coronarienne percutanée, le vorapaxar a permis de réduire davantage la survenue d'infarctus du myocarde et de décès sans aggraver le risque hémorragique (**Becker et al., 2009; Goto et al., 2010b**). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'atopaxar (**Goto et al., 2010a; O'Donoghue et al., 2011; Wiviott et al., 2011**). Deux études de phase III ont été lancées afin d'évaluer le bénéfice de la trithérapie clopidogrel/aspirine/vorapaxar dans le traitement des syndromes coronariens aigus (**Harrington et al., 2009**) et en prévention secondaire (**Morrow et al., 2009**). Récemment, ces essais ont en partie été stoppés en raison d'une augmentation importante des saignements intracrâniens, particulièrement chez les patients ayant un antécédent d'ischémie cérébrale (**Merck, 2012; Scirica et al., 2012; Tricoci et al., 2012**).

5.3.3. L'inhibition de l'interaction GPVI/collagènes

Dans différents modèles animaux, l'immunodéplétion de la GPVI (Kleinschnitz et al., 2007; Nieswandt et al., 2001b) ou son blocage par des fragments Fab (Li et al., 2007) réduit la thrombose artérielle sans prolonger ou alors seulement modestement le temps de saignement. Chez une souris transgénique exprimant la GPVI humaine, le Fab issu de l'anticorps murin 9O12.2 produit un effet anti-thrombotique marqué (Mangin et al., 2012). Des fragments variables simple chaîne humanisés (hscFv) de ce Fab ont été produits (Muzard et al., 2009) et pourraient être prochainement testés chez l'homme (Zahid et al., 2012). Une autre approche est basée sur une protéine composée de deux domaines extracellulaires de la GPVI humaine fusionnés au fragment Fc (*Crystallizable*) d'une IgG (Massberg et al., 2004). *In vitro*, cette « GPVI soluble » se lie au collagène, empêchant son interaction avec la GPVI plaquettaire (Massberg et al., 2004; Schulz et al., 2008). Deux études ont apporté la preuve de concept de son effet anti-thrombotique chez la souris (Massberg et al., 2004) et le lapin (Bültmann et al., 2006). Au contraire, aucune inhibition n'est observée dans d'autres modèles murins (Grüner et al., 2005). Baptisée revacept, cette molécule a récemment fait l'objet d'une étude clinique de phase I, qui a montré qu'elle ne prolonge pas le temps de saignement (Ungerer et al., 2011). En juillet 2012 a débuté un essai de phase II évaluant le bénéfice de la combinaison aspirine/revacept dans la réduction du taux d'embolies cérébraux chez des patients subissant une endartériectomie carotidienne (National Institutes of Health, 2012c).

5.3.4. L'inhibition de l'axe GPIIb/IIIa

De nombreux agents ciblant la région N-terminale de la GPIIb/IIIa (Azzam et al., 1995; Wu et al., 2002) ou le domaine A1 du FW (Diener et al., 2009; Kageyama et al., 1997; Ulrichs et al., 2011; Wadanoli et al., 2007) inhibent efficacement la thrombose chez le cobaye (Azzam et al., 1995; Kageyama et al., 1997), le chien (Wadanoli et al., 2007) ou encore le singe (Diener et al., 2009; Ulrichs et al., 2011; Wu et al., 2002) tout en préservant l'hémostase. Il s'agit principalement d'anticorps (Kageyama et al., 1997) et de leurs dérivés

comme les Fab (**Wu et al., 2002**), de fragments recombinants du FW (**Azzam et al., 1995**) ou de la GPIIb α (**Wadanoli et al., 2007**) et d'aptamères c'est-à-dire d'oligonucléotides synthétiques (**Diener et al., 2009**). Deux anti-domaine A1 sont en cours d'évaluation chez l'homme à savoir un aptamère, l'ARC1779 (**Diener et al., 2009**), et le caplacizumab (ALX-0081), qui est un *nanobody* composé d'un fragment d'anticorps à une seule région variable (**Ulrichs et al., 2011**). Des études de phase I ont montré que ces agents ne prolongent que modérément le temps de saignement (**Bartunek et al., 2008; Bartunek et al., 2010; Gilbert et al., 2007**). Dans un essai de phase II, l'ARC1779 a réduit la fréquence des embolies cérébraux après endartériectomie carotidienne, mais deux tiers des patients souffraient de complications hémorragiques contre aucun pour le placebo (**Markus et al., 2011**). Concernant le caplacizumab, associé à la bithérapie clopidogrel/aspirine chez des patients subissant une intervention coronarienne percutanée, cette molécule entraîna un risque de saignement comparable à la trithérapie clopidogrel/aspirine/abciximab (seul ce critère a été évalué) (**Ablynx, 2011**).

En réduisant l'activité des multimères de très haut poids moléculaire de FW, l'ARC1779 et le caplacizumab pourraient également permettre de traiter les patients souffrant de PTT (voir section 3.3.3.4.). Deux essais cliniques ont révélé que l'ARC1779 normalise la numération plaquettaire et la bilirubinémie, indiquant une amélioration de la maladie (**Jilma-Stohlawetz et al., 2011a; Jilma-Stohlawetz et al., 2011b**). Le caplacizumab a démontré son efficacité dans un modèle de PPT chez le singe (**Callewaert et al., 2012**) et est en train d'être évalué chez l'homme (**Holz, 2012**).

5.3.5. Les inhibiteurs de la PI3K p110 β

La PI3K p110 β joue un rôle important en aval de nombreux récepteurs incluant la GPVI, le P2Y₁₂ et les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_2\beta_1$ (**Consonni et al., 2012; Gratacap et al., 2011**). Chez la souris, la délétion de la PI3K p110 β réduit la thrombose artérielle sans prolonger le temps de saignement (**Martin et al., 2010**). Un inhibiteur sélectif de cette isoforme, TGX-221 (IC₅₀ = 5 nM), produit des résultats similaires chez le rat et le lapin (**Bird et al., 2011; Jackson et al., 2005; Sturgeon et al., 2008**). En revanche, les souris traitées avec cet agent ont un temps de saignement fortement prolongé, y compris à des doses faibles, ce qui pourrait

être lié au fait qu'il inhibe d'autres isoformes de la PI3K chez cette espèce (**Bird et al., 2011**). Récemment, il a été montré qu'un autre inhibiteur de la PI3K p110 β (AZD6482, IC₅₀ = 10 nM), qui diminue la thrombose chez le chien, ne prolonge pas le temps de saignement chez l'homme (**Nylander et al., 2012**).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Rôle de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ en hémostasie et thrombose

Publication 1 :

“Integrin $\alpha_6\beta_1$ is the main receptor for vascular α_4 and α_5 laminins and plays a role in platelet adhesion and arterial thrombosis”

Mathieu Schaff¹; ChaoJun Tang¹; Eric Maurer¹; Catherine Bourdon¹; Nicolas Receveur¹; Béatrice Hechler¹; Adèle de Arcangelis²; Cécile V Denis³; Olivier Lefebvre⁴; Elisabeth Georges-Labouesse²; Christian Gachet¹; François Lanza¹; Pierre H Mangin¹

¹INSERM UMR-S949, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), Strasbourg, F-67065, France, ²CNRS UMR7104, INSERM U964, Université de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch-Graffenstaden, F-67404, France, ³INSERM UMR-S770, Université de Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, F-94270, France, ⁴INSERM UMR-S682, Université de Strasbourg, Strasbourg, F-67200, France

En préparation.

Introduction

Les laminines sont des constituants majeurs des membranes basales des cellules endothéliales et des CML, idéalement localisées pour interagir avec les plaquettes lors d'une lésion vasculaire. La paroi artérielle contient principalement des laminines contenant une chaîne α_4 ou α_5 , à savoir les LN411, 421, 511 et 521 (Hallmann et al., 2005; Kelleher et al., 2004; Petajaniemi et al., 2002; Sorokin et al., 1997). A ce jour, leurs propriétés adhésives pour les plaquettes restent largement indéterminées, la majorité des études antérieures ayant utilisé soit de la LN111 (Hindriks et al., 1992; Ill et al., 1984; Polanowska-Grabowska et al., 1999; Sonnenberg et al., 1988; Tandon et al., 1991), qui n'est pas exprimée dans les vaisseaux (Kelleher et al., 2004; Virtanen et al., 2000), soit des mélanges de plusieurs isoformes d'origine placentaire (Inoue et al., 2006; Inoue et al., 2008). Ceci s'explique par le fait que la LN111 est facilement purifiée à partir d'une lignée de sarcome de souris (Timpl et al., 1979), alors qu'il est difficile d'extraire de tissus les autres isoformes, sauf à utiliser des cocktails de protéases dans des conditions acides conduisant à leur fragmentation et dénaturation (Wondimu et al., 2006). Par ailleurs, l'importance des laminines en hémostase et thrombose est inconnue. Un obstacle à son évaluation est que les souris déficientes en chaîne α_5 décèdent au stade embryonnaire (Miner et al., 1998), alors que l'absence de la chaîne α_4 altère l'angiogenèse, causant une fragilité de la paroi vasculaire et des saignements spontanés et fréquents (Thyboll et al., 2002).

Le but de ce travail a été d'évaluer (i) l'adhérence des plaquettes sur les principales laminines vasculaires, et (ii) l'importance de l'interaction plaquette/laminines en hémostase et thrombose. Pour le premier objectif, nous avons utilisé un système de perfusion de sang au travers de microcapillaires de verre recouverts de laminines recombinantes récemment commercialisées (Figure 28). Afin d'étudier le rôle des laminines *in vivo*, nous avons développé, en collaboration avec l'équipe du Dr. Elisabeth Georges-Labouesse (INSERM U964, IGBMC, Illkirch-Graffenstaden), une souche de souris dans laquelle le récepteur majeur des laminines, l'intégrine $\alpha_6\beta_1$, a été inactivé spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire. La réponse de ces animaux dans cinq modèles de thrombose ainsi que leur temps de saignement à la queue ont ensuite été évalués.

Integrin $\alpha_6\beta_1$ is the main receptor for vascular α_4 and α_5 laminins and plays a role in platelet adhesion and arterial thrombosis

Mathieu Schaff¹; ChaoJun Tang¹; Eric Maurer¹; Catherine Bourdon¹; Nicolas Receveur¹; Béatrice Hechler¹; Adèle de Arcangelis²; Cécile V Denis³; Olivier Lefebvre⁴; Elisabeth Georges-Labouesse²; Christian Gachet¹; François Lanza¹; Pierre H Mangin¹

¹INSERM UMR-S949, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), Strasbourg, F-67065, France, ²CNRS UMR7104, INSERM U964, Université de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch-Graffenstaden, F-67404, France, ³INSERM UMR-S770, Université de Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, F-94270, France, ⁴INSERM UMR-S682, Université de Strasbourg, Strasbourg, F-67200, France

Correspondence: Pierre H Mangin, INSERM UMR-S949, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), 10, rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France, Tel.: +33 3 88 21 25 25, Fax: +33 3 88 21 25 21, E-mail: pierre.mangin@efs-alsace.fr

Running title: Role of $\alpha_6\beta_1$ and laminins in platelet function

Keywords: platelets, arterial thrombosis, integrin $\alpha_6\beta_1$, laminins

ABSTRACT

Following vascular injury, laminins present in basement membranes of the vessel wall become exposed to circulating blood and may contribute to hemostasis and/or thrombosis. Laminin-111 ($\alpha_1, \beta_1, \gamma_1$) is known to support platelet adhesion but is absent from most blood vessels, which contain isoforms with the α_2, α_4 or α_5 chain. We show that laminin-411 ($\alpha_4, \beta_1, \gamma_1$), laminin-511 ($\alpha_5, \beta_1, \gamma_1$) and laminin-521 ($\alpha_5, \beta_2, \gamma_1$), but not laminin-211 ($\alpha_2, \beta_1, \gamma_1$), allow efficient platelet adhesion across a wide range of arterial wall shear rates. Adhesion was critically dependent on integrin $\alpha_6\beta_1$ and the GPIb-IX complex, which binds to plasmonic VWF adsorbed on laminins. To address the significance of platelet/laminin interactions *in vivo*, we developed a platelet-specific knock-out of integrin α_6 . Platelets from these mice failed to adhere to laminin-411, laminin-511 or laminin-521 but responded normally to a series of agonists. $\alpha_6\beta_1^{-/-}$ mice presented a marked decrease in arterial thrombosis in three models of injury of the carotid, aorta and mesenteric arterioles. The tail bleeding times remained unaltered, indicating normal hemostasis. This study reveals an unsuspected important contribution of $\alpha_6\beta_1$ to thrombus formation *in vivo* and suggests that targeting this integrin could represent an alternative antithrombotic strategy devoid of bleeding risk.

INTRODUCTION

Platelet adhesion, activation and aggregation are essential to limit blood loss at sites of vascular injury but can also lead to arterial thrombosis upon erosion or rupture of atherosclerotic plaques. Current antithrombotic drugs such as P2Y₁₂ receptor antagonists and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ blockers target platelet activation and aggregation, thereby considerably reducing the morbidity and mortality associated with ischemic events. However, this strategy results in an increased risk of hemorrhagic complications (Yousuf and Bhatt, 2011). Clinical and experimental evidence has suggested that blocking the initial stage of platelet interaction with exposed subendothelial proteins could pave the way to safer therapies causing minimal perturbation of hemostasis. Indeed, targeting the binding of collagen to glycoprotein (GP) VI (Li et al., 2007; Mangin et al., 2012; Massberg et al., 2003) or integrin $\alpha_2\beta_1$ (Holtkotter et al., 2002; Miller et al., 2009), or the GPIb/von Willebrand factor (VWF) axis (Kageyama et al., 1997; Ulrichs et al., 2011; Wu et al., 2002) efficiently reduced thrombus formation in various animal models without affecting hemostasis. In addition, it has recently been shown in phase I clinical trials that treatment with agents blocking GPVI/collagen (Ungerer et al., 2011) or GPIb/VWF (Gilbert et al., 2007) interactions resulted in no or only a modest defect in hemostasis. Whether preventing the adhesion of platelets to other extracellular matrix proteins such as laminins presents analogous advantages is unknown.

Laminins form a family of large multidomain disulfide-linked heterotrimeric glycoproteins consisting of α , β and γ chains which give rise to over 15 isoforms (Hallmann et al., 2005). They are widely expressed in various cell types of both developing and adult tissues, including vascular endothelial and smooth muscle cells. Laminins are the most abundant components of the basement membranes surrounding endothelial and medial smooth muscle cells, and play a critical role in angiogenesis and the maintenance of vessel architecture through regulation of cell adhesion, proliferation, differentiation, migration and apoptosis (Hallmann et al., 2005; Simon-Assmann et al., 2011). Blood vessels contain four major isoforms, namely laminin-411 ($\alpha_4\beta_1\gamma_1$, LN411), -421 ($\alpha_4\beta_2\gamma_1$, LN421), -511 ($\alpha_5\beta_1\gamma_1$, LN511) and -521 ($\alpha_5\beta_2\gamma_1$, LN521) (Hallmann et al., 2005; Kelleher et al., 2004; Petajaniemi et al., 2002; Simon-Assmann et al., 2011; Sorokin et al., 1997). In diseased arteries presenting atherosclerotic plaques, overexpression of laminins α_5 (LN511, LN521) and α_2 ($\alpha_2\beta_1\gamma_1$, LN211 and $\alpha_2\beta_2\gamma_1$, LN221) occurs (Rauch et al., 2011). Laminins are well located to interact with platelets upon vascular damage. Pioneer studies reported adhesion of platelets under both

static and flow conditions to laminin from human placenta (Inoue et al., 2006; Inoue et al., 2008) and laminin-111 ($\alpha_1\beta_1\gamma_1$, LN111) derived from mouse Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma cells (Hindriks et al., 1992; Sonnenberg et al., 1988; Tandon et al., 1991). Since LN111 exhibits a highly restricted distribution in adults, being absent from most blood vessels (Kelleher et al., 2004; Simon-Assmann et al., 2011; Virtanen et al., 2000), while placental preparations contain several isoforms which are fragmented and often contaminated with other matrix proteins (Wondimu et al., 2006), the relevance of these previous findings for hemostasis and thrombosis is questionable. More recently, adhesion of platelets to recombinant human LN411 and LN511 was demonstrated, where LN511 was found to be more reactive, but the adhesiveness under flow was not characterized (Nigatu et al., 2006). The adhesive properties of other vascular isoforms remain unexplored.

Platelets express a number of receptors with the potential to bind laminins, including several integrins ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_6\beta_1$) (Hallmann et al., 2005; Varga-Szabo et al., 2008), GPVI (Inoue et al., 2006), α -dystroglycan (Austin et al., 2002; Hallmann et al., 2005) and a protein with a molecular mass of 67 kDa (67 LR) (Tandon et al., 1991). Only $\alpha_6\beta_1$ has been found to be critical for platelet adhesion to laminins (Hindriks et al., 1992; Inoue et al., 2006; Nigatu et al., 2006; Sonnenberg et al., 1988). Upon laminin binding, $\alpha_6\beta_1$ activates platelets by initiating signals promoting cytoskeletal reorganization and filopodia emission (Chang et al., 2005; Inoue et al., 2006). In addition, $\alpha_6\beta_1$ has been postulated to bring laminin in close contact with GPVI, which in turn mediates lamellipodia formation and platelet spreading (Inoue et al., 2006). Previous studies indicated either involvement (Tandon et al., 1991) or no participation (Hindriks et al., 1992; Sonnenberg et al., 1988) of 67 LR in platelet adhesion to LN111, while the importance of α -dystroglycan has yet to be established.

Although platelet adhesion to laminins has been established and partially characterized, whether this interaction plays a role *in vivo* remains completely unknown. In this study, we investigated (i) the ability of a series of vascular laminin isoforms to support platelet adhesion under flow conditions *in vitro*, and (ii) the significance of platelet/laminin interactions in hemostasis and experimental thrombosis. Since laminin $\alpha_5^{-/-}$ mice die embryonically while deletion of laminin α_4 impairs vessel maturation resulting in weakening of the vascular wall (Kelleher et al., 2004), we used a knock-out of integrin $\alpha_6\beta_1$ restricted to the megakaryocyte lineage.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Alexa Fluor 488-labeled fibrinogen (FGN), DIOC₆ (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide) and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) were from Molecular Probes (Paisley, UK), fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled anti-P-selectin antibody (RB40.34) was from BD Pharmingen (Le Pont-De-Claix, France) and FITC-conjugated annexin V was from Roche Diagnostics (Meylan, France). Fatty acid-free human serum albumin (HSA), bovine serum albumin (BSA), human FGN, bovine thrombin, U46619 and adenosine 5'-diphosphate (ADP) were provided by Sigma-Aldrich (Lyon, France). Cross-linked collagen-related peptide (CRP-XL) was obtained from Dr. R.W. Farndale (University of Cambridge, Cambridge, UK) and convulxin from Dr. M. Jandrot-Perrus (INSERM U698, Paris, France). Horm fibrillar type I collagen from equine Achilles tendon was purchased from Nycomed (Zurich, Switzerland), while the protease-activated receptor (PAR) 4-selective agonist AYPGKF peptide was synthesized by PolyPeptide Group (Strasbourg, France). Apyrase was purified from potatoes as previously described (Cazenave et al., 2004). Glutaraldehyde was from Electron Microscopy Sciences (Euromedex, Souffelweyersheim, France), Fluorsave reagent was from Millipore (Molsheim, France) and optimal cutting temperature (OCT) compound (Shandon Cryomatrix) and O-phenylenediamine were from Thermo Scientific (Cergy-Pontoise, France). A number of adhesive proteins were isolated in our laboratory according to published methods: VWF from human factor VIII concentrates (Chopek et al., 1986), TSP-1 from washed human platelets (Roberts et al., 1994), fibronectin from human plasma (Miekka et al., 1982) and acid-soluble fibrillar type I collagen (ASC) from bovine Achilles tendon (Sigma-Aldrich) (Cazenave et al., 1975). Recombinant human laminins were purchased from Biolamina (Stockholm, Sweden) and checked for purity by LC-MS/MS spectrometry. Recombinant hirudin was from Transgene (Illkirch-Graffenstaden, France), clopidogrel from Sanofi (Toulouse, France), eptifibatide from Schering-Plough (Kenilworth, NJ) and acid citrate dextrose (ACD) solution from Bioluz (St-Jean-de-Luz, France).

Antibodies

Azide-free blocking monoclonal antibodies against human platelet receptors were as follows: anti-integrin β_1 , 4B4 (Beckman Coulter, Villepinte, France) and P5D2 (Santa Cruz

Biotechnology, Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France); anti-integrin α_6 , GoH3 (Santa Cruz Biotechnology); anti-integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_v\beta_3$, chimeric 7E3 Fab fragment abciximab (E. Lilly, Indianapolis, IN); anti-GPIb α , AK2 (GeneTex, Euromedex); anti-VWF A1 domain, clone 701, kindly provided by Dr. C.V. Denis. Other antibodies used were: mouse IgG $_{1\kappa}$ and rat IgG $_{2a\kappa}$ isotype controls (Biolegend, Ozyme, St-Quentin-en-Yvelines, France), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (Beckman Coulter), HRP-conjugated anti-VWF (Dako, Glostrup, Denmark), anti-laminin α_4 , clone 3H2 (Santa Cruz Biotechnology), anti-laminin α_5 , clone 4C7 (Millipore) and Cy3-labeled goat anti-rat or -rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK). For immunohistofluorescence, highly-selective primary antibodies against laminins α_1 (clone 200) (Edwards et al., 2010; Sorokin et al., 1992), α_2 (clone 401) (Bolcato-Bellemin et al., 2003), α_4 (clone 377) (Bolcato-Bellemin et al., 2003) and α_5 (clone 405) (Bolcato-Bellemin et al., 2003) were kind gifts from Dr. Lydia Sorokin (University of Münster, Germany).

Mice

To generate mice lacking integrin α_6 in platelets, mixed background C57BL/6 x 129/Sv mice containing the *ITGA6* gene flanked by loxP sites ($\alpha_6^{fl/fl}$) (Germain et al., 2010; Niculescu et al., 2011) were crossed with pure C57BL/6 transgenic animals selectively expressing Cre recombinase in the megakaryocyte lineage under control of the platelet factor 4 (PF4) promoter (PF4-Cre $^+$) (Pr. R. Skoda, University Hospital Basel, Basel, Switzerland) (Tiedt et al., 2007). Mice expressing Cre and heterozygous for the *ITGA6* recombination (PF4-Cre $^+$ / $\alpha_6^{fl/fl}$) were intercrossed to produce littermate mice homozygous for the floxed allele (PF4-Cre $^+$ / $\alpha_6^{fl/fl}$) and homozygous for the WT *ITGA6* allele (PF4-Cre $^+$ / $\alpha_6^{+/+}$), serving as controls. PF4-Cre $^+$ / $\alpha_6^{fl/fl}$ mice were viable, fertile and had no gross abnormality. $\beta_1^{fl/fl}$ (Dr. R. Fässler, Max Planck Institute, Martinsried, Germany) (Nieswandt et al., 2001), VWF $^{-/-}$ (Dr. C.V. Denis) (Denis et al., 1998) and $\alpha_{IIb}^{-/-}$ (Dr. W. Vainchenker, INSERM U1009, Villejuif, France) (Tronik-Le Roux et al., 2000) mice were backcrossed for at least 12 generations on C57BL/6 background. Subsequently, the $\beta_1^{fl/fl}$ mice were mated with PF4-Cre $^+$ animals as described above. C57BL/6 WT mice were obtained from Charles River (L'Arbresle, France) and all mice were maintained in the animal facilities of the Etablissement Français du Sang-Alsace. Unless otherwise indicated, we used 8-10-week-old mice, anesthetized

intraperitoneally with a mixture of xylazine (20 mg/kg, Rompun[®], Bayer, Leverkusen, Germany) and ketamine (100 mg/kg, Imalgene 1,000[®], Merial, Lyon, France). All experiments conformed to the French legislation for animal experimentation and followed the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Immunohistofluorescence

One-year-old male WT mice were anesthetized and perfused with PBS by cardiac puncture in the left ventricle using a 5 mL syringe with a 25-gauge needle. An incision in the right atrium allowed removal of blood. The carotid arteries were then excised and immediately snap-frozen in OCT embedding compound. Transverse sections of the carotid (8 μ m thick) were cut with a cryostat (Leica CM3050 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), collected onto superfrost/plus glass slides (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), air-dried and stored at -80°C. For immunostaining, frozen sections were left to dry at room temperature and incubated overnight at 4°C in a moist chamber with antibodies against laminins α_1 (1:100 in PBS, clone 200), α_2 (1:1000, clone 401), α_4 (1:500, clone 377) or α_5 (1:500, clone 405), as previously performed (Bolcato-Bellemin et al., 2003; Edwards et al., 2010; Sorokin et al., 1992). The tissues were then washed three times in PBS and incubated for 1 h at room temperature with Cy3-coupled goat anti-rat or -rabbit IgG secondary antibodies (1 μ g/mL). After washing, nuclei were stained with DAPI (0.2 μ g/mL) and the slides were mounted in Fluorsave reagent. Control sections were processed as above with omission of the primary antibody. Observations were made using a Provis AX60 epifluorescence microscope equipped with a 40x, 0.75 numerical aperture air objective and an F-view digital camera (Olympus, Hamburg, Germany). Images were acquired and analyzed using DP-Soft software (Olympus).

***In vitro* flow-based adhesion assay**

Flow experiments were performed as previously described (Schaff et al., 2011). Briefly, glass microcapillaries were coated with purified proteins overnight at 4°C and blocked with PBS-10 mg/mL HSA for 30 min at room temperature. In preliminary experiments we determined the lowest concentrations of proteins providing maximal platelet adhesion. Hirudinated (100 U/mL) whole blood from healthy human volunteers or drawn from the abdominal aorta of mice was perfused through the coated capillaries with a syringe pump (Harvard Apparatus,

Holliston, MA) at 37°C and various flow rates. Platelet adhesion was monitored in real time (0.8 image/s) by differential interference contrast (DIC) microscopy (Leica DMI4000B) using a 40x, 1.25 numerical aperture oil objective and a Photometrics CoolSNAP HQ Monochrome charge-coupled device (CCD) camera (Roper Scientific, Evry, France). Images were acquired and analyzed with Metamorph software (Molecular Devices, Roper Scientific). The adhesive behavior of platelets was examined frame by frame (15 images/s) and classified as (i) rolling when the cells moved constantly over the surface, (ii) stationary adhesion when they did not move more than one half of a single cell diameter over a 10 s period, and (iii) detaching when detachment occurred within 2 s following the initial contact. Thrombus formation on ASC collagen was studied by perfusing whole blood in which the platelets had been labeled by incubation for 15 min at 37°C with an Alexa Fluor 488-conjugated monoclonal antibody against GPIIb/IIIa (RAM.1, 5 µg/mL, produced in our laboratory (Perrault et al., 2001)). Fluorescence emission was measured in the range 490-595 nm after excitation with a 488 nm argon-ion laser using a confocal Leica SP5 inverted microscope with a resonant scanner and a 40x oil objective. Series of optical sections in xyz were taken from the base to the peak of the thrombi (Leica LASAF software). Images were then stacked and the volume of the thrombi was determined with ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

***In vitro* binding assays**

Binding assays were performed according to a published method (Schaff et al., 2011). Briefly, increasing concentrations of VWF or laminin were added to 96-well ELISA plates coated with respectively laminin or VWF (both 20 µg/mL) and incubated for 2 h at 37°C. To detect bound VWF, an HRP-conjugated anti-VWF antibody (0.4 µg/mL) was added for 1 h at room temperature. Bound LN411, LN511 and LN521 were detected using anti-laminin α_4 or α_5 antibodies, followed by an HRP-coupled goat anti-mouse IgG antibody (0.4 µg/mL). O-phenylenediamine was then added for 5 min, after which the plates were read at 490 nm.

Preparation of washed platelets and measurement of platelet aggregation, soluble FGN binding and exposure of P-selectin and phosphatidylserine

Blood drawn into ACD anticoagulant from the abdominal aorta of 2 to 4 mice was pooled and platelets were washed by sequential centrifugations and adjusted to 3×10^8 cells/mL in

Tyrode's albumin buffer containing 0.02 U/mL apyrase (Cazenave et al., 2004; Schaff et al., 2011). Washed platelet aggregation was measured turbidimetrically in a 4-channel CARAT TX4 aggregometer (Entec, Ilmenau, Germany) (Cazenave et al., 2004). Agonist-induced binding of soluble FGN and exposure of P-selectin were determined as previously published (Schaff et al., 2012). Phosphatidylserine exposure was quantified by FITC-annexin V binding (Ravanat et al., 2010).

Injury of the carotid artery with a guide wire

The carotid arteries of anesthetized mice aged 50-60 days were exposed. The right common and internal carotids were clamped and the external carotid was ligated with a 9-0 silk suture. An arteriotomy was then made in the external carotid proximal to the silk suture and an angioplasty guide wire (HI-TORQUE CROSS-IT 100XT[®], Abbott Vascular, Santa Clara, CA) was introduced and advanced to 3 mm proximal to the carotid bifurcation. The common carotid was injured by moving the wire back and forth 20 times. After removal of the wire, the external carotid was ligated proximal to the arteriotomy. The clamps were released to re-establish blood flow from the common to the internal carotid and thrombus formation was monitored.

Injury of the aorta with forceps

The abdominal aorta of anesthetized male mice aged 50-60 days was exposed and mechanically injured by pinching it with forceps for 15 s. After removal of the forceps, thrombus formation was monitored.

Recording of thrombus formation after mechanical injury

In both the above models, platelets were labeled prior to injury by injection of DIOC₆, a membrane fluorescent dye, into the exposed left jugular vein (5 µL of a 100 µM solution per g of body weight). Thrombus formation was monitored in real time (1 image/s) under a fluorescent microscope (MacroFluo, Leica Microsystems) equipped with a 5x, 0.5 numerical

aperture objective and a CCD camera (CoolSNAP HQ2, Photometrics, Roper Scientific). Image acquisition and analysis were performed with Metamorph.

Transmission electron microscopy (TEM) analysis of injured arteries

Intact and mechanically-injured arteries of WT C57BL/6 mice were fixed by transcardial perfusion with 25 mg/mL glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 20 mg/mL sucrose (305 mOsm, pH 7.3). The arteries were then excised, post-fixed overnight at 4°C and processed for TEM as described elsewhere (Hechler and Gachet, 2011). TEM indicated that both types of lesion caused uniform and complete denudation of the endothelial cell layer, leading to platelet adhesion to the exposed subendothelium, while the internal elastic lamina and media kept intact appearance (Fig. S1A, C).

Laser-induced thrombosis in a mesenteric arteriole

Thrombosis was performed in 27-28-day-old mice as previously described (Hechler et al., 2010). Briefly, platelets were labeled by injection of DIOC₆ and a localized superficial or deep injury of a mesenteric arteriole was induced with a high intensity 440-nm-pulsed nitrogen dye laser applied with a Micropoint system (Photonic Instruments, Andor Technology, Belfast, UK). Superficial injury has been shown to remove the endothelium without damaging the underlying structures, while exposure of all vascular layers occurs upon deep injury (Hechler et al., 2010). Thrombus formation was monitored in real time (1 image/s) by bright field and fluorescence microscopy (Leica DM IRB) using a 40x oil objective and a Sensicam CCD camera (The Cooke Corporation, Romulus, MI). Images were acquired with Metamorph and analyzed with SlideBook software (Intelligent Imaging Innovations, Göttingen, Germany).

Bleeding time

The bleeding times and volume of blood lost were determined by transversally severing a 3-mm segment from the distal tail of isoflurane-anesthetized mice, as previously described (Schaff et al., 2012).

Statistical analyses

All values are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM) unless otherwise indicated. Data were compared by one-tailed paired Student's t-tests when studying the effects of blocking antibodies and by one-tailed unpaired t-tests in experiments with mice. Differences were considered significant at $p < 0.05$ and all tests were performed using Prism software (GraphPad, La Jolla, CA).

Online supplemental material

Fig. S1 shows histological and pharmacological characterization of thrombosis induced by guide wire or forceps injury. Fig. S2 shows the thrombotic response of mice lacking integrin β_1 in platelets after guide wire or forceps injury. Fig. S3 shows the thrombotic response of mice lacking platelet $\alpha_6\beta_1$ after a deep laser injury in a mesenteric arteriole. Online supplemental material is available at <http://jem.rupress.org/>.

RESULTS

Expression of laminin isoforms in mouse carotid arteries and evaluation of their ability to support human platelet adhesion under flow

Use of isoform-specific antibodies allowed us to confirm previous observations that in mice, large arteries like the common carotid show strong expression of α_4 and α_5 laminins along the luminal edge, outlining the endothelial basement membrane (Fig. 1A, B) (Hallmann et al., 2005; Kelleher et al., 2004; Petajaniemi et al., 2002; Simon-Assmann et al., 2011; Sorokin et al., 1997). In contrast, the α_2 chain exhibited a weak signal and α_1 was undetectable (Fig. 1C, D). We next explored the ability of a series of vascular laminin isoforms containing an α_2 , α_4 or α_5 chain to support platelet adhesion under hemodynamic conditions, as compared to LN111, VWF and fibrinogen. Time-lapse DIC microscopy showed that, at $1,000\text{ s}^{-1}$, human platelets rapidly adhered to form a monolayer on recombinant human LN411, LN511 and LN521, whereas LN211 was not adhesive (Fig. 2A, B). After 6 min perfusion, the number of adherent platelets was highest on LN521, followed by LN511 and VWF (Fig. 2A, B). Adhesion to LN411 was intermediate between adhesion to LN111 and FGN (Fig. 2A, B). These findings highlighted that the platelet-binding properties of laminins are largely determined by their α and β chains. Concerning the adhesive behavior of the cells, platelets rolled over VWF ($70\pm 5\%$, $n = 3$) and rapidly detached from FGN ($74\pm 6\%$, $n = 3$), whereas most of them remained stationary on LN511 ($83\pm 9\%$, $n = 3$) and LN521 ($82\pm 9\%$, $n = 3$) (Fig. 2C). LN411 and LN111 presented intermediate phenotypes with $52\pm 6\%$ and $39\pm 4\%$ ($n = 3$) stationary adherent platelets, respectively (Fig. 2C). This different behavior probably explains the enhanced platelet accumulation observed on α_5 -containing laminins (Fig. 2A).

Similarly as on VWF, platelet adhesion to LN521 and LN511 increased as a function of wall shear rate, exhibiting a bell-shaped curve with maximum at $3,000\text{ s}^{-1}$ for LN521 and $2,000\text{ s}^{-1}$ for LN511 (Fig. 2D). Adhesion to LN411 and LN111 peaked at 800 to $1,000\text{ s}^{-1}$ and was inefficient at shear rates exceeding $1,500\text{ s}^{-1}$, thereby resembling that on FGN (Fig. 2D). These findings indicated that vascular laminins containing the α_4 or α_5 but not α_2 chain support efficient platelet adhesion across a wide range of arterial shear rates.

Human platelet adhesion to LN411, LN511 and LN521 relies on integrin $\alpha_6\beta_1$ and the GPIb-IX/VWF axis

Integrin $\alpha_6\beta_1$ has been reported to be the main receptor for LN111 (Hindriks et al., 1992; Nigatu et al., 2006; Sonnenberg et al., 1988) and accordingly we found that an anti- α_6 monoclonal antibody abolished human platelet adhesion to LN411, LN511 and LN521 at $1,500\text{ s}^{-1}$ (Fig. 3A-C). When targeting the β_1 subunit with two different function-blocking antibodies (4B4 and P5D2), adhesion to LN411 and LN511 was likewise inhibited (Fig. 3A, B). Surprisingly, only partial inhibition was observed for LN521 ($44\pm 13\%$ for 4B4, $n = 5$, $p < 0.05$ and $45\pm 8\%$ for P5D2, $n = 4$, $p < 0.01$), objectivating a different ability of this isoform to bind $\alpha_6\beta_1$ as compared to LN411 and LN511 (Fig. 3C). In contrast, a β_3 integrin antagonist had no inhibitory effect, indicating no requirement for $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_V\beta_3$ (Fig. 3A-C). We next showed that the behavior of platelet adhesion in mice was identical to that in humans, and confirmed that platelets from thrombasthenic mice lacking α_{IIb} adhered normally to all laminins at $1,500\text{ s}^{-1}$ (unpublished data). Blocking the VWF binding site of GPIb or the VWF A1 domain markedly diminished adhesion of human platelets to LN411, LN511 and LN521, suggesting that VWF participates in platelet attachment to laminin (Fig. 3A-C). This was confirmed in VWF-deficient mice, exhibiting a reduction of $63\pm 12\%$, $48\pm 4\%$ and $27\pm 6\%$ in platelet adhesion to LN411, LN511 and LN521, respectively ($n = 3$, $p < 0.05$) (Fig. 3D). These data showed that integrin $\alpha_6\beta_1$ and the GPIb-IX/VWF axis play a pivotal role in platelet adhesion to vascular laminins under flow.

VWF binds directly to LN411, LN511 and LN521

To further investigate the capacity of VWF to mediate GPIb-IX-dependent adhesion to laminins, we determined by ELISA whether these molecules directly interact with each other. As shown in Figure 3E-H, soluble VWF bound to immobilized LN411, LN511 and LN521, but not to BSA, and *vice versa*. Remarkably, LN511 and LN521 bound respectively 4.5 and 1.8 times more efficiently to immobilized VWF than LN411 ($n = 3$) (Fig. 3F-H). These results demonstrated that VWF interacts with LN411, LN511 and LN521, thereby supporting a model in which plasmatic VWF acts as a bridge between laminins and platelet GPIb-IX.

Adhesive and activatory properties of α_6 -deficient platelets

In order to study the importance of the platelet/laminins interaction *in vivo*, we generated a mouse strain with a platelet-specific disruption of integrin α_6 . Deletion of α_6 did not affect the platelet count and expression of the major surface glycoproteins, except for integrin α_5 which displayed an increased expression level of $24\pm 4\%$ ($n = 5$, $p < 0.05$) (Table I). Platelet adhesion to the laminins was critically dependent on integrin $\alpha_6\beta_1$ since α_6 -deficient platelets failed to attach to any of these surfaces (Fig. 4A-F). In contrast, $\alpha_6\beta_1$ played no important role in the accumulation of mouse platelets on other subendothelial glycoproteins such as VWF, fibrillar type I collagen, FGN or fibronectin (Fig. 5A-D). Interestingly, the number of $\alpha_6^{-/-}$ platelets adhering to thrombospondin-1 (TSP-1) tended to be less important (Fig. 5E). Blockade of α_6 in human platelets decreased adhesion to TSP-1 by $38\pm 2\%$ ($n=5$, $p < 0.0001$), thereby identifying integrin $\alpha_6\beta_1$ as a potentially novel platelet receptor for TSP-1 (Fig. 5F).

We next examined the ability of $\alpha_6^{-/-}$ platelets to become activated after stimulation with a range of agonists. As shown in Figure 5G, WT and knock-out platelets displayed equivalent aggregation profiles in response to ADP, thrombin, PAR4 agonist peptide AYPGKF, the thromboxane A_2 analog U46619, fibrillar type I collagen and CRP-XL, a GPVI-selective ligand. Soluble FGN binding induced by ADP, thrombin or AYPGKF was also normal in α_6 -null as compared to control platelets (Fig. 5H). In parallel, no defective surface exposure of P-selectin, a marker of granule secretion, was found following thrombin or AYPGKF stimulation (Fig. 5I). Finally, thrombin- and convulxin-induced phosphatidylserine exposure, which mediates platelet procoagulant activity, was unchanged in $\alpha_6^{-/-}$ platelets (Fig. 5J). Altogether, these results indicated that integrin $\alpha_6\beta_1$ plays no major role in the activation of platelets by a wide range of agonists.

$\alpha_6^{-/-}$ mice are protected in three models of arterial thrombosis

Mice lacking platelet $\alpha_6\beta_1$ were subjected to three models of arterial thrombosis induced by endothelial denudation without exposure of the inner vessel wall layers. In all three models, thrombosis is sensitive to platelet $P2Y_{12}$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ inhibition, indicating critical requirement for platelet activation and aggregation (Fig. S1B, D) (Nonne et al., 2005). When the common carotid artery was injured with a guide wire, α_6 deficiency led to a $69\pm 10\%$ ($n = 6$, $p < 0.05$)

reduction in total thrombus surface area as compared to the WT (Fig. 6A-C). After compression of the abdominal aorta with forceps, the thrombus area in $\alpha_6^{-/-}$ mice was likewise reduced by $56\pm 12\%$ ($n = 5$, $p < 0.01$) (Fig. 6D-F). Interestingly, mice bearing a platelet-restricted deletion of integrin β_1 exhibited similar degrees of inhibition in both models (Fig. S2). A more pronounced decrease in thrombosis of $82\pm 3\%$ ($n = 12$ vessels in three WT or $\alpha_6^{-/-}$ mice, $p < 0.0001$) was found in a model of moderate laser injury of mesenteric arterioles (Fig. 6G-I). In contrast, $\alpha_6^{-/-}$ mice were not protected from thrombosis after a deeper laser lesion exposing the media and adventitia (Fig. S3), consistent with the fact that no laminin expression has been observed in these inner layers of the mesenteric arterial wall (Silva et al., 2011).

$\alpha_6^{-/-}$ mice display normal tail bleeding

To establish whether the decreased thrombosis observed in $\alpha_6^{-/-}$ mice is mirrored by defective hemostasis, tail-bleeding experiments were performed. The time required for first arrest of bleeding was normal in most of the α_6 -null mice (median 132 s, $n = 19$) as compared with WT (median 123 s, $n = 19$) (Fig. 7A). In addition, the total bleeding time (Fig. 7B) and volume of blood lost (Fig. 7C) over 30 min were unchanged. Overall, these results suggested a minor contribution of $\alpha_6\beta_1$ to primary hemostasis.

DISCUSSION

Although laminins are major constituents of endothelial basement membranes, well located to interact with platelets upon vascular damage, their role in platelet functions has remained ill-defined. The studies reported herein demonstrate that (i) various laminin isoforms expressed in the vascular wall efficiently support human platelet adhesion under arterial shear conditions, (ii) integrin $\alpha_6\beta_1$ and the GPIb-IX/VWF axis act in synergy to recruit platelets to immobilized laminins and (iii) integrin $\alpha_6\beta_1$ deficiency provides protection against thrombosis in several experimental models.

We confirmed that platelets can adhere to recombinant human LN111 over a range of hemodynamic conditions, as reported for LN111 extracted from mouse sarcomas (Hindriks et al., 1992). However, platelets are unlikely to encounter this isoform *in vivo* since the α_1 chain is absent from most blood vessels and in particular from large arteries such as the carotid (Kelleher et al., 2004; Simon-Assmann et al., 2011; Virtanen et al., 2000). We obtained evidence that α_4 -, α_5 - and to a lesser extent α_2 -containing laminins are expressed in the endothelial basement membrane of mouse carotid arteries. These observations are in agreement with previous studies showing that α_4 and α_5 laminins are widely distributed in human and mouse arteries (Hallmann et al., 2005; Kelleher et al., 2004; Petajaniemi et al., 2002; Sorokin et al., 1997), while the α_2 chain is restricted to small vessels of the central nervous system (Simon-Assmann et al., 2011; Vitolo et al., 2006). The α chains of vascular laminins have been described to pair with β_1 , β_2 and γ_1 chains (Hallmann et al., 2005; Kelleher et al., 2004; Simon-Assmann et al., 2011).

LN411 exhibited adhesive properties very similar to those of LN111, whereas LN211 did not allow platelet recruitment. In contrast, LN511 supported much higher platelet adhesion under flow, in accordance with previous results obtained under static conditions (Nigatu et al., 2006). Since LN111, LN211, LN411 and LN511 share the same β_1 and γ_1 chains, our results point to a crucial role of the α subunit in supporting platelet adhesion. This agrees with the fact that α chains carry in their COOH-terminal globular modules the major domains interacting with cellular receptors, including integrin $\alpha_6\beta_1$ (Hallmann et al., 2005). A stronger adhesiveness of α_5 - relative to α_4 - and α_2 -containing laminins has already been reported for epithelial, endothelial and hematopoietic stem cells (Doi et al., 2002; Ferletta and Ekblom, 1999; Gu et al., 2003) and is in agreement with the higher affinity of the α_5 chain for

$\alpha_6\beta_1$ (Nishiuchi et al., 2003). Recently, laminin-3B11 ($\alpha_{3B}\beta_1\gamma_1$, LN3B11) was identified as a novel vascular laminin predominantly expressed in capillaries and small veins (Mori et al., 2010). The α_{3B} chain has the highest homology to α_5 (Mori et al., 2010), but whether LN3B11 supports platelet adhesion remains to be established.

Interestingly, LN521 supported more platelet adhesion than LN511, indicating that the β chain, which has been proposed to contain integrin-binding sites (Taniguchi et al., 2009), also contributes to cell adhesion. One could hypothesize that β_2 laminin has a higher affinity for $\alpha_6\beta_1$ than β_1 laminin. Alternatively, β_2 could maintain the α_5 chain in a more appropriate conformation for $\alpha_6\beta_1$ binding, consistent with the fact that the α monomers of laminins require heterotrimerization with β and γ subunits to fully exert their adhesiveness (Deutzmann et al., 1990; Sung et al., 1993).

Besides integrin $\alpha_6\beta_1$, platelet adhesion to LN411, LN511 and LN521 depended on the GPIb-IX complex, requiring the prior binding of plasmonic VWF to laminins. This mechanism is reminiscent of that documented for platelet adhesion to collagens (Savage et al., 1998), fibrin (Hantgan et al., 1990), fibronectin (Beumer et al., 1995) and tenascin-C (Schaff et al., 2011) to which VWF adsorbs, ensuring platelet capture through GPIb-IX, especially under elevated flow conditions. The stronger interaction of VWF with LN521 and LN511 as compared to LN411 could account for the efficient adhesion of platelets to α_5 laminins at high wall shear rates ($> 2,000 \text{ s}^{-1}$).

Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ was dispensable for adhesion to LN411, LN511 or LN521, confirming previous results obtained with LN111 (Hindriks et al., 1992). Although $\alpha_V\beta_3$, the second platelet β_3 integrin, mediates adhesion of endothelial and tumoral cells to laminins through RGD sequences present in the short arm of the α_5 chain (Hallmann et al., 2005), it was not critical in platelet/laminin interactions. This could be due to its low expression (100 to 500 receptors per platelet) as compared to $\alpha_6\beta_1$ (2,000 to 4,000 copies per platelet) (Varga-Szabo et al., 2008). Among non-integrin laminin receptors, platelets express GPVI (Inoue et al., 2006), α -dystroglycan (Austin et al., 2002; Hallmann et al., 2005) and the molecule 67 LR which has been reported to mediate their adhesion to LN111 (Tandon et al., 1991). Adhesion of mouse platelets immunodepleted for GPVI with JAQ1 antibody was unchanged on LN411, LN511 or LN521 (unpublished data), in agreement with a previous study where GPVI was found to mediate laminin-induced platelet activation but did not participate in the adhesive

process (Inoue et al., 2006). Moreover, neither the antibody IHH6C4 blocking α -dystroglycan nor the synthetic peptide YIGSR against 67 LR inhibited platelet adhesion to vascular laminins (unpublished data). Overall, $\alpha_6\beta_1$ and GPIb-IX would thus appear to be the main platelet receptors for laminins. We propose a working model whereby upon endothelial denudation, exposed LN411, LN511 and LN521 adsorb plasmatic VWF, which in turns recruits circulating platelets through GPIb-IX. Stable adhesion is then established by direct binding to $\alpha_6\beta_1$, allowing the platelets to efficiently withstand shear stress.

So far, laminins were considered to be the only subendothelial glycoproteins capable of binding platelet $\alpha_6\beta_1$. Our results suggest that TSP-1 could also be a ligand for this integrin. A direct interaction between $\alpha_6\beta_1$ and TSP-1 was previously demonstrated in microvascular and fibrosarcoma endothelial cells (Calzada et al., 2003). Blockade of $\alpha_6\beta_1$ only partially inhibited platelet adhesion to TSP-1, consistent with the presence of other receptors mediating this interaction, namely CD36, CD47 and GPIb (Jurk et al., 2003).

Until now, no indication of a role of platelet $\alpha_6\beta_1$ has been reported. This study highlights a major contribution of this integrin to arterial thrombus formation in three models of mechanical and laser denudation of the endothelium. Interestingly, in the two mechanical injury models the reduction of thrombus formation in $\alpha_6^{-/-}$ mice was very similar to that in $\beta_1^{-/-}$ animals, suggesting that among the β_1 integrins expressed at the platelet surface, $\alpha_6\beta_1$ might be particularly important. Our results indicate that laminins and to a lesser extent TSP-1 significantly contribute to platelet adhesion and thrombus formation. In contrast, after FeCl_3 injury of the carotid artery, $\alpha_6\beta_1^{-/-}$ mice were not protected against thrombosis (unpublished data). This observation is in agreement with our previous results that deletion of integrin β_1 does not affect thrombosis in this model, probably due to the fact that ferric ion-filled bodies denature the subendothelial adhesive proteins (Eckly et al., 2011). In addition, similarly to $\text{FcR}\gamma/\text{GPVI}$ -deficient mice (Mangin et al., 2006), $\alpha_6\beta_1^{-/-}$ animals were not protected against thrombosis after a deep laser injury of a mesenteric arteriole resulting in exposition of the media and adventitia, which do not contain any laminins (Silva et al., 2011). Although small amounts of laminins located at the edge of the lesion are exposed to the flowing blood in this model (Hechler et al., 2010), the lack of effect suggests a minor contribution compared to other subendothelial proteins such as collagen or tissue factor. Overall, our findings point to an important role of $\alpha_6\beta_1$ in experimental thrombosis depending on the type and severity of injury.

Unlike in healthy vessels, in advanced atherosclerotic arteries the expression of α_2 -, α_4 - and α_5 -containing laminins is not restricted to basement membranes but homogeneously distributed throughout the plaques (Rauch et al., 2011). Moreover, it has been shown that laminins α_5 and β_2 , i.e. the isoforms reacting most strongly with platelets, are overexpressed in atherosclerotic lesions (Rauch et al., 2011). Targeting the $\alpha_6\beta_1$ /laminins interaction could therefore be particularly relevant to arterial thrombosis following plaque erosion or rupture. Unlike the current antithrombotic drugs, which increase the risk of severe or fatal hemorrhage (Yousuf and Bhatt, 2011), α_6 deficiency in mice had a minimal impact on tail bleeding times, suggesting that targeting $\alpha_6\beta_1$ might also provide better hemostatic safety.

In conclusion, α_4 - and α_5 -containing laminins, which are widely expressed in the vasculature, were found to efficiently support platelet adhesion across a wide range of arterial shear rates by direct binding to integrin $\alpha_6\beta_1$ and indirect engagement of the GPIb-IX complex through plasmonic VWF bridging. Using mice with a genetic deletion of $\alpha_6\beta_1$, we obtained the first *in vivo* evidence that platelet/laminin interactions are of paramount importance during arterial thrombus formation after superficial vessel injury, while having no impact on hemostasis. The profound antithrombotic protection achieved in three distinct thrombosis models suggests that $\alpha_6\beta_1$ could represent a promising antithrombotic target devoid of bleeding risk.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Stéphanie Magnenat, Fabienne Proamer, Catherine Ziessel, Christiane Arnold and Jean-Yves Rinckel for technical assistance, Monique Freund for animal care, and Juliette Mulvihill for reviewing the English of the manuscript. This work was supported by ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique) and by a grant from the Fondation de France (2011-00020448). Mathieu Schaff was supported by a "Contrat doctoral" from the French government, Eric Maurer by a "Bourse INSERM-Région Alsace" and ChaoJun Tang by postdoctoral fellowships from the FFCSA (Fondation Franco-Chinoise pour la Science et ses Applications) and the CSC (China Scholarship Council).

CONFLICT OF INTEREST

The authors state that they have no conflicts of interest.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. α_4 and α_5 laminins are the major isoforms expressed in normal carotid arteries. Immunofluorescent analysis of adjacent carotid artery sections from C57BL/6 WT mice using anti-laminin α_4 (A), α_5 (B), α_2 (C) and α_1 (D) antibodies. Representative (n = 3 in three mice) merged images of laminin (green, white arrows) and nuclear DAPI (blue) stainings are shown. *L*, lumen; bar: 100 μm . Minimal background was observed in control sections.

Figure 2. Adhesion of human platelets to vascular laminin isoforms under flow. Hirudinated (100 U/mL) human whole blood was perfused at 1,000 s^{-1} (A-C) or various wall shear rates (D) through microcapillaries coated with FGN (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), VWF (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or LN111, LN211, LN411, LN511 or LN521 (all 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and platelet adhesion was visualized in real time in one random field by DIC microscopy (see Methods). (A) The number of adherent platelets was determined over a 6-min period. (B) Representative DIC microscopy images depicting platelets adhering after 5 min of perfusion. The arrow indicates the direction of blood flow. Bar: 30 μm . (C) The adhesive behavior of 40 platelets attaching to the surface over the first 60-90 s of perfusion was monitored and expressed as a percentage of total adherent platelets. (D) The number of adherent platelets was counted after 5 min of perfusion and expressed as a function of wall shear rate. (A, C, D) Data represent the mean \pm SEM of 3 to 5 separate experiments.

Figure 3. Roles of $\alpha_6\beta_1$ and the GPIb-IX/VWF axis in platelet adhesion to LN411, LN511 and LN521. (A-C) Hirudinated (100 U/mL) human whole blood was incubated for 10 min at 37°C with irrelevant IgG (control), a β_3 integrin antagonist (abciximab, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or a blocking monoclonal antibody: GoH3 (anti-integrin α_6), 4B4 or P5D2 (anti-integrin β_1), AK2 (anti-GPIb, all 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or 701 (anti-VWF A1 domain, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The blood was then perfused over LN411 (A), LN511 (B) or LN521 (C) at 1,500 s^{-1} . The number of adherent platelets was counted after 5 min and expressed as a percentage of the control set to 100%. (D) Hirudinated blood from WT and VWF^{-/-} mice was perfused over laminins at 2,000 s^{-1} and adherent platelets were counted after 3 min. (A-D) Bars represent the mean \pm SEM in one random field in 3 to 5 independent experiments. (E) Increasing concentrations of VWF were

added for 2 h to microwells coated with laminin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or BSA (20 mg/mL) and bound VWF was detected with an HRP-conjugated polyclonal anti-VWF antibody (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (F-H) Varying concentrations of LN411 (F), LN511 (G) or LN521 (H) were added for 2 h to microwells coated with VWF (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or BSA (20 mg/mL). Bound laminins were detected using monoclonal antibodies against the α_4 (3H2; 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or α_5 (4C7; 1/11,000) chain, followed by an HRP-coupled polyclonal goat anti-mouse IgG antibody (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (E-H) Curves show the optical density (OD) at 490 nm and values are the mean \pm SEM in 3 separate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 4. Role of $\alpha_6\beta_1$ in the adhesion of mouse platelets to LN411, LN511 and LN521 under flow. Hirudinized (100 U/mL) whole blood from WT and $\alpha_6^{-/-}$ mice was perfused at 2,000 s^{-1} through microcapillaries coated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LN411 (A, B), LN511 (C, D) or LN521 (E, F). (A, C, E) The time-course of platelet adhesion was determined in one random field and the data represent the mean \pm SEM in 3 separate experiments. (B, D, F) Representative DIC microscopy images depicting platelets adhering after 3 min of perfusion. The arrow indicates the direction of blood flow. Bar: 20 μm .

Figure 5. Role of $\alpha_6\beta_1$ in the adhesion of platelets to other subendothelial glycoproteins and platelet activation in response to various agonists. (A-E) Hirudinized (100 U/mL) whole blood from WT and $\alpha_6^{-/-}$ mice was perfused through microcapillaries coated with VWF (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A), ASC collagen (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (B), FGN (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (C), fibronectin (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (D) or TSP-1 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (E) at a wall shear rate supporting optimal platelet adhesion: 1,500 s^{-1} (VWF and collagen) or 300 s^{-1} (FGN, fibronectin and TSP-1). The time-course of platelet adhesion was determined in one random field by DIC microscopy. Thrombus formation on collagen was monitored by confocal microscopy using blood in which the platelets had been stained with an Alexa Fluor 488-coupled anti-GPIIb β antibody. (F) Hirudinized human blood was incubated for 10 min with irrelevant rat IgG_{2a} (control) or a blocking antibody against $\alpha_6\beta_1$ (GoH3, both 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and perfused over TSP-1 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 300 s^{-1} . After 10 min, the number of adherent platelets was counted in 8 random fields and expressed as a percentage of the control set to 100%. (A-F) Data are the mean \pm SEM in 3 to 8 independent experiments. *** $p < 0.001$. (G) Washed platelets ($2 \times 10^8/\text{mL}$) from WT and $\alpha_6^{-/-}$

$\alpha_6^{-/-}$ mice were aggregated by a range of agonists in the presence (ADP, AYPGKF, U46619, Horm collagen and CRP-XL) or absence (thrombin) of FGN (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Arrows indicate the point of agonist addition and aggregation profiles are representative of 3 separate experiments. (H, I) WT and $\alpha_6^{-/-}$ washed platelets ($5 \times 10^7/\text{mL}$) were stimulated with various agonists in the presence of Alexa Fluor 488-FGN (H) or a FITC-anti-P-selectin antibody (I). After 20 (H) or 10 (I) min, the samples were fixed and the extent of FGN binding or P-selectin exposure was measured by flow cytometry. Results represent the geometric mean \pm SEM of the relative fluorescence intensity in arbitrary units, in 3 separate experiments performed in duplicate (10,000 platelets analyzed per experiment). (J) WT and $\alpha_6^{-/-}$ washed platelets ($2.4 \times 10^7/\text{mL}$) were stimulated with the indicated agonists for 10 min, incubated with FITC-annexin V for 20 min and analyzed by flow cytometry. The forward light scatter and fluorescence intensity of 10,000 cells were collected with a logarithmic gain and the percentage of annexin V-positive platelets was determined in the upper right quadrant. Data are the mean \pm SEM in at least 3 separate experiments performed in duplicate.

Figure 6. $\alpha_6^{-/-}$ mice exhibit a decreased thrombotic response after guide wire injury of the carotid artery, forceps injury of the aorta or superficial laser injury of a mesenteric arteriole. Thrombosis was triggered in WT and $\alpha_6^{-/-}$ mice by passage of a guide wire into the right common carotid (A-C), forceps compression of the abdominal aorta (D-F) or superficial laser injury of a mesenteric arteriole (G-I). Thrombus formation was monitored by fluorescence microscopy (see Methods). Representative fluorescence (A, D) or composite bright field and fluorescence (G) photographs of the thrombus at maximal size 90 (A), 80 (D) or 30 (G) s after injury. Arrows indicate the direction of blood flow. Bars: 1 mm (A), 0.5 mm (D) and 20 μm (G). (B, E, H) Time-course of thrombus growth, represented by the mean thrombus surface area. The shading under the curves corresponds to the SEM. (C, F, I) Bar graphs depict the areas under the curves shown in B, E and H, respectively. Data are from 5 (E, F) or 6 (B, C) mice, or from 12 vessels in 3 mice (H, I). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 7. $\alpha_6^{-/-}$ mice display normal tail bleeding. Amputation of a 3-mm distal tail segment was performed in WT and $\alpha_6^{-/-}$ mice and the time required for first arrest of bleeding was measured (A). The total bleeding time (B) and volume of blood lost (C) were then recorded

over a 30-min period. If the blood flow did not cease after 30 min, the tail was cauterized and the bleeding time was set at >1,800 s. The symbols represent individual mice (n = 19) and median values are indicated by horizontal bars.

ONLINE SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1. TEM analysis and pharmacological characterization of thrombosis induced by guide wire injury of the carotid artery or forceps compression of the aorta. The right common carotid (A, B) or abdominal aorta (C, D) of C57BL/6 WT mice was dissected free, injured or not with a guide wire (A, B) or forceps (C, D) and immediately fixed by perfusion with glutaraldehyde. (A, C) TEM cross-section images of intact (a) and injured (b) arteries. The photographs are representative of several sections taken from at least 2 mice. Bars: 5 (A) or 2 (C) μm . The inserts show a platelet adhering to exposed subendothelium. Bars: 0.5 μm . P, platelet; EC, endothelial cell; IEL, internal elastic lamina; SMC, smooth muscle cell; M, media. A carotid guide wire (B) or an aortic forceps (D) injury was generated in C57BL/6 WT mice pretreated with vehicle, clopidogrel (50 mg/kg), hirudin (20 mg/kg), or eptifibatid (20 mg/kg) and thrombus formation was monitored by fluorescence microscopy (see Methods). (B, D) Time-course of thrombus growth, represented by the mean thrombus surface area. The shading under the curves corresponds to the SEM and the data are from 5 mice.

Figure S2. β_1 integrin-deficient mice exhibit a decreased thrombotic response after guide wire injury of the carotid artery or forceps injury of the aorta. A carotid guide wire (A, B) or an aortic forceps (C, D) injury was generated in WT and $\beta_1^{-/-}$ mice and thrombus formation was monitored by fluorescence microscopy, as in Figure 6. (A, C) Time-course of thrombus growth, represented by the mean thrombus surface area. The shading under the curves corresponds to the SEM. (B, D) Bar graphs depict the areas under the curves shown in A and C, respectively. Data are from 4 (A, B) or 6 (C, D) mice. $**p < 0.01$.

Figure S3. $\alpha_6^{-/-}$ mice display a normal thrombotic response after deep laser injury of a mesenteric arteriole. A localized deep laser injury of a mesenteric arteriole was generated in WT and $\alpha_6^{-/-}$ mice and the ensuing thrombus formation was monitored by fluorescence

microscopy (see Methods). (A) Time-course of thrombus growth, represented by the mean thrombus surface area. The shading under the curves corresponds to the SEM. (B) Bar graphs depict the areas under the curves shown in A. Data are from 6 vessels in 3 mice.

REFERENCES

- Austin, R.C., J.E. Fox, G.H. Werstuck, A.R. Stafford, D.E. Bulman, G.Y. Dally, C.A. Ackerley, J.I. Weitz, and P.N. Ray. 2002. Identification of Dp71 isoforms in the platelet membrane cytoskeleton. Potential role in thrombin-mediated platelet adhesion. *J Biol Chem* 277:47106-47113.
- Beumer, S., H.F. Heijnen, I.J. MJ, E. Orlando, P.G. de Groot, and J.J. Sixma. 1995. Platelet adhesion to fibronectin in flow: the importance of von Willebrand factor and glycoprotein Ib. *Blood* 86:3452-3460.
- Bolcato-Bellemin, A.L., O. Lefebvre, C. Arnold, L. Sorokin, J.H. Miner, M. Kedinger, and P. Simon-Assmann. 2003. Laminin alpha5 chain is required for intestinal smooth muscle development. *Dev Biol* 260:376-390.
- Calzada, M.J., J.M. Sipes, H.C. Krutzsch, P.D. Yurchenco, D.S. Annis, D.F. Mosher, and D.D. Roberts. 2003. Recognition of the N-terminal modules of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 by alpha6beta1 integrin. *J Biol Chem* 278:40679-40687.
- Cazenave, J.P., P. Ohlmann, D. Cassel, A. Eckly, B. Hechler, and C. Gachet. 2004. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* 272:13-28.
- Cazenave, J.P., M.A. Packham, M.A. Guccione, and J.F. Mustard. 1975. Inhibition of platelet adherence to damaged surface of rabbit aorta. *J Lab Clin Med* 86:551-563.
- Chang, J.C., H.H. Chang, C.T. Lin, and S.J. Lo. 2005. The integrin alpha6beta1 modulation of PI3K and Cdc42 activities induces dynamic filopodium formation in human platelets. *J Biomed Sci* 12:881-898.
- Chopek, M.W., J.P. Girma, K. Fujikawa, E.W. Davie, and K. Titani. 1986. Human von Willebrand factor: a multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry* 25:3146-3155.
- Denis, C., N. Methia, P.S. Frenette, H. Rayburn, M. Ullman-Cullere, R.O. Hynes, and D.D. Wagner. 1998. A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:9524-9529.
- Deutzmann, R., M. Aumailley, H. Wiedemann, W. Pysny, R. Timpl, and D. Edgar. 1990. Cell adhesion, spreading and neurite stimulation by laminin fragment E8 depends on maintenance of secondary and tertiary structure in its rod and globular domain. *Eur J Biochem* 191:513-522.
- Doi, M., J. Thyboll, J. Kortessmaa, K. Jansson, A. Iivanainen, M. Parvardeh, R. Timpl, U. Hedin, J. Swedenborg, and K. Tryggvason. 2002. Recombinant human laminin-10 (alpha5beta1gamma1). Production, purification, and migration-promoting activity on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277:12741-12748.
- Eckly, A., B. Hechler, M. Freund, M. Zerr, J.P. Cazenave, F. Lanza, P.H. Mangin, and C. Gachet. 2011. Mechanisms underlying FeCl(3)-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* 9:779-789.
- Edwards, M.M., E. Mammadova-Bach, F. Alpy, A. Klein, W.L. Hicks, M. Roux, P. Simon-Assmann, R.S. Smith, G. Orend, J. Wu, N.S. Peachey, J.K. Naggert, O. Lefebvre, and P.M. Nishina. 2010. Mutations in Lama1 disrupt retinal vascular development and inner limiting membrane formation. *J Biol Chem* 285:7697-7711.

- Ferletta, M., and P. Ekblom. 1999. Identification of laminin-10/11 as a strong cell adhesive complex for a normal and a malignant human epithelial cell line. *J Cell Sci* 112 (Pt 1):1-10.
- Germain, M., A. De Arcangelis, S.D. Robinson, M. Baker, B. Tavora, G. D'Amico, R. Silva, V. Kostourou, L.E. Reynolds, A. Watson, J.L. Jones, E. Georges-Labouesse, and K. Hodivala-Dilke. 2010. Genetic ablation of the alpha 6-integrin subunit in Tie1Cre mice enhances tumour angiogenesis. *J Pathol* 220:370-381.
- Gilbert, J.C., T. DeFeo-Fraulini, R.M. Hutabarat, C.J. Horvath, P.G. Merlino, H.N. Marsh, J.M. Healy, S. Boufakhreddine, T.V. Holohan, and R.G. Schaub. 2007. First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation* 116:2678-2686.
- Gu, Y.C., J. Kortessmaa, K. Tryggvason, J. Persson, P. Ekblom, S.E. Jacobsen, and M. Ekblom. 2003. Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood* 101:877-885.
- Hallmann, R., N. Horn, M. Selg, O. Wendler, F. Pausch, and L.M. Sorokin. 2005. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 85:979-1000.
- Hantgan, R.R., G. Hindriks, R.G. Taylor, J.J. Sixma, and P.G. de Groot. 1990. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood* 76:345-353.
- Hechler, B., and C. Gachet. 2011. Comparison of two murine models of thrombosis induced by atherosclerotic plaque injury. *Thrombosis and haemostasis*
- Hechler, B., C. Nonne, A. Eckly, S. Magnenat, J.Y. Rinckel, C.V. Denis, M. Freund, J.P. Cazenave, F. Lanza, and C. Gachet. 2010. Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb Haemost* 8:173-184.
- Hindriks, G., M.J. Ijsseldijk, A. Sonnenberg, J.J. Sixma, and P.G. de Groot. 1992. Platelet adhesion to laminin: role of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions, shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *Blood* 79:928-935.
- Holtkotter, O., B. Nieswandt, N. Smyth, W. Muller, M. Hafner, V. Schulte, T. Krieg, and B. Eckes. 2002. Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *The Journal of biological chemistry* 277:10789-10794.
- Inoue, O., K. Suzuki-Inoue, O.J. McCarty, M. Moroi, Z.M. Ruggeri, T.J. Kunicki, Y. Ozaki, and S.P. Watson. 2006. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood* 107:1405-1412.
- Inoue, O., K. Suzuki-Inoue, and Y. Ozaki. 2008. Redundant mechanism of platelet adhesion to laminin and collagen under flow: involvement of von Willebrand factor and glycoprotein Ib-IX-V. *The Journal of biological chemistry* 283:16279-16282.
- Jurk, K., K.J. Clemetson, P.G. de Groot, M.F. Brodde, M. Steiner, N. Savion, D. Varon, J.J. Sixma, H. Van Aken, and B.E. Kehrel. 2003. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *Faseb J* 17:1490-1492.
- Kageyama, S., H. Yamamoto, M. Nagano, H. Arisaka, T. Kayahara, and R. Yoshimoto. 1997. Anti-thrombotic effects and bleeding risk of AJvW-2, a monoclonal antibody against human von Willebrand factor. *Br J Pharmacol* 122:165-171.
- Kelleher, C.M., S.E. McLean, and R.P. Mecham. 2004. Vascular extracellular matrix and aortic development. *Curr Top Dev Biol* 62:153-188.
- Li, H., S. Lockyer, A. Concepcion, X. Gong, H. Takizawa, M. Guertin, Y. Matsumoto, J. Kambayashi, N.N. Tandon, and Y. Liu. 2007. The Fab fragment of a novel anti-GPVI

- monoclonal antibody, OM4, reduces in vivo thrombosis without bleeding risk in rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27:1199-1205.
- Mangin, P., C.L. Yap, C. Nonne, S.A. Sturgeon, I. Goncalves, Y. Yuan, S.M. Schoenwaelder, C.E. Wright, F. Lanza, and S.P. Jackson. 2006. Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcRgamma deficiency. *Blood* 107:4346-4353.
- Mangin, P.H., C. Tang, C. Bourdon, S. Loyau, M. Freund, B. Hechler, C. Gachet, and M. Jandrot-Perrus. 2012. A humanized GPVI mouse model to assess the antithrombotic efficacy of anti-GPVI agents. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*
- Massberg, S., M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlhofer, U. Heinzmann, and B. Nieswandt. 2003. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *The Journal of experimental medicine* 197:41-49.
- Miekka, S.I., K.C. Ingham, and D. Menache. 1982. Rapid methods for isolation of human plasma fibronectin. *Thrombosis research* 27:1-14.
- Miller, M.W., S. Basra, D.W. Kulp, P.C. Billings, S. Choi, M.P. Beavers, O.J. McCarty, Z. Zou, M.L. Kahn, J.S. Bennett, and W.F. DeGrado. 2009. Small-molecule inhibitors of integrin alpha2beta1 that prevent pathological thrombus formation via an allosteric mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:719-724.
- Mori, T., K. Ono, Y. Kariya, T. Ogawa, S. Higashi, and K. Miyazaki. 2010. Laminin-3B11, a novel vascular-type laminin capable of inducing prominent lamellipodial protrusions in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 285:35068-35078.
- Niculescu, C., G. Ganguli-Indra, V. Pfister, V. Dupe, N. Messaddeq, A. De Arcangelis, and E. Georges-Labouesse. 2011. Conditional ablation of integrin alpha-6 in mouse epidermis leads to skin fragility and inflammation. *Eur J Cell Biol* 90:270-277.
- Nieswandt, B., C. Brakebusch, W. Bergmeier, V. Schulte, D. Bouvard, R. Mokhtari-Nejad, T. Lindhout, J.W. Heemskerk, H. Zirngibl, and R. Fassler. 2001. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO journal* 20:2120-2130.
- Nigatu, A., W. Sime, G. Gorfu, T. Geberhiwot, I. Anduren, S. Ingerpuu, M. Doi, K. Tryggvason, P. Hjemdahl, and M. Patarroyo. 2006. Megakaryocytic cells synthesize and platelets secrete alpha5-laminins, and the endothelial laminin isoform laminin 10 (alpha5beta1gamma1) strongly promotes adhesion but not activation of platelets. *Thromb Haemost* 95:85-93.
- Nishiuchi, R., O. Murayama, H. Fujiwara, J. Gu, T. Kawakami, S. Aimoto, Y. Wada, and K. Sekiguchi. 2003. Characterization of the ligand-binding specificities of integrin alpha3beta1 and alpha6beta1 using a panel of purified laminin isoforms containing distinct alpha chains. *J Biochem* 134:497-504.
- Nonne, C., N. Lenain, B. Hechler, P. Mangin, J.P. Cazenave, C. Gachet, and F. Lanza. 2005. Importance of platelet phospholipase Cgamma2 signaling in arterial thrombosis as a function of lesion severity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:1293-1298.
- Perrault, C., S. Moog, E. Rubinstein, M. Santer, M.J. Baas, C. de la Salle, C. Ravanat, J. Dambach, M. Freund, S. Santoso, J.P. Cazenave, and F. Lanza. 2001. A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIIb/IIIa modulates vWF mediated platelet adhesion. *Thrombosis and haemostasis* 86:1238-1248.
- Petajaniemi, N., M. Korhonen, J. Korttesmaa, K. Tryggvason, K. Sekiguchi, H. Fujiwara, L. Sorokin, L.E. Thornell, Z. Wondimu, D. Assefa, M. Patarroyo, and I. Virtanen. 2002. Localization of laminin alpha4-chain in developing and adult human tissues. *J Histochem Cytochem* 50:1113-1130.

- Rauch, U., A. Saxena, S. Lorkowski, J. Rauterberg, H. Bjorkbacka, M. Durbeej, and A. Hultgardh-Nilsson. 2011. Laminin isoforms in atherosclerotic arteries from mice and man. *Histol Histopathol* 26:711-724.
- Ravanat, C., C. Strassel, B. Hechler, S. Schuhler, G. Chicanne, B. Payrastre, C. Gachet, and F. Lanza. 2010. A central role of GPIb-IX in the procoagulant function of platelets that is independent of the 45-kDa GPIb α N-terminal extracellular domain. *Blood* 116:1157-1164.
- Roberts, D.D., J. Cashel, and N. Guo. 1994. Purification of thrombospondin from human platelets. *Journal of Tissue Culture Methods* 16:217-222.
- Savage, B., F. Almus-Jacobs, and Z.M. Ruggeri. 1998. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94:657-666.
- Schaff, M., N. Receveur, C. Bourdon, P. Ohlmann, F. Lanza, C. Gachet, and P.H. Mangin. 2012. beta-arrestin-1 participates in thrombosis and regulates integrin α IIb β 3 signalling without affecting P2Y receptors desensitisation and function. *Thrombosis and haemostasis* 107:735-748.
- Schaff, M., N. Receveur, C. Bourdon, V. Wurtz, C.V. Denis, G. Orend, C. Gachet, F. Lanza, and P.H. Mangin. 2011. Novel function of tenascin-C, a matrix protein relevant to atherosclerosis, in platelet recruitment and activation under flow. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31:117-124.
- Silva, J.F., F.Z. Cyrino, M.M. Breitenbach, E. Bouskela, and J.J. Carvalho. 2011. Vimentin and laminin are altered on cheek pouch microvessels of streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Clinics* 66:1961-1968.
- Simon-Assmann, P., G. Orend, E. Mammadova-Bach, C. Spenle, and O. Lefebvre. 2011. Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis. *Int J Dev Biol* 55:455-465.
- Sonnenberg, A., P.W. Modderman, and F. Hogervorst. 1988. Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature* 336:487-489.
- Sorokin, L.M., S. Conzelmann, P. Ekblom, C. Battaglia, M. Aumailley, and R. Timpl. 1992. Monoclonal antibodies against laminin A chain fragment E3 and their effects on binding to cells and proteoglycan and on kidney development. *Exp Cell Res* 201:137-144.
- Sorokin, L.M., F. Pausch, M. Frieser, S. Kroger, E. Ohage, and R. Deutzmann. 1997. Developmental regulation of the laminin α 5 chain suggests a role in epithelial and endothelial cell maturation. *Dev Biol* 189:285-300.
- Sung, U., J.J. O'Rear, and P.D. Yurchenco. 1993. Cell and heparin binding in the distal long arm of laminin: identification of active and cryptic sites with recombinant and hybrid glycoprotein. *J Cell Biol* 123:1255-1268.
- Tandon, N.N., E.A. Holland, U. Kralisz, H.K. Kleinman, F.A. Robey, and G.A. Jamieson. 1991. Interaction of human platelets with laminin and identification of the 67 kDa laminin receptor on platelets. *Biochem J* 274 (Pt 2):535-542.
- Taniguchi, Y., H. Ido, N. Sanzen, M. Hayashi, R. Sato-Nishiuchi, S. Futaki, and K. Sekiguchi. 2009. The C-terminal region of laminin beta chains modulates the integrin binding affinities of laminins. *J Biol Chem* 284:7820-7831.
- Tiedt, R., T. Schomber, H. Hao-Shen, and R.C. Skoda. 2007. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood* 109:1503-1506.
- Tronik-Le Roux, D., V. Roullot, C. Poujol, T. Kortulewski, P. Nurden, and G. Marguerie. 2000. Thrombasthenic mice generated by replacement of the integrin α (IIb) gene: demonstration that transcriptional activation of this megakaryocytic locus precedes lineage commitment. *Blood* 96:1399-1408.

- Ulrichs, H., K. Silence, A. Schoolmeester, P. de Jaegere, S. Rossenu, J. Roodt, S. Priem, M. Lauwereys, P. Casteels, F. Van Bockstaele, K. Verschueren, P. Stanssens, J. Baumeister, and J.B. Holz. 2011. Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. *Blood* 118:757-765.
- Ungerer, M., K. Rosport, A. Bultmann, R. Piechatzek, K. Uhland, P. Schlieper, M. Gawaz, and G. Munch. 2011. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation* 123:1891-1899.
- Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt. 2008. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28:403-412.
- Virtanen, I., D. Gullberg, J. Rissanen, E. Kivilaakso, T. Kiviluoto, L.A. Laitinen, V.P. Lehto, and P. Ekblom. 2000. Laminin alpha1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp Cell Res* 257:298-309.
- Vitolo, D., L. Ciocci, G. Deriu, S. Spinelli, S. Cortese, L. Masuelli, S. Morrone, M.J. Filice, G.F. Coloni, P.G. Natali, and C.D. Baroni. 2006. Laminin alpha2 chain-positive vessels and epidermal growth factor in lung neuroendocrine carcinoma: a model of a novel cooperative role of laminin-2 and epidermal growth factor in vessel neoplastic invasion and metastasis. *Am J Pathol* 168:991-1003.
- Wondimu, Z., G. Gorfu, T. Kawataki, S. Smirnov, P. Yurchenco, K. Tryggvason, and M. Patarroyo. 2006. Characterization of commercial laminin preparations from human placenta in comparison to recombinant laminins 2 (alpha2beta1gamma1), 8 (alpha4beta1gamma1), 10 (alpha5beta1gamma1). *Matrix Biol* 25:89-93.
- Wu, D., M. Meiring, H.F. Kotze, H. Deckmyn, and N. Cauwenberghs. 2002. Inhibition of platelet glycoprotein Ib, glycoprotein IIb/IIIa, or both by monoclonal antibodies prevents arterial thrombosis in baboons. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22:323-328.
- Yousuf, O., and D.L. Bhatt. 2011. The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 8:547-559.

Table I. Platelet counts and surface expression of the major glycoproteins in WT and $\alpha_6^{-/-}$ mice.

	WT	$\alpha_6^{-/-}$
GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)	4.29±0.11	4.46±0.13
GPIIa (β_1)	1.46±0.02	1.57±0.11
GPIa (α_2)	0.81±0.07	0.84±0.07
GPIc (α_5)	0.127±0.008	0.158±0.005*
GPIc' (α_6)	2.86±0.05	0.015±0.005***
GPVI	0.30±0.01	0.30±0.02
GPV	0.79±0.03	0.80±0.02
GPIX	1.85±0.06	1.73±0.03
GPIb α	1.96±0.04	2.08±0.04
Platelet count (x 10 ⁶ /mL)	1,029±49	974±44

Platelet counts are the mean \pm SEM for groups of 19 mice. The surface expression of the indicated glycoproteins was determined in whole blood by staining with selective antibodies, followed by flow cytometric analysis. Platelets were gated by FSC/SSC characteristics (10,000 platelets per sample) and results are expressed as the geometric mean \pm SEM of the relative fluorescence intensity, in arbitrary units (3 to 8 mice per group). *p<0.05; ***p<0.001.

Figure 1

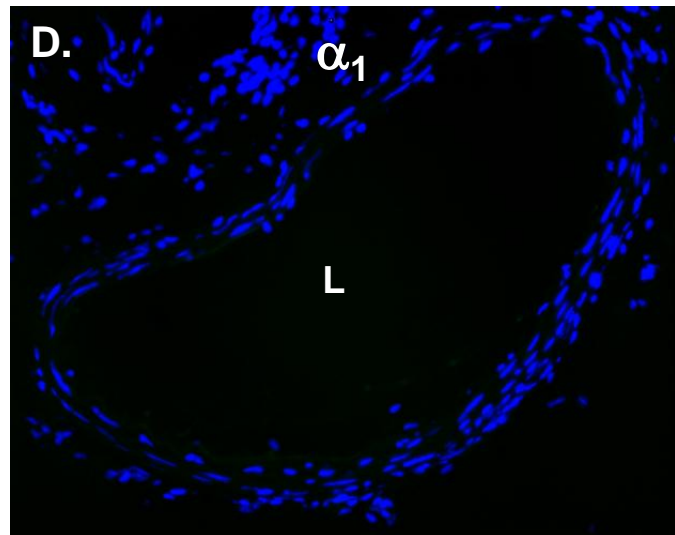
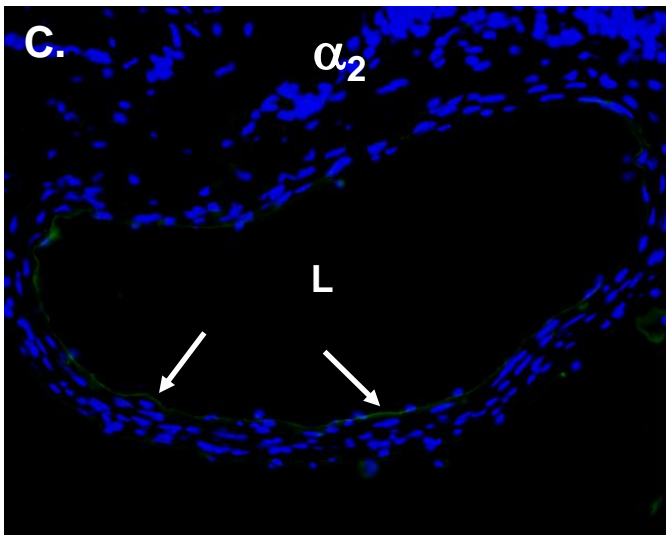
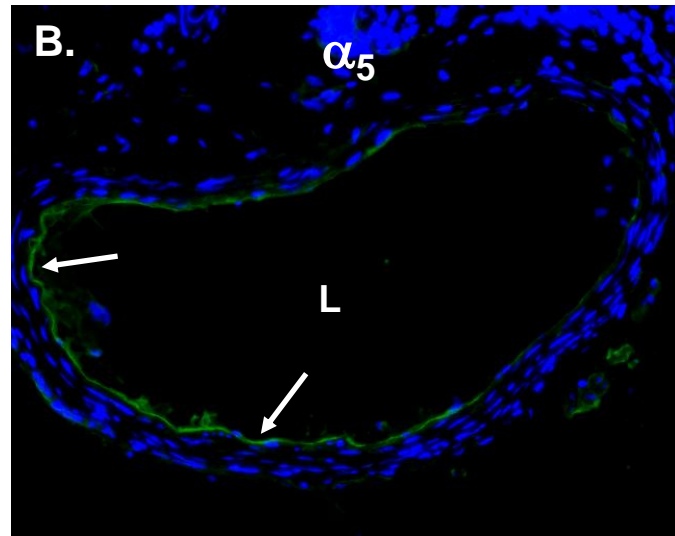
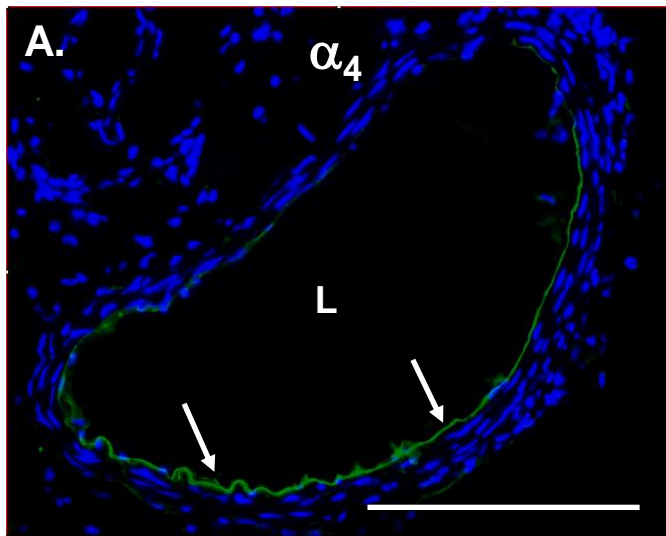


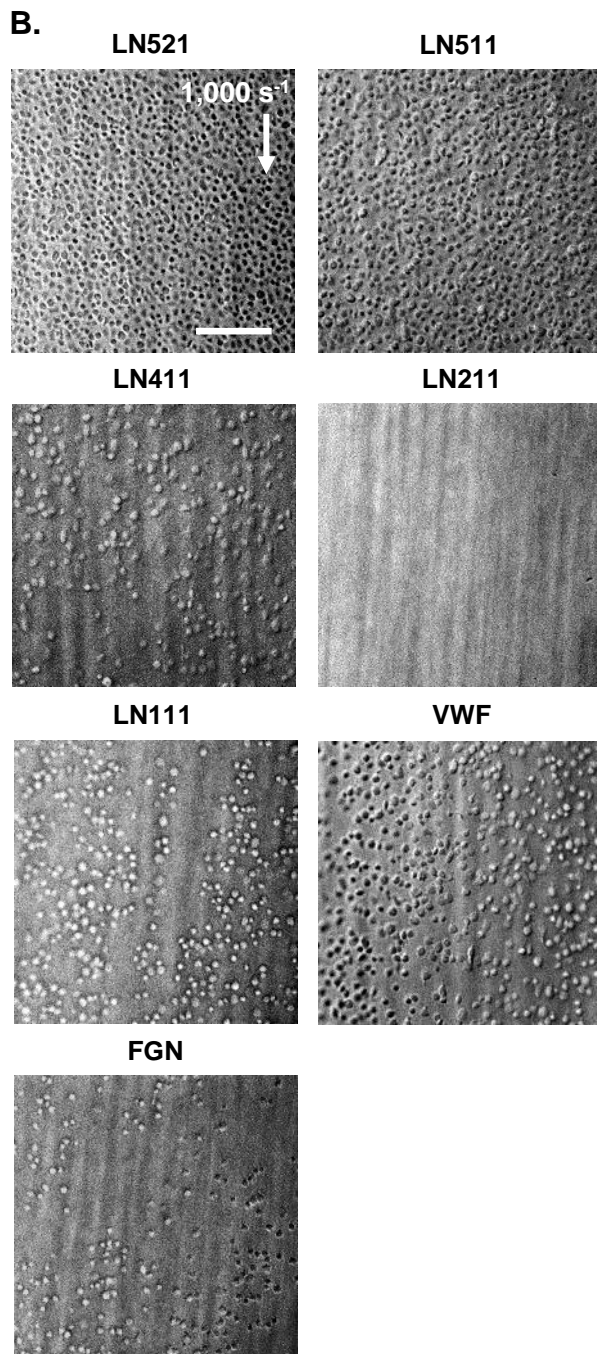
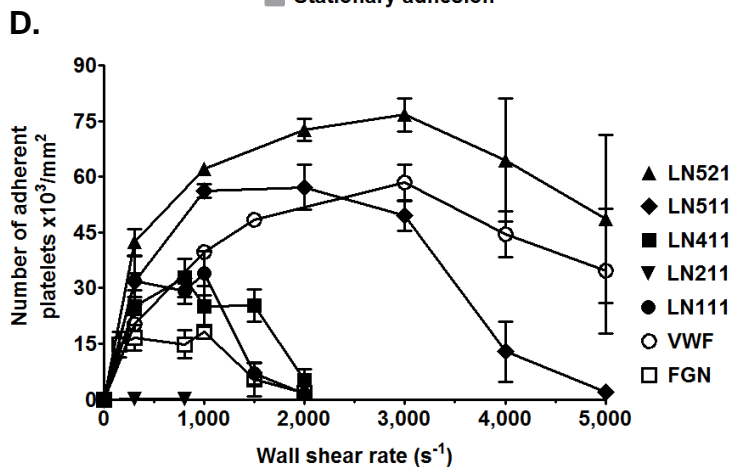
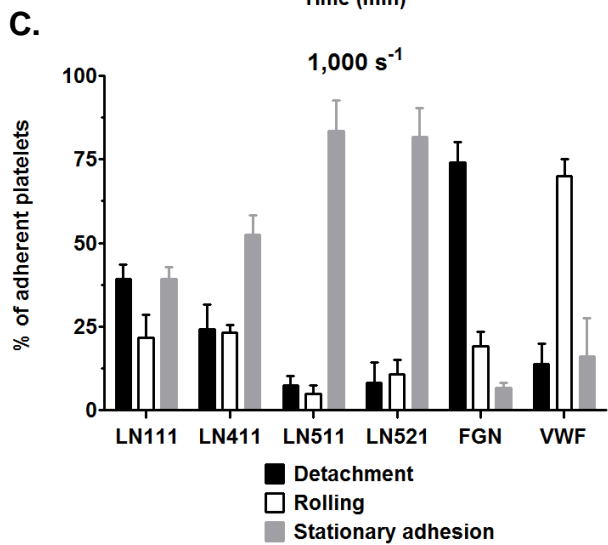
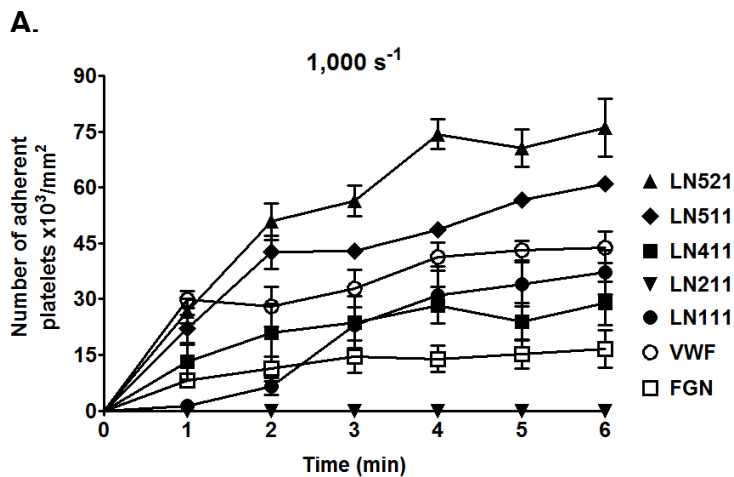
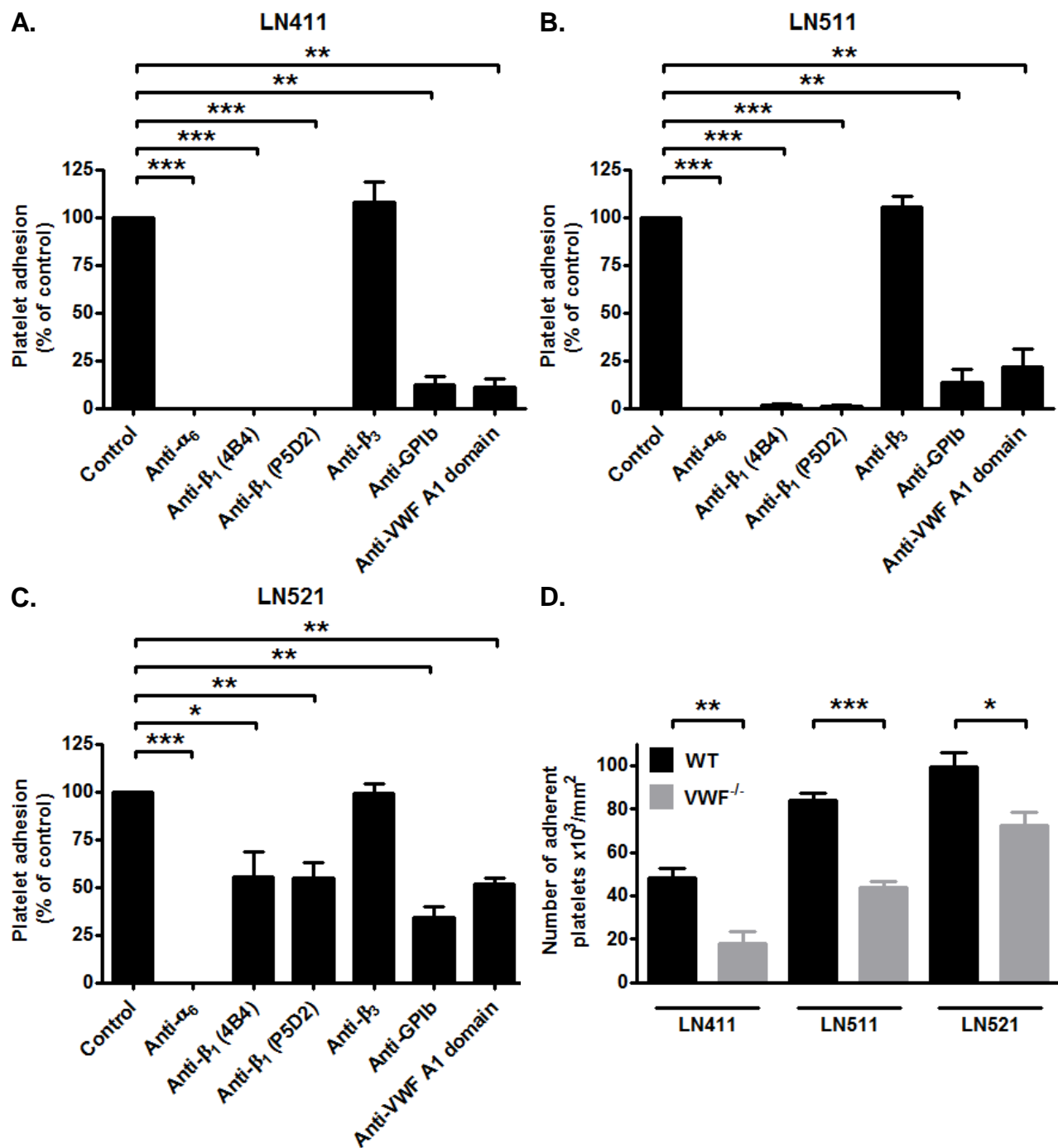
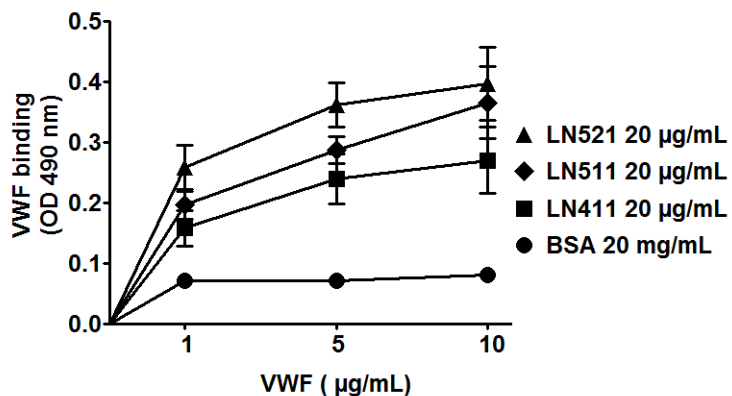
Figure 2

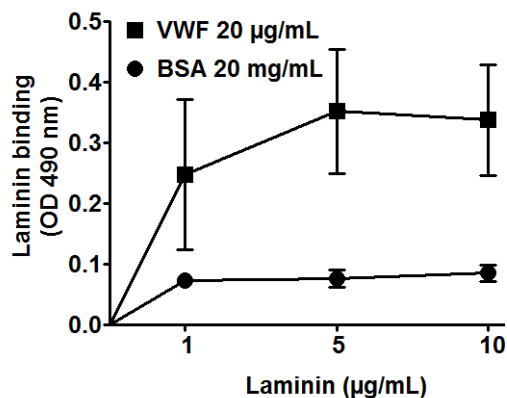
Figure 3



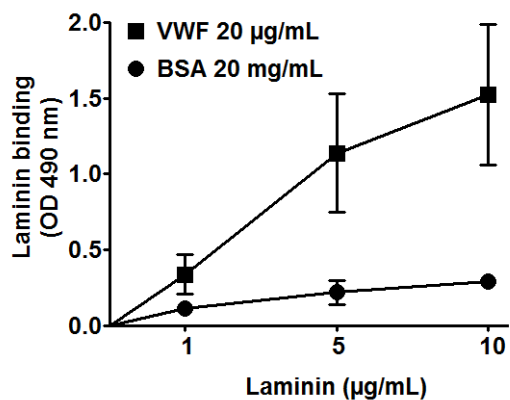
E. VWF binding to laminin-coated wells



F. LN411 binding to VWF-coated wells



G. LN511 binding to VWF-coated wells



H. LN521 binding to VWF-coated wells

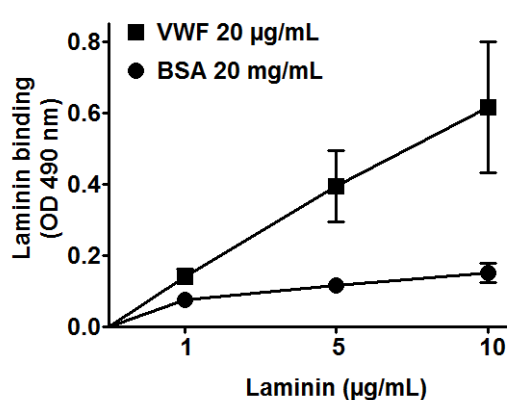


Figure 4

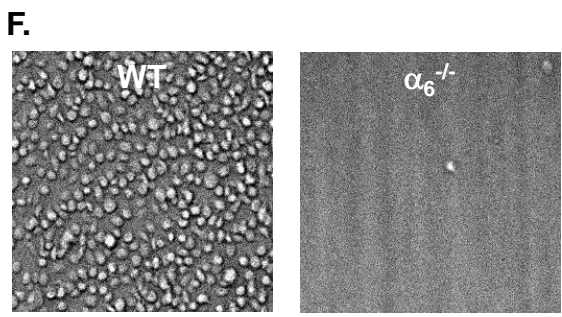
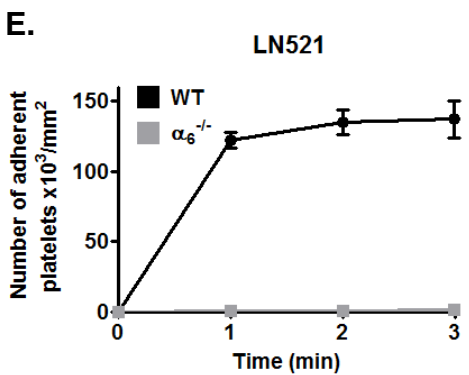
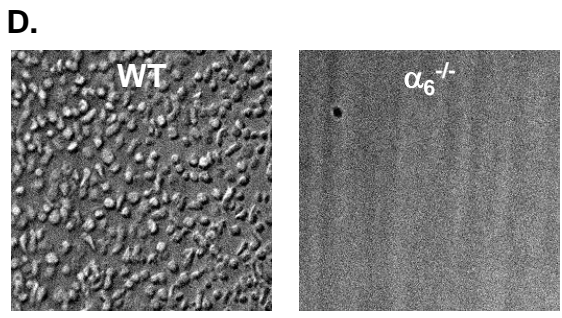
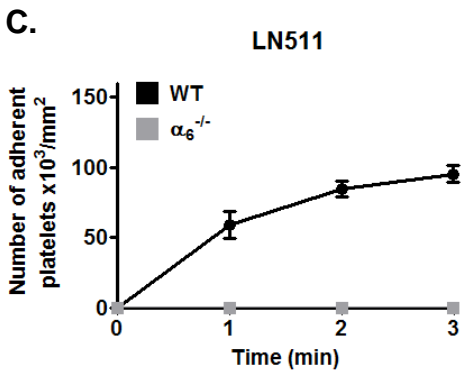
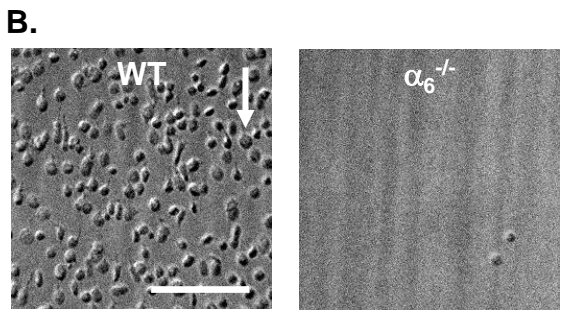
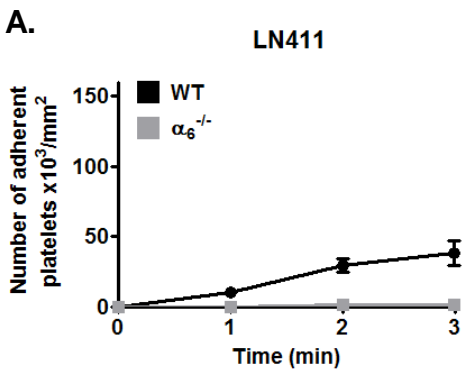
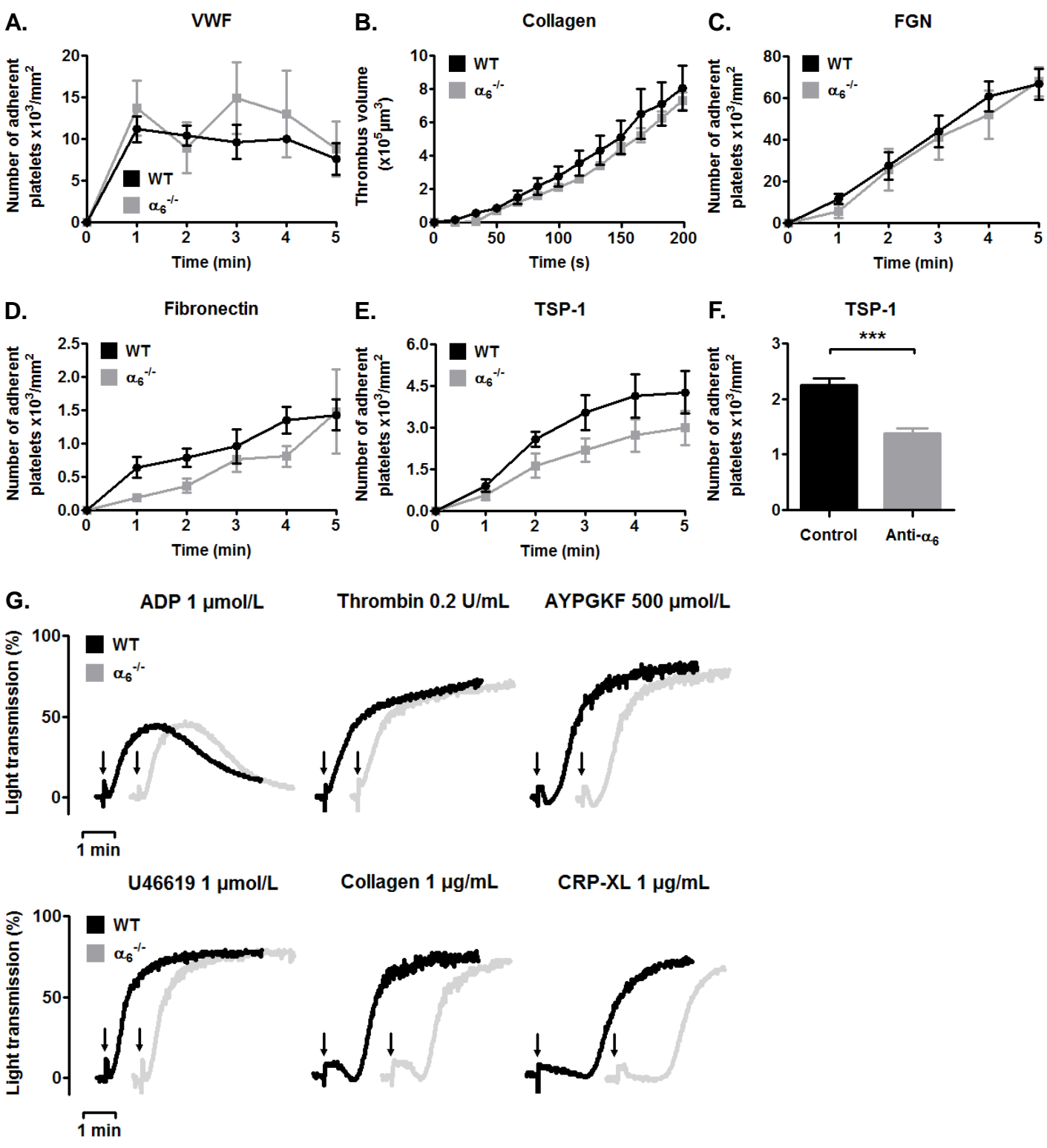


Figure 5



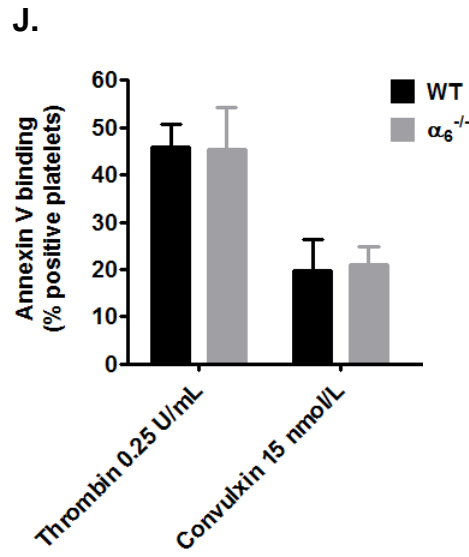
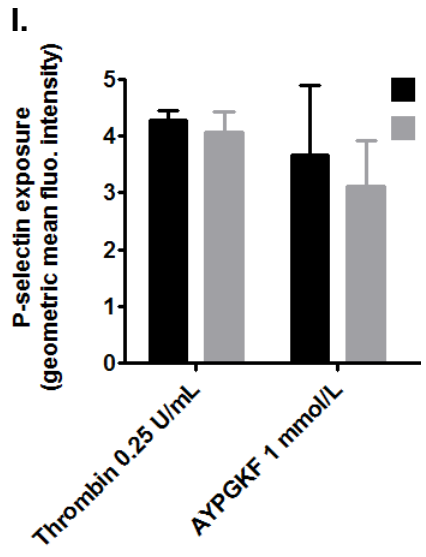
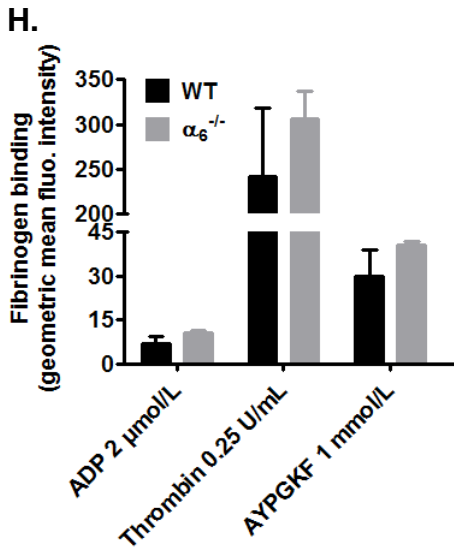
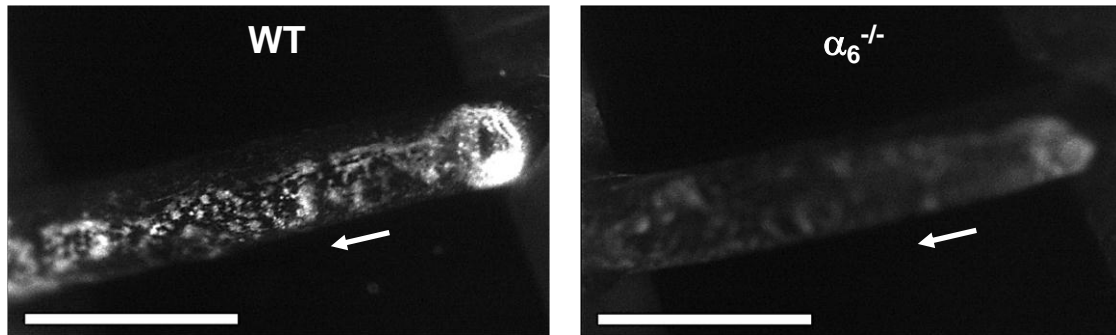
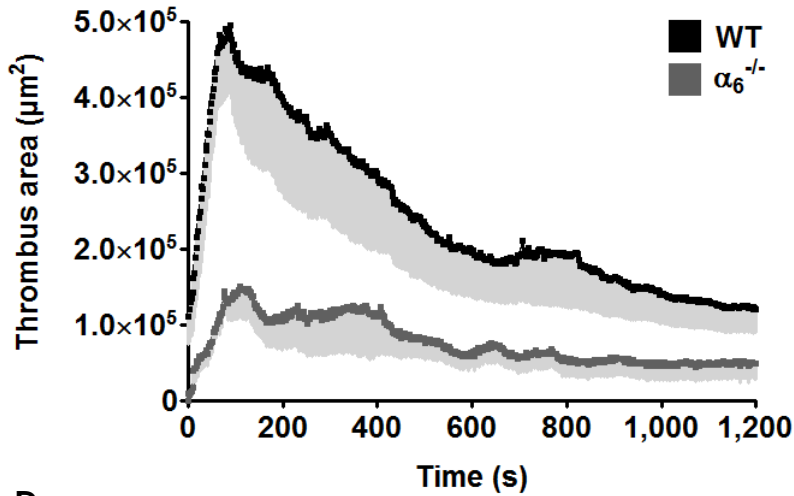
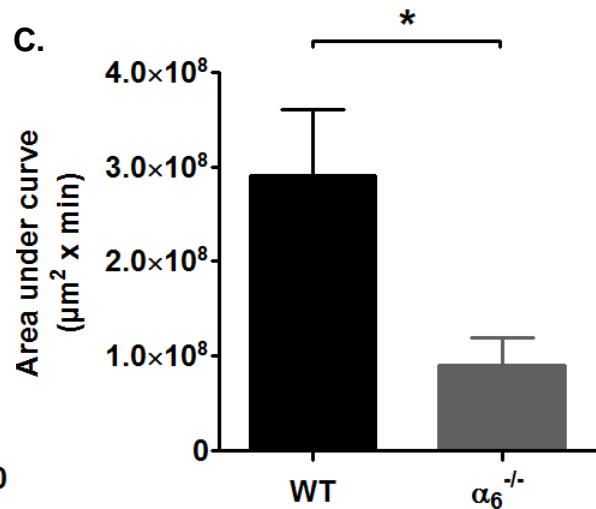
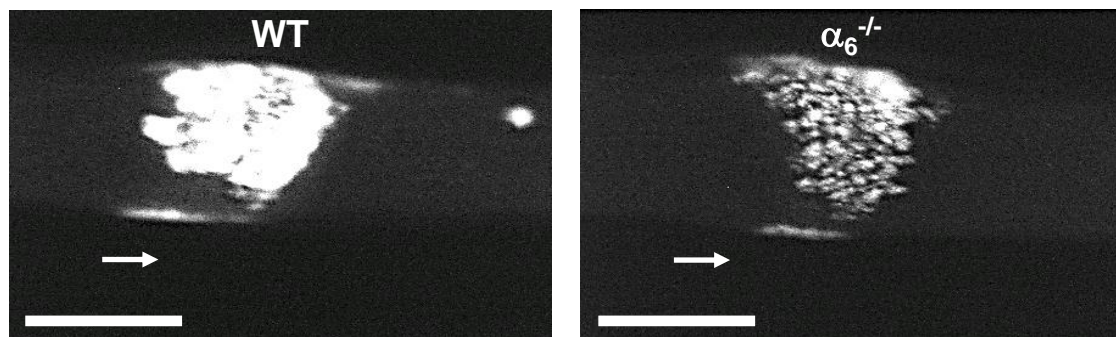
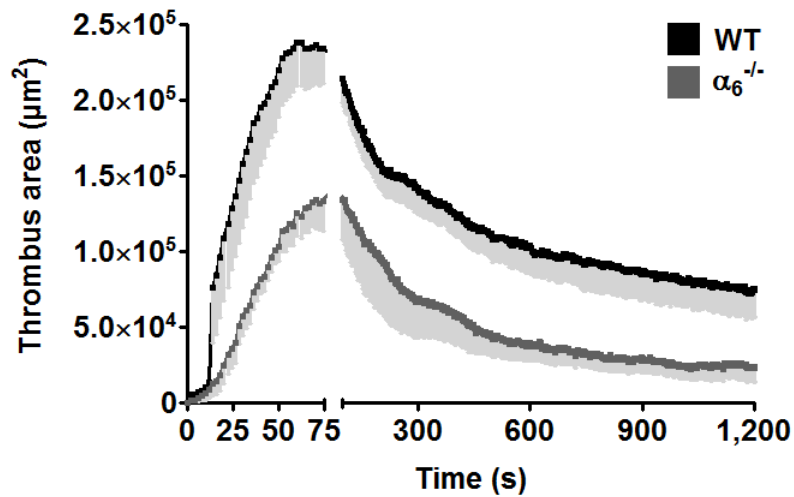
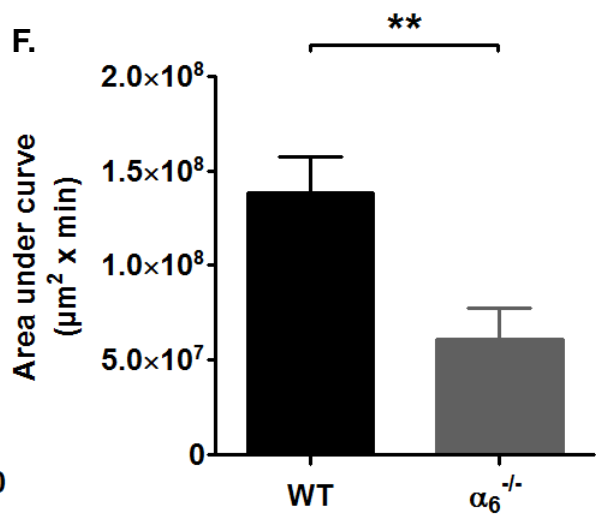
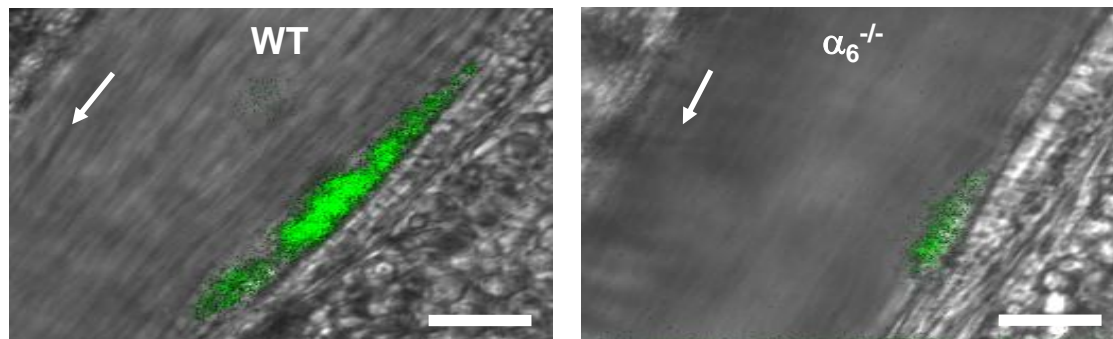
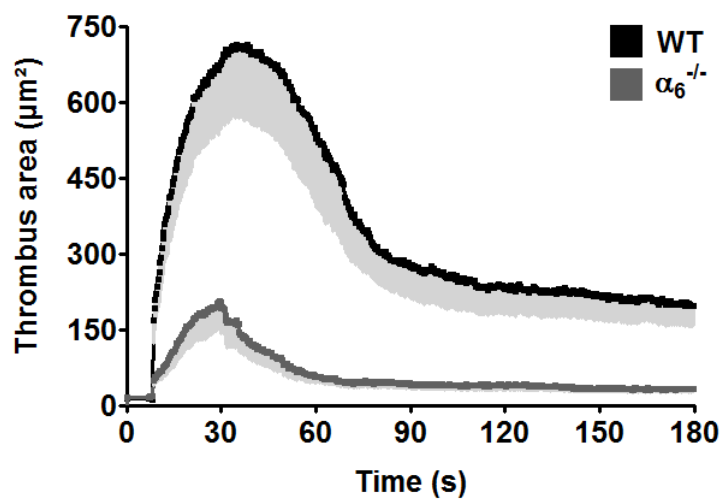


Figure 6**A.****B.****C.****D.****E.****F.**

G.



H.



I.

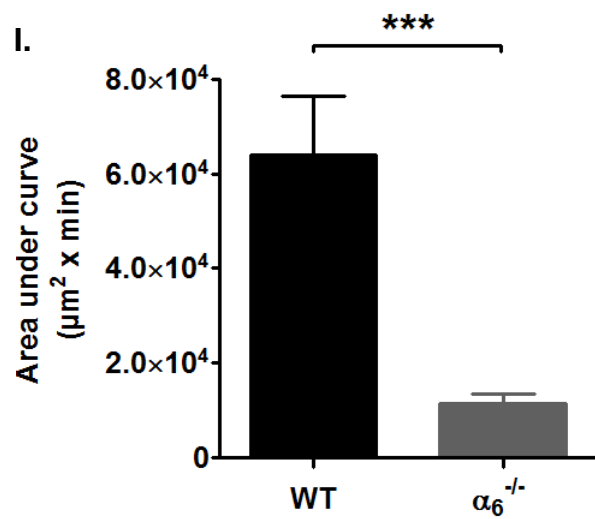


Figure 7

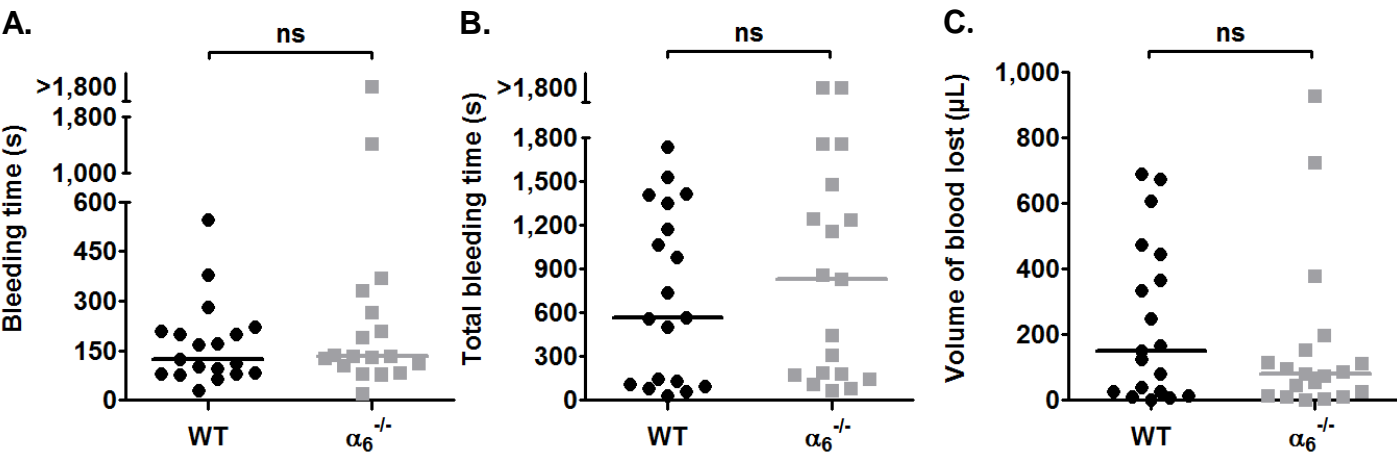


Figure S1

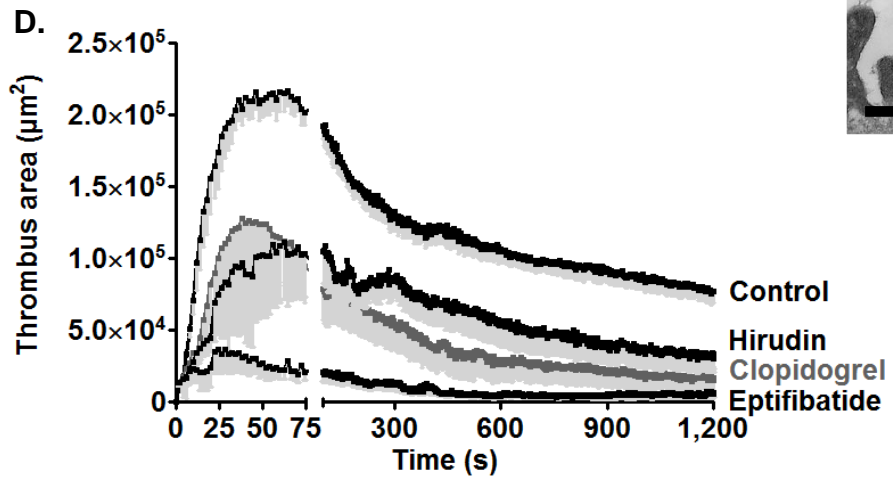
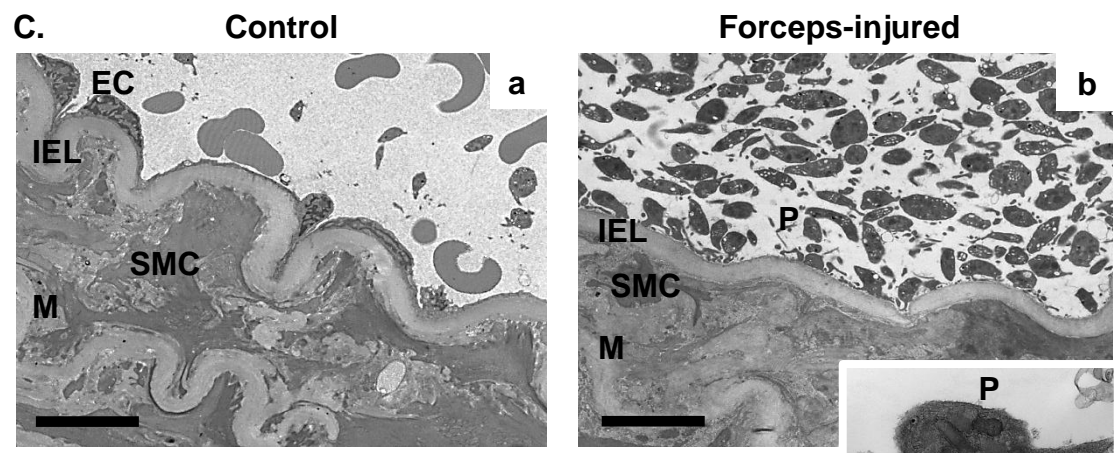
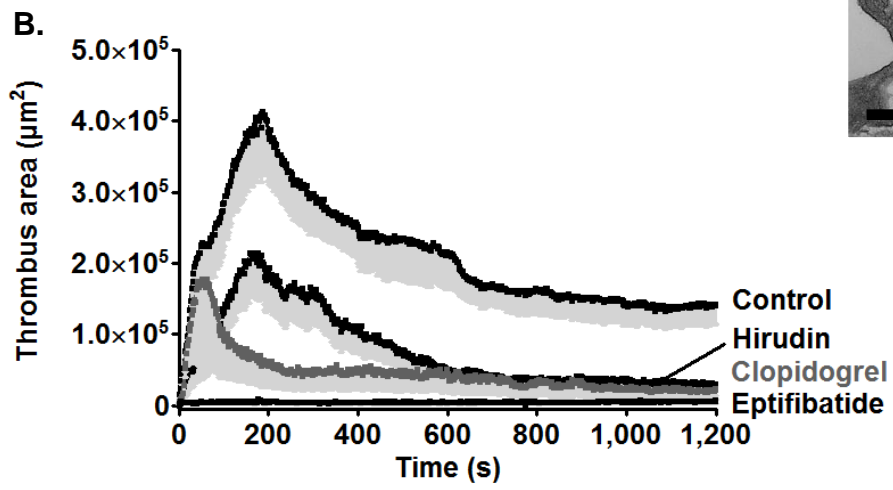
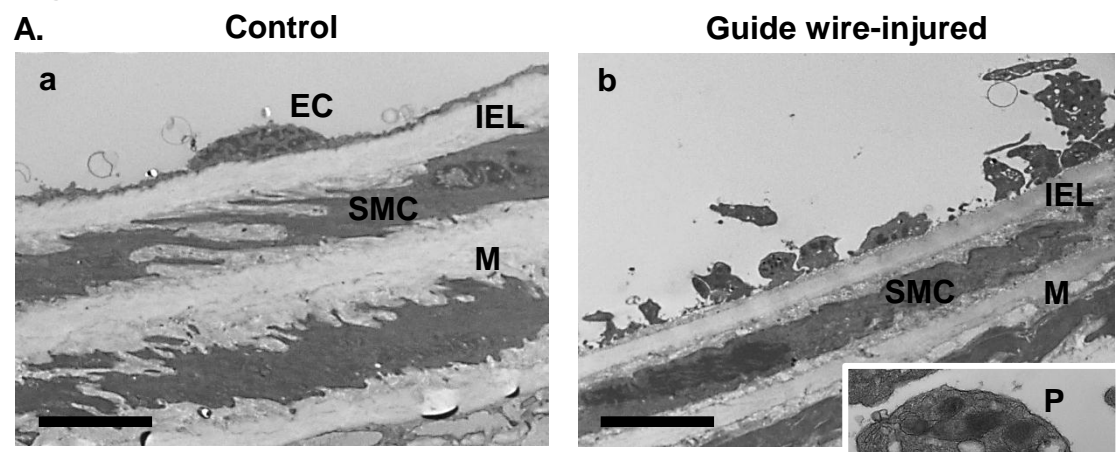


Figure S2

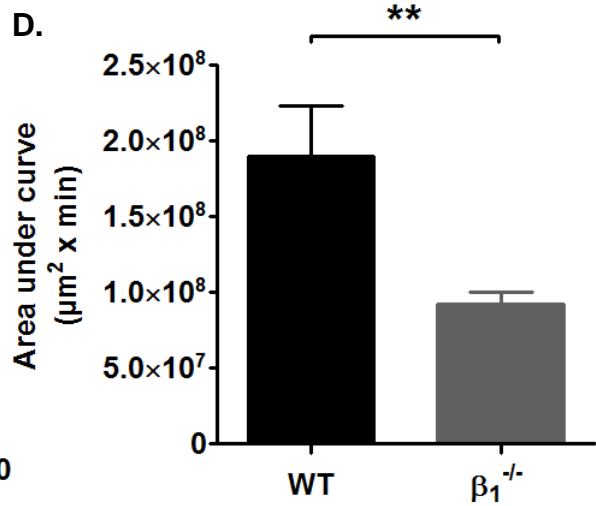
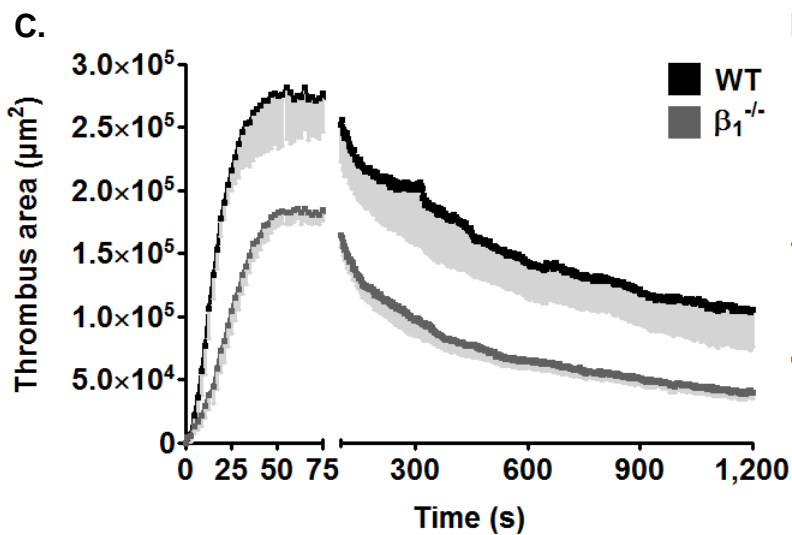
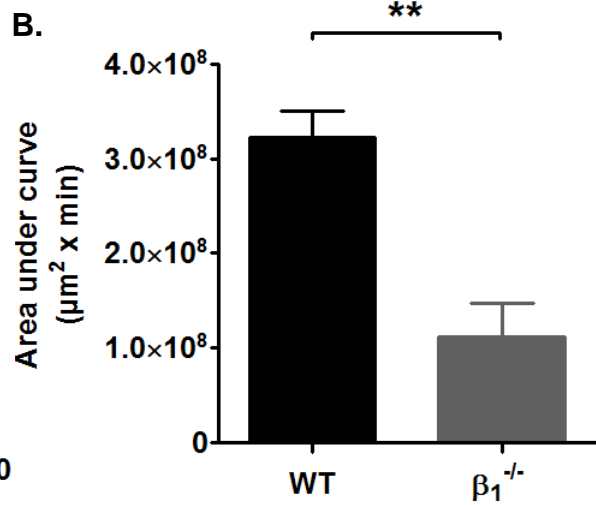
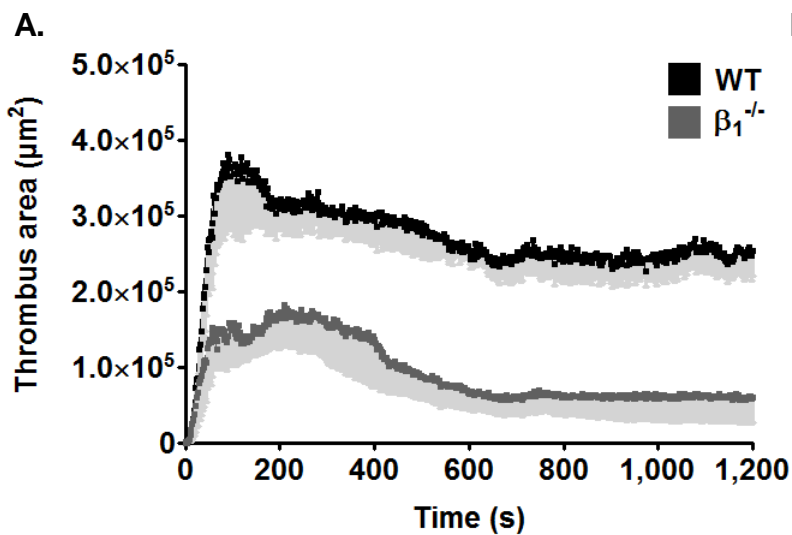
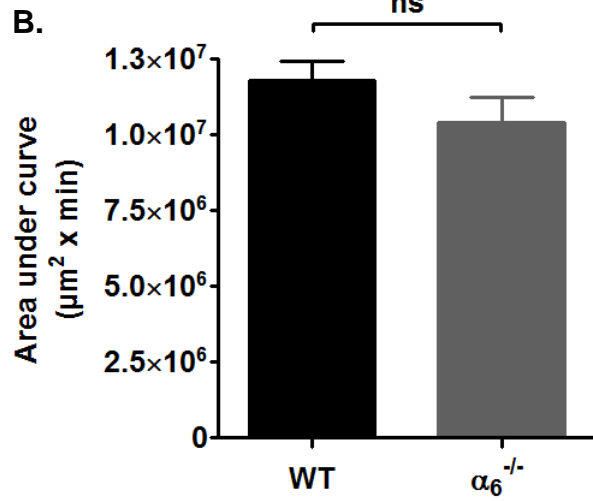
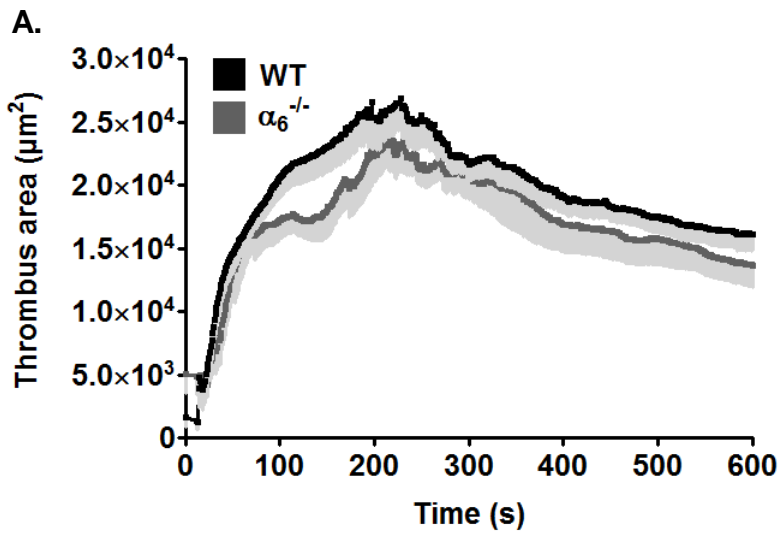


Figure S3



Conclusion

Ce travail a permis de montrer que les laminines vasculaires 411, 511 et 521 assurent une adhérence efficace des plaquettes comparativement à deux protéines adhésives bien caractérisées, le FW et le fibrinogène. Il est notable que les plaquettes adhèrent sur les laminines dans des conditions de flux élevés, tels que retrouvés dans la gorge d'une sténose. Ceci s'explique en partie par le fait que l'adhérence implique au moins deux récepteurs, l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ et la GPIb α , qui lie le FW adsorbé sur les laminines. Au contraire, la LN211, qui est présente dans les artérioles et les capillaires (**Sasaki et al., 2002**), ne possède pas de propriétés adhésives. Contrairement aux souris totalement invalidées pour l'intégrine α_6 (**Georges-Labouesse et al., 1996**), celles qui le sont seulement dans la lignée mégacaryocytaire ne souffrent pas de défauts majeurs. L'absence d'intégrine $\alpha_6\beta_1$ sur les plaquettes n'altère pas leur activation par les agonistes classiques, ni leur capacité à adhérer sur la plupart des glycoprotéines sous-endothéliales. Ces plaquettes sont en revanche incapables d'interagir avec les laminines, confirmant le rôle critique d' $\alpha_6\beta_1$ dans ce processus. Dans trois modèles, ces animaux présentent une inhibition marquée de la thrombose artérielle consécutive à une lésion superficielle produite mécaniquement ou par un tir laser. Le temps de saignement et le volume de sang perdu après section de la queue sont inchangés, indiquant l'absence de répercussion sur l'hémostase primaire.

En conclusion, ces résultats mettent pour la première fois en évidence une contribution de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ à la thrombose artérielle et suggèrent qu'elle pourrait constituer une cible anti-thrombotique attractive avec un risque de saignement minime.

Rôle de la TN-C dans l'adhérence et l'activation plaquettaires

Publication 2 :

**“Novel function of tenascin-C, a matrix protein relevant to atherosclerosis,
in platelet recruitment and activation under flow”**

Mathieu Schaff¹; Nicolas Receveur¹; Catherine Bourdon¹; Virginie Wurtz¹; Cécile V Denis²;
Gertraud Orend³; Christian Gachet¹; François Lanza¹; Pierre H Mangin¹

¹INSERM UMR-S949, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), Strasbourg, F-67065, France; ²INSERM UMR-S770, Université de Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, F-94270, France; ³INSERM UMR-S682, Université de Strasbourg, Strasbourg, F-67200, France

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 Jan;31(1):117-24.

Introduction

Les plaques d'athérosclérose sont le siège d'un intense remaniement matriciel consécutif à l'infiltration de cellules inflammatoires et au changement de phénotype des CML, conduisant à l'expression de nombreuses glycoprotéines peu présentes voire absentes de la paroi artérielle saine (**Libby et al., 2011**). Certaines de ces protéines pourraient participer à l'adhérence et l'activation des plaquettes, et constituer des candidats particulièrement attractifs pour un ciblage de la thrombose affectant peu l'hémostase. Nous en avons sélectionnées plusieurs d'intérêt, décrites pour être surexprimées dans les plaques évoluées et fragiles, et capables de lier des intégrines et moduler l'adhérence et la migration cellulaires. Il s'agit de la fibrilline-2 (**Panetta et al., 1998**), la fibuline-5 (**Nakamura et al., 1999**), l'ostéonectine, l'ostéopontine (**Dhore et al., 2001**), la périostine (**Bagnato et al., 2007**), la profiline-1 (**Caglayan et al., 2010**), la TN-C (**Kenji et al., 2004; Pedretti et al., 2010; von Lukowicz et al., 2007; Wallner et al., 1999**), ainsi que des galectines-1, -3 et -8 (**Al-Ansari et al., 2009**) et des membres de la famille CCN (CYR61 (*Cysteine-rich 61*), CTGF (*Connective tissue growth factor*), NOV (*Nephroblastoma overexpressed*)) (**Chen and Lau, 2009**). L'objectif de ce travail a été d'évaluer la capacité de ces glycoprotéines à permettre l'adhérence et l'activation des plaquettes en condition de flux.

Les protéines citées ci-dessus ont été achetées sous forme recombinante ou purifiée à partir de lignées cellulaires les surexprimant. Afin d'évaluer leurs propriétés adhésives, des microcapillaires de verre en ont été recouverts puis perfusés avec du sang humain à l'aide d'une pompe à seringue (**Figure 28**). Nous avons appliqué différents débits qui reproduisaient les taux de cisaillement rencontrés dans les artères saines et sténosées. Le nombre de plaquettes s'attachant ainsi que leur comportement adhésif ont été déterminés par microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC). Puis, des anticorps bloquants et du sang de souris modifiées génétiquement ont été utilisés pour identifier les récepteurs plaquettaires impliqués. Concernant l'activation des plaquettes, nous l'avons évaluée via deux marqueurs caractéristiques, à savoir le changement de forme et l'apparition de signaux calciques cytosoliques. Les résultats ont fait l'objet de la présente publication, ainsi que d'un commentaire sur le site Internet de l'*International Atherosclerosis Society* (IAS) (**Annexe**).

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

American Heart
Association®



Learn and Live SM

Novel Function of Tenascin-C, a Matrix Protein Relevant to Atherosclerosis, in Platelet Recruitment and Activation Under Flow

Mathieu Schaff, Nicolas Receveur, Catherine Bourdon, Virginie Wurtz, Cécile V. Denis, Gertraud Orend, Christian Gachet, François Lanza and Pierre H. Mangin
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011;31;117-124; originally published online Jul 22, 2010;

DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.206375

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association,
7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2011 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 1079-5642. Online
ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/full/31/1/117>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/full/ATVBAHA.110.206375/DC1>

Subscriptions: Information about subscribing to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular
Biology is online at

<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters
Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax:
410-528-8550. E-mail:

journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at

<http://www.lww.com/reprints>

Novel Function of Tenascin-C, a Matrix Protein Relevant to Atherosclerosis, in Platelet Recruitment and Activation Under Flow

Mathieu Schaff, Nicolas Receveur, Catherine Bourdon, Virginie Wurtz, Cécile V. Denis, Gertraud Orend, Christian Gachet, François Lanza, Pierre H. Mangin

Objective—The identification of platelet-reactive proteins exclusively present in atherosclerotic plaques could provide interesting targets for effective and safe antithrombotic strategies. In this context, we explored platelet adhesion and activation to tenascin-C (TN-C), a matrix protein preferentially found within atheroma.

Methods and Results—We show that platelets efficiently adhere to TN-C under both static and flow conditions. Videomicroscopy revealed a unique behavior under flow, with platelets exhibiting stationary adhesion to TN-C; in contrast, platelets rolled over von Willebrand factor and detached from fibrinogen. Platelet interaction with TN-C was predominantly supported by integrin $\alpha_2\beta_1$ under static conditions, whereas under high shear, it was dependent on both the $\alpha_2\beta_1$ integrin and the glycoprotein Ib-IX complex. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ appeared to play a secondary role but only at low shear rates. The glycoprotein Ib-IX-dependent interaction was indirect, relying on von Willebrand factor, and increased as a function of wall shear rate. Von Willebrand factor bound directly to TN-C, as shown by ELISA and coimmunoprecipitation, suggesting that it acts as a bridge between TN-C and platelets. The adhesion of platelets to TN-C triggered their activation, as demonstrated by a shape change and increases in intracellular calcium level.

Conclusion—This study provides evidence that TN-C serves as a novel adhesive matrix for platelets in a context that is relevant to atherothrombosis. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:117-124.)

Key Words: blood flow ■ platelets ■ receptors ■ thrombosis ■ tenascin-C

The central role of platelets in arterial thrombosis renders them attractive targets for antithrombotic drugs. Clopidogrel and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ blockers, 2 antiplatelet agents widely used in clinical practice, have greatly reduced cardiovascular-associated death; however, because they directly target the hemostatic function of platelets, their use is linked to an increased bleeding risk. The development of more selective antithrombotic drugs causing minimal perturbation of hemostasis could pave the way to new and more effective strategies in the treatment of ischemic events. This task is challenged by the fact that the main cellular and molecular events implicated in thrombosis are also those regulating hemostasis. Nevertheless, differences exist between these 2 conditions, such as the rheological microenvironment and the nature of the vascular material exposed to platelets. Thrombosis occurs in advanced atherosclerotic arteries that present abnormal luminal narrowing or stenosis inducing local disturbance of blood flow.¹ In addition, the marked inflammation and active tissue remodeling found in atheroma profoundly modify

the composition of the subendothelium. Atherosclerotic plaques are rich in highly reactive platelet-adhesive materials, such as collagens or lipids, and overexpress extracellular matrix proteins that are essentially absent from the healthy vessel wall. The identification of platelet-adhesive proteins preferentially expressed in diseased vessels could provide novel targets for more selective antithrombotic therapies.

In this context, tenascin-C (TN-C) appears to be an interesting candidate because it is highly expressed in mouse and human advanced atherosclerotic plaques, whereas it is much less present in healthy vessels.²⁻⁴ By using a TN-C-specific antibody, we confirmed a previous observation that the plaques located in the carotid arteries of 30-week-old apolipoprotein E-deficient mice present strong expression of TN-C (supplemental Figure I; all supplemental material available online at <http://atvb.ahajournals.org>).³ In contrast, we detected a much weaker TN-C signal in the carotid arteries of wild-type mice and in the healthy portions of apolipoprotein E-deficient vessels, suggesting that this pro-

Received on: March 18, 2010; final version accepted on: July 6, 2010.

From Inserm U949 (M.S., N.R., C.B., V.W., C.G., F.L., and P.H.M.), Strasbourg, France; the Université de Strasbourg (M.S., N.R., C.B., V.W., C.G., F.L., and P.H.M.), Strasbourg, France; the Etablissement Français du Sang-Alsace (M.S., N.R., C.B., V.W., C.G., F.L., and P.H.M.), Strasbourg, France; Inserm U770 (C.V.D.), Le Kremlin-Bicêtre, France; Université de Paris-Sud (C.V.D.), Le Kremlin-Bicêtre, France; Inserm U682 (G.O.), Strasbourg, France; Université de Strasbourg (G.O.), Strasbourg, France; and the Department of Molecular Biology (G.O.), Centre Hospitalier Régional Universitaire Strasbourg, Strasbourg, France.

Correspondence to Pierre H. Mangin, PhD, Inserm Unité Mixte de Recherche-S949, Etablissement Français du Sang-Alsace 10, rue Spielmann, BP 36, 67065 Strasbourg CEDEX, France. E-mail pierre.mangin@efs-alsace.fr

© 2010 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.206375

tein could be more relevant to pathological thrombosis than to normal hemostasis. The role of TN-C in atherosclerosis is not clearly defined, but this matrix protein could participate in plaque destabilization.² Because TN-C has been localized close to the ruptured areas of advanced plaques, it could be exposed to circulating blood and platelets upon plaque rupture.

TN-C is a large glycoprotein (GP) found in the extracellular matrix of vertebrate organisms that modulates cellular responses.⁵ It is produced at high levels during embryogenesis but is almost absent in adulthood. However, this protein is strongly reexpressed in tissues undergoing remodeling, such as during wound healing or in pathological states, including tumor progression and inflammation.⁵ TN-C has been implicated in the modulation of cell adhesion, migration, growth, and apoptosis. Although often reported as an antiadhesive protein, TN-C has been described to support the adhesion of endothelial cells through integrins, including $\alpha_2\beta_3$ and $\alpha_2\beta_1$.^{5,6}

The aim of our study was to determine whether TN-C supports platelet adhesion and activation and, thus, could represent an interesting new target for a potentially safer antithrombotic strategy. To investigate the role of TN-C in platelet adhesion and activation, we used both static and dynamic assays. Our study identified a novel role of TN-C as an efficient adhesive and activating protein for platelets. The platelet/TN-C interaction was mediated mainly by integrin $\alpha_2\beta_1$ and the GPIb-IX complex and less by integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. GPIb-IX-mediated adhesion occurred only under flow conditions, was indirect, and depended on the binding of von Willebrand factor (VWF) to TN-C. Finally, the adhesion of platelets to TN-C resulted in their activation, as demonstrated by shape change of the cells and increases in intraplatelet Ca^{2+} levels.

Methods

An expanded "Methods" section is available in the supplemental data.

In Vitro Static and Dynamic Adhesion Assays

Glass coverslips were coated with 100- $\mu\text{g}/\text{mL}$ TN-C, fibrinogen (FGN), or VWF for 2 hours at room temperature and blocked with PBS plus 10-mg/mL human serum albumin for 60 minutes. We checked that the protein concentrations used for coating gave maximal platelet adhesion. Washed human platelets in Tyrode's buffer were allowed to adhere to the coated surfaces for 20 or 40 minutes at 37°C, and the adherent cells were processed as previously described.⁷ Flow-based experiments were performed using hirudinized whole blood, 100 U/mL, from human or mouse, as previously described.⁸

Analysis of Cytosolic Ca^{2+} Fluxes

Platelet intracellular Ca^{2+} changes were monitored using a quantitative dual-dye ratiometric assay according to a modification of a previously published method.⁹

In Vitro TN-C Binding Assay and Immunoprecipitation

ELISA 96-well plates were coated with 1- or 5- $\mu\text{g}/\text{mL}$ TN-C overnight at 4°C and blocked with PBS plus 20-mg/mL bovine serum albumin for 1 hour at 37°C. Increasing concentrations of VWF in blocking solution were added and incubated for 2 hours at 37°C. To detect bound VWF, a horseradish peroxidase-conjugated anti-VWF antibody was added (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in blocking solution) for 1 hour at room temperature, and

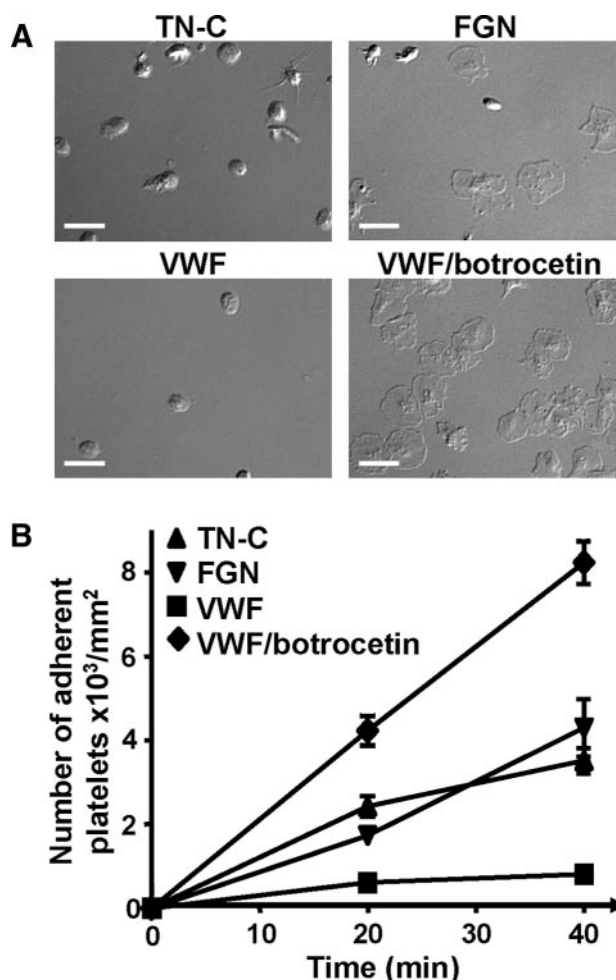


Figure 1. Human platelets adhere to immobilized TN-C under static conditions. Washed human platelets were allowed to adhere to glass coverslips coated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of TN-C, FGN, or VWF (with or without 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of botrocetin). After 20 or 40 minutes, adherent cells were fixed and imaged by differential interference contrast (DIC) microscopy. A, Representative images of adherent platelets after 40 minutes. The bars indicate 8 μm . B, The line graphs represent the total number of adherent platelets at different time points, determined in 8 random fields. Data represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

the plates were then incubated with O-phenylenediamine. After 5 minutes of substrate conversion, the reaction was discontinued with 50 μL of 3-mol/L H_2SO_4 and the plates were read at 490 nm.

Purified TN-C and VWF were coincubated (1 mg of TN-C was coincubated with 6.6 mg of VWF and 1 mg of VWF was coincubated with 3.8 mg of TN-C) in 50 μL of lysis buffer for 2 hours at 4°C. The protein samples were then incubated with 1 μg of an anti-TN-C, anti-VWF, or irrelevant IgG antibody for 1 hour at 4°C, followed by 50 μL of 50% (wt/vol) protein G-Sepharose beads for 1 hour at 4°C. Immunoprecipitation experiments and Western blotting were performed as previously described.¹⁰

Statistical Analyses

All values are reported as mean \pm SEM unless otherwise indicated. Data were compared by 1-tailed paired *t* tests when studying the effect of blocking monoclonal antibodies and by 1-tailed unpaired *t* tests in experiments with mice. Differences were considered significant at $P < 0.05$, and all tests were performed using commercially available software (Prism; GraphPad, La Jolla, Calif).

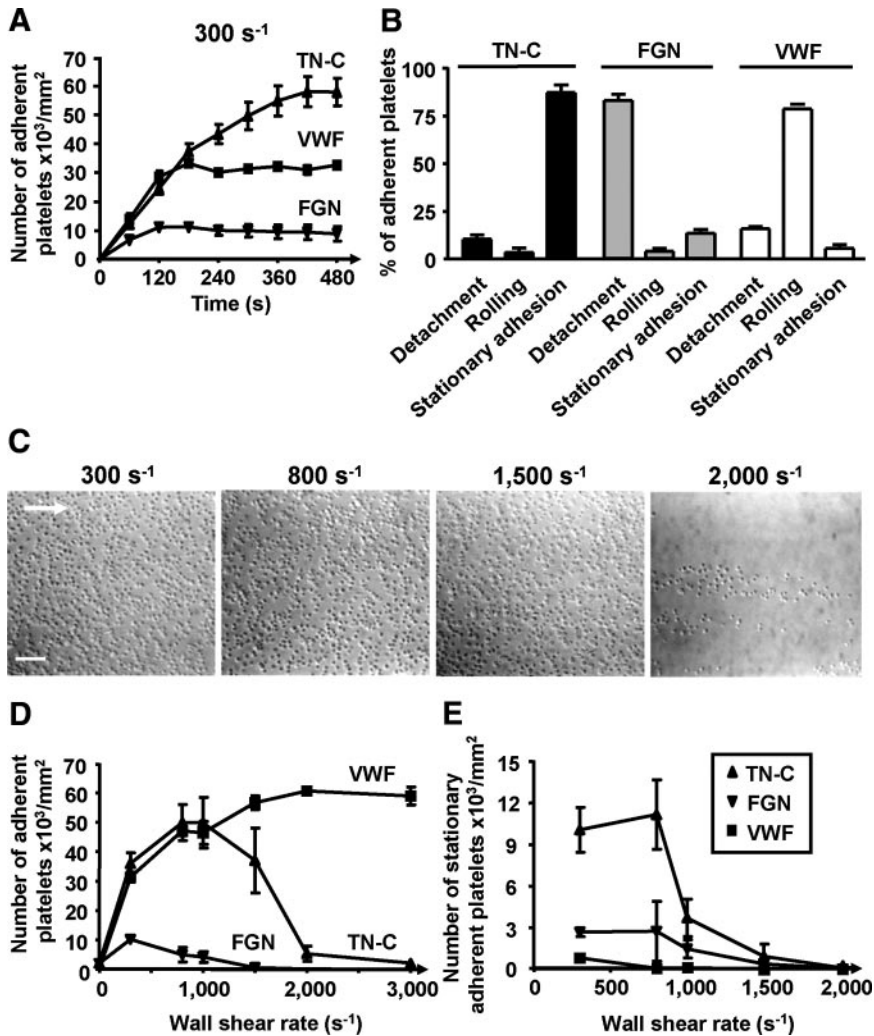


Figure 2. Human platelets adhere to immobilized TN-C under dynamic conditions. Hirudinized human whole blood was perfused at various wall shear rates over TN-C, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; FGN, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$; or VWF, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Platelet adhesion was visualized in real time using differential interference contrast (DIC) microscopy. A, The number of adherent platelets at 300 s^{-1} was determined during an 8-minute period. B, The adhesive behavior of 40 platelets attaching to the surface during 60 and 90 seconds of perfusion was monitored and expressed as the percentage of adherent platelets. C, Representative DIC microscopy images depicting platelets adhering to TN-C after 3 minutes of perfusion. The bar indicates 14 μm . D and E, The total number of adherent platelets (D) and of platelets forming stationary adhesion contacts (E) was counted in 1 random field after 3 minutes of perfusion and expressed as a function of wall shear rate. Data are given as the mean \pm SEM of 4 to 8 independent experiments.

Results

Washed Platelets Adhere to Immobilized TN-C Under Static Conditions

To determine whether TN-C can interact with platelets, we first evaluated the capacity of this matrix protein to support the adhesion of washed human platelets under static conditions. As shown in Figure 1A, numerous platelets adhered to immobilized TN-C. Interestingly, the number of adherent cells after 40 minutes (3513 ± 307 platelets/ mm^2 ; $n=3$) was similar to that observed on FGN (4296 ± 681 platelets/ mm^2 ; $n=3$), which efficiently binds platelets under static conditions (Figure 1B). In contrast, 4.3 times more platelets adhered to TN-C than to VWF (812 ± 123 platelets/ mm^2 ; $n=3$), which is a weak adhesive protein under static conditions¹¹ but supports efficient platelet adhesion under flow¹² or in the presence of mediators such as botrocetin (8228 ± 508 platelets/ mm^2 ; $n=3$) (Figure 1B). These results indicated that platelets adhere to TN-C under static conditions in numbers comparable to those observed on 2 other effective adhesive proteins. Moreover, platelets tended to spread upon attachment to FGN or VWF in the presence of botrocetin, reflecting their activation. In contrast, most of them retained the resting discoid morphology after adhesion to TN-C or VWF without botrocetin (Figure 1A).

Platelets Adhere to Immobilized TN-C Under Dynamic Conditions

Next, we explored the capacity of TN-C to support platelet adhesion under flow by perfusing whole blood through glass microcapillaries at wall shear rates found in vessels prone to atherosclerosis, such as the coronary artery (300 s^{-1}).¹³ Real-time DIC microscopy showed that, after 8 minutes, the number of adherent cells was 1.9 and 6.2 times higher on TN-C ($58\,050 \pm 5253$ platelets/ mm^2 ; $n=8$) than on VWF ($30\,950 \pm 1539$ platelets/ mm^2 ; $n=6$) or FGN (9287 ± 2571 platelets/ mm^2 ; $n=8$), respectively (Figure 2A). These results pointed to a greater adhesiveness of TN-C compared with VWF or FGN under the shear conditions found in large arteries. Concerning the adhesive behavior, the platelets rolled over VWF ($79 \pm 2\%$; $n=4$) and rapidly detached from FGN ($83 \pm 3\%$; $n=4$), whereas most of them attaching to TN-C remained stationary adherent ($87 \pm 4\%$; $n=4$) (Figure 2B). This different behavior probably explains the enhanced platelet accumulation observed on TN-C compared with VWF or FGN (Figure 2A).

Adhesion to TN-C as a function of wall shear rate exhibited a bell-shaped curve, with maximal adhesion at 1000 s^{-1} ($49\,790 \pm 8629$ platelets/ mm^2 ; $n=7$) (Figure 2C and D). Adhesion to VWF similarly increased up to 1000–1500 s^{-1}

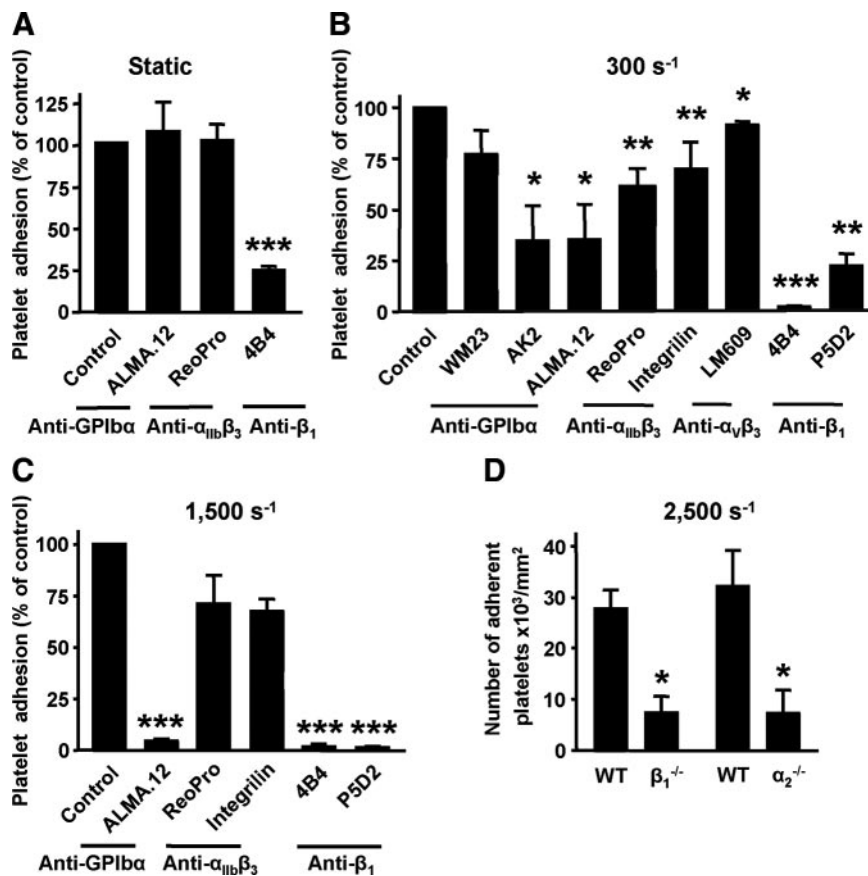


Figure 3. Role of GPIb-IX and β_3 and β_1 integrins in platelet adhesion to TN-C. Washed human platelets pretreated with prostaglandin E₁ (A) or human whole blood (B and C) were incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of irrelevant mouse IgG (control), 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of an integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ antagonist (ReoPro or Integrilin), or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of a blocking monoclonal antibody, before being allowed to adhere to TN-C (A) or perfused over TN-C at 300 s^{-1} (B) or 1500 s^{-1} (C). After 20 minutes, the remaining adherent cells were counted as described in Figure 1 (A). Adherent platelets were counted after 7 (B) or 3 (C) minutes of perfusion. Adhesion was expressed as a percentage of the adhesion of control platelets set to 100% (A-C). D, Hirudinized whole blood from wild-type, $\beta_1^{-/-}$, or $\alpha_2^{-/-}$ mice was perfused over TN-C at 2500 s^{-1} , as done in B and C, and adherent platelets were counted after 3 minutes. Data are given as the mean \pm SEM of 3 to 5 separate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

(56 600 \pm 2307 platelets/ mm^2 ; $n=3$) but remained at a plateau level. As previously described, the adhesion of platelets to FGN was inefficient at shear rates greater than 300 s^{-1} .¹² Remarkably, TN-C was more effective than VWF or FGN in the recruitment of stationary adherent platelets, at least up to 1000 s^{-1} (Figure 2E). These findings demonstrated that TN-C efficiently supports platelet adhesion across a wide range of shear rates.

Platelet Adhesion to TN-C Is Primarily Mediated by Integrin $\alpha_2\beta_1$

Blocking the VWF binding site of GPIb-IX or the FGN binding domain of $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (107 \pm 17% and 101 \pm 10% of control, respectively; $n=3$) did not prevent platelet adhesion to TN-C in the static adhesion assay, whereas a pan-blocking anti- β_1 antibody significantly reduced it (23 \pm 2% of control; $n=3$; $P < 0.001$) (Figure 3A). The key role of the β_1 integrin was also demonstrated in the dynamic adhesion assay, in which 2 anti- β_1 antibodies (4B4 and P5D2) profoundly inhibited platelet adhesion to TN-C at both 300 s^{-1} (by 99.3 \pm 0.3% and 79.0 \pm 6.0%, respectively) and 1500 s^{-1} (by 98.4 \pm 1.2% and 99.2 \pm 0.4%, respectively) (Figure 3B and C).

These results were confirmed in β_1 -deficient mice presenting a 73 \pm 11% ($n=5$, $P < 0.01$) reduction in the number of adherent platelets to TN-C at 2500 s^{-1} (Figure 3D). To identify the integrin subtype involved, adhesion was next evaluated in a mouse strain specifically lacking integrin $\alpha_2\beta_1$. In $\alpha_2\beta_1$ -deficient platelets, the degree of inhibition was similar to that in β_1 deficiency (77 \pm 14% reduction relative to

wild type; $n=4$; $P < 0.05$) (Figure 3D), indicating that integrin $\alpha_2\beta_1$ is likely to be the main β_1 integrin involved in platelet/TN-C interaction.

Blockade of $\alpha_v\beta_3$, which has been proposed as a TN-C receptor on endothelial cells,⁶ only slightly reduced platelet adhesion under flow (by 9 \pm 2%; $n=3$; $P < 0.05$), suggesting a minor role for this integrin (Figure 3B). In contrast, ALMA.12 and AK2, 2 monoclonal antibodies directed against the 45-kDa N-terminal domain of GPIb α , markedly inhibited platelet adhesion to TN-C at 300 s^{-1} (by 64 \pm 10% and 66 \pm 17%, respectively; $n=3$; $P < 0.05$), whereas WM23 against the macroglycopeptide region had no significant effect (77 \pm 12% of control; $n=3$; $P=0.09$) (Figure 3B). ALMA.12 reduced platelet adhesion by 95.5 \pm 0.9% at 1500 s^{-1} , indicating that the importance of GPIb α in TN-C adhesion increases with wall shear rate (Figure 3C). In comparison, Integrilin and ReoPro, 2 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ blockers in clinical use, diminished platelet adhesion only under low shear conditions (300 s^{-1}), with 39 \pm 10% and 42 \pm 7% inhibition, respectively ($n=4$, $P < 0.01$) (Figure 3B and C). These findings indicated that the GPIb-IX complex and, to a lesser extent, integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ participate in platelet adhesion to TN-C under dynamic, but not static, conditions.

GPIb-Dependent Adhesion of Platelets to TN-C Depends on VWF

The fact that monoclonal antibodies inhibiting VWF binding to GPIb α diminished platelet adhesion to TN-C suggested that VWF could serve as an intermediate ligand. This hypoth-

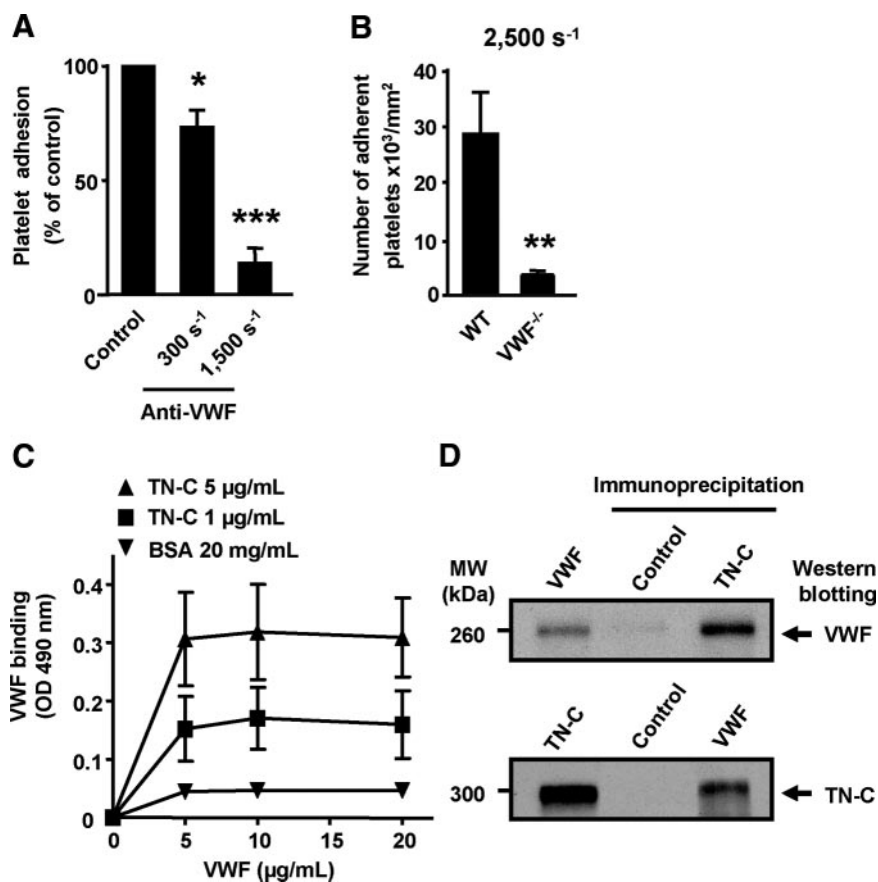


Figure 4. VWF mediates platelet adhesion under flow by directly interacting with TN-C. A, Human whole blood was incubated with 20 µg/mL of a control IgG (control) or blocking monoclonal antibody (mAb) 701 against the VWF A1 domain (anti-VWF) and perfused over TN-C at 300 s⁻¹ or 1500 s⁻¹. The number of adherent platelets was counted after 7 or 3 minutes of perfusion, respectively, and expressed as a percentage of the control set to 100%. B, Whole blood from wild-type or VWF^{-/-} mice was perfused over TN-C at 2500 s⁻¹, as done in A, and adherent platelets were counted after 3 minutes. Data are given as the mean ± SEM from 3 or 4 separate experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001. C, Various concentrations of VWF were added to TN-C or 20-mg/mL BSA-coated micro-wells for 2 hours. Bound VWF was detected with a polyclonal horseradish peroxidase-conjugated anti-VWF antibody, 0.4 µg/mL. Curves show the optical density (OD) at 490 nm, and values are the mean ± SEM from 3 separate experiments. D, Top: TN-C, 1 µg, was incubated with VWF, 6.6 µg, in solution for 2 hours and immunoprecipitation was performed with a specific mAb against TN-C or an irrelevant IgG (control) before migration by SDS-PAGE. VWF was identified by Western blotting using a polyclonal anti-VWF antibody. Purified VWF was used as a positive control. Bottom: VWF, 1 µg, was incubated with TN-C, 3.8 µg, in solution for 2 hours and precipitated with a specific antibody against VWF. The coprecipitation of TN-C was assessed by SDS-PAGE and Western blotting using a monoclonal anti-TN-C antibody. Purified TN-C was used as a positive control. Data are representative of 4 separate experiments.

tion of TN-C was assessed by SDS-PAGE and Western blotting using a monoclonal anti-TN-C antibody. Purified TN-C was used as a positive control. Data are representative of 4 separate experiments.

esis was further supported by the ability of 701, an anti-VWF A1 domain monoclonal antibody blocking GPIIb binding, to reduce platelet adhesion to TN-C by 27 ± 7% at 300 s⁻¹ (n = 3, *P* < 0.05) and by 87 ± 7% at 1500 s⁻¹ (n = 5, *P* < 0.001) (Figure 4A). Final confirmation of the implication of VWF derived from experiments in VWF-deficient mice, which exhibited decreased adhesion of platelets to TN-C at 2500 s⁻¹ (by 88 ± 1%; n = 4; *P* < 0.01) (Figure 4B). Overall, these data showed that VWF participates in platelet adhesion to TN-C and that its role intensifies with increasing shear rate.

VWF Binds to Purified TN-C

To further investigate the capacity of VWF to mediate GPIIb-dependent adhesion to TN-C, we determined in an ELISA whether these molecules directly interact with each other. As shown in Figure 4C, soluble VWF bound to immobilized TN-C, but not to BSA, reaching saturation at 5 µg/mL. The interaction was also observed when both molecules were in solution because immunoprecipitated TN-C coprecipitated with VWF and vice versa (Figure 4D). These results demonstrated that VWF interacts with TN-C, thereby supporting a model in which VWF acts as a bridge between TN-C and platelets.

Adhesive Properties of TN-C and VWF Synergize in Platelet Adhesion Under Flow

Because TN-C and VWF were both described to be strongly expressed in atherosclerotic plaques and to more precisely define

the functional link between these proteins, we explored the capacity of a combined TN-C-VWF matrix to support platelet adhesion. By using blood from VWF-deficient mice to prevent the participation of plasmatic VWF, we observed a marked enhancement of platelet adhesion to the mixed proteins (17 100 ± 3051 platelets/mm²; n = 3; after 2 minutes) at 3000 s⁻¹, which was 2.9 and 2.6 times higher than on TN-C (5833 ± 1073 platelets/mm²; n = 3; after 2 minutes) or VWF (6533 ± 1686 platelets/mm²; n = 3; after 2 minutes) alone, respectively (Figure 5). These results demonstrated that TN-C synergizes with VWF to support platelet adhesion under flow.

Activation of Platelets upon Adhesion to TN-C

Platelet shape change represents 1 of the first measurable signs of activation and results in the transformation of a discoid and smooth resting cell into a spherical form, extending filopodia and ultimately spreading to a "fried egg"-like morphology. Whereas the platelets adhering to TN-C under static conditions tended to remain discoid (Figure 1A), most of them became spherical and extended filopodia (82 ± 4%, n = 3) at 300 s⁻¹, similar to what occurred on VWF (77 ± 2%, n = 3) or FGN (75 ± 4%, n = 3) (Figure 6A and B).

To explore the capacity of TN-C to induce intracellular signaling, we measured cytosolic Ca²⁺ changes upon adhesion of platelets under flow, using a quantitative dual-dye ratiometric Ca²⁺ assay. As shown in Figure 6C, whereas individual resting platelets displayed low Ca²⁺ concentra-

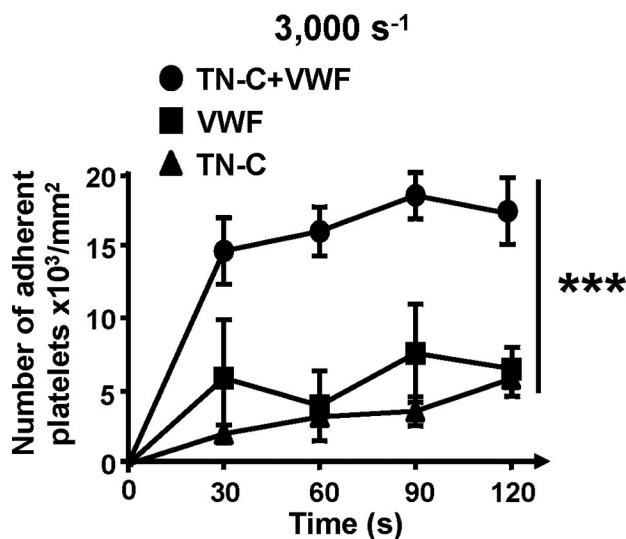


Figure 5. TN-C plus VWF synergize to promote platelet adhesion. Hirudinized whole blood from VWF^{-/-} mice was perfused over TN-C, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; VWF, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; or a combined TN-C-VWF matrix (100 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) at 3000 s^{-1} , and the number of adherent platelets was determined over a 2-minute period. Data are the mean \pm SEM from 3 separate experiments. *** $P < 0.001$.

tions (< 50 nmol/L), most of those adhering to TN-C exhibited pulsatile and high-frequency Ca^{2+} spikes (Figure 6D and E), ranging between 50 and 1650 nmol/L (maximal increase, 363 ± 55 nmol/L; $n = 50$). Platelets adhering to FGN displayed similar variable Ca^{2+} responses (maximal increase, 383 ± 61 nmol/L; $n = 40$); that were less important on VWF (maximal increase, 167 ± 31 nmol/L; $n = 40$). The increased fluorescence was the result of enhanced cytosolic Ca^{2+} since pretreating platelets with the Ca^{2+} chelator DM-BAPTA-AM reduced the mean signal by $96 \pm 1\%$ ($n = 30$) (Figure 6C). Altogether, these results showed that the adhesion of platelets to TN-C under flow conditions leads to their activation.

Discussion

The studies reported herein identify a novel role of TN-C in platelet physiology and suggest that this extracellular matrix protein could play an important part in atherothrombosis. We provide evidence that TN-C supports efficient platelet adhesion under static and dynamic conditions of up to 1500 s^{-1} . Contrary to VWF and FGN, TN-C promoted the stationary adhesion of platelets under flow. We showed that the interaction of platelets with TN-C is a complex process involving at least 3 receptors (ie, integrin $\alpha_2\beta_1$, integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, and the GPIb-IX complex). Added complexity arises from the fact that platelet attachment to TN-C is in part indirect and occurs through VWF binding. Once attached to TN-C, the platelets become activated, as attested by their shape change and increased intracellular Ca^{2+} levels.

The data from static adhesion experiments indicated that a platelet surface β_1 integrin bound to TN-C. This is in agreement with previous reports^{5,6} indicating that other cell types, such as endothelial and tumoral cells, interact with TN-C through β_1 integrins, in particular $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, and $\alpha_9\beta_1$. Platelets contain 3 β_1 integrins ($\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_6\beta_1$) that bind to collagen, fibronectin, and laminin, respectively.

Integrins $\alpha_8\beta_1$ and $\alpha_9\beta_1$ have not been described in platelets; this was confirmed in Western blotting and RT-PCR assays (data not shown), thereby pointing to $\alpha_2\beta_1$ as the likely candidate for platelet/TN-C interaction. Experiments with genetically modified mice confirmed this hypothesis, providing the first report that another matrix protein than collagen interacts with platelet $\alpha_2\beta_1$. Although we cannot formally exclude a role of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_6\beta_1$, the identical degree of inhibition of platelet adhesion to TN-C in α_2 - and β_1 -deficient mice suggests that $\alpha_2\beta_1$ is the only β_1 integrin involved. We did not formally demonstrate a direct interaction between $\alpha_2\beta_1$ and TN-C. However, this was strongly suggested because isolated platelets pretreated with prostaglandin E₁ to prevent release of adhesive proteins stored in α -granules still efficiently adhered to purified TN-C.

The blockade of $\alpha_2\beta_1$ at high shear resulted in a marked reduction in platelet adhesion, with many fewer platelets attaching to TN-C. This result was surprising because integrins are not usually described as contributing to platelet recruitment under high shear conditions as the result of their slow association rate.¹² Moreover, the few platelets adhering under $\alpha_2\beta_1$ blockade no longer remained stationary but rapidly detached, suggesting that $\alpha_2\beta_1$ also participates in supporting stationary adhesion to TN-C. This is in agreement with the well-recognized role of integrins in stable bond formation as the result of their slow dissociation rates.¹² Two different antibodies blocking collagen binding to $\alpha_2\beta_1$ did not prevent adhesion to TN-C (supplemental Figure II), indicating distinct binding sites for TN-C and collagen.

Because antibodies preventing VWF binding to GPIIb α inhibited platelet adhesion to TN-C, GPIIb α participation was presumably indirect, requiring the prior binding of VWF to TN-C. An analogous mechanism has also been described for platelet adhesion to collagen, which is, in part, mediated through VWF.¹⁴ One difference was that, although human platelets adhered to VWF even at greater than 1500 s^{-1} , this was no longer the case for TN-C. This could be the result of a suboptimal amount of TNC-bound plasmatic VWF. Interestingly, normal mouse platelets still efficiently adhered to TN-C at shear rates of up to 2500 s^{-1} . The ability of mouse platelets to adhere at higher shear rates when compared with human platelets has also been described on a collagen matrix.^{14,15} This difference could arise from the smaller size of mouse platelets, which reduces the drag forces applied to them, or from different affinities of the receptor-ligand interactions between the 2 species.

Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ is also involved in platelet adhesion to TN-C. This interaction could be indirect through VWF, a known $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ligand, or direct because TN-C contains a region presenting strong homology with the γ chain of FGN¹⁶ and an RGD sequence in its third fibronectin type III domain.¹⁷ Unlike GPIIb α , the importance of $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ decreased with wall shear rate, which could be because of a low resistance to tensile stress that does not allow $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ to withstand high shear. $\alpha_{\text{V}}\beta_3$, the second platelet β_3 integrin, mediates endothelial and tumoral cell adhesion to TN-C^{5,6} but is not critical in platelet/TN-C interaction. This could be explained by its low expression (250

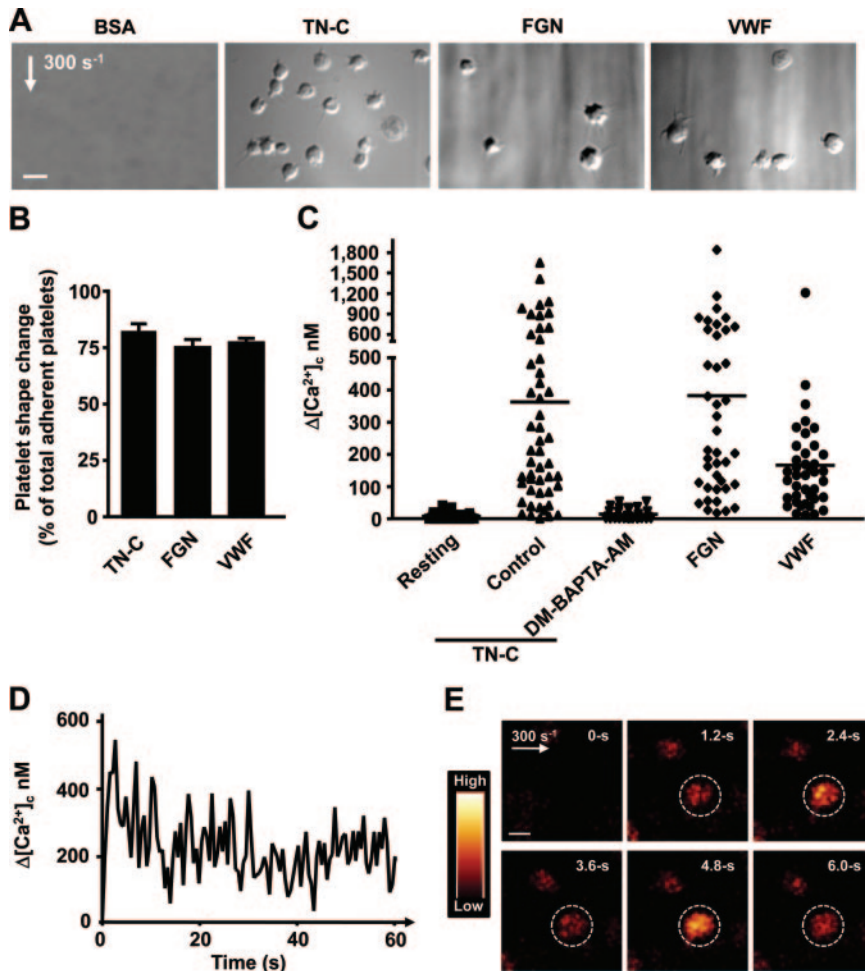


Figure 6. TN-C induces platelet shape change and increases in intracellular calcium. A and B, Human whole blood was perfused at 300 s⁻¹ over TN-C, FGN, or VWF. The morphology of adherent platelets was examined by differential interference contrast (DIC) microscopy (A), and the percentage of spherical platelets extending filopodia was quantified for each matrix (B). The bar indicates 6 μm. Data in B represent the mean ± SEM in 1 random field in 3 independent experiments. C through E, Washed human platelets loaded with Ca²⁺ and morphological dyes were reconstituted with 50% (vol/vol) autologous packed red blood cells at a final concentration of 250 × 10⁶ platelets per milliliter in the presence of either vehicle (dimethyl sulfoxide [control]) or 50-μmol/L DM-BAPTA-AM and perfused over TN-C, FGN, or VWF at 300 s⁻¹, as in A and B. The changes in fluorescence in individual adherent platelets were monitored for 8 minutes by confocal microscopy, and Ca²⁺ concentrations were determined. In C, the dot plot distribution of the relative maximal increase in cytosolic Ca²⁺ in individual platelets adhering to TN-C, FGN, or VWF is shown. Resting refers to washed platelets allowed to adhere to nonreactive 10-mg/mL BSA-coated coverslips. The thick solid lines represent the mean Ca²⁺ increase, and results are from 4 to 5 independent experiments. D, Typical Ca²⁺ profile of 1 representative platelet adhering to TN-C. E, Single-channel Oregon green fluorescence images depicting Ca²⁺ oscillations of a representative platelet adhering to TN-C. The bar indicates 2 μm.

receptors per platelet) compared with integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (80 000 receptors per platelet).

Platelets adhering to TN-C became activated as indicated by their shape change and intracellular Ca²⁺ oscillations, suggesting that the role of TN-C goes beyond its ability to recruit platelets. Because the GPIIb/VWF interaction triggers filopodia extension and transient Ca²⁺ events,⁸ it could be implicated in the TN-C response. In addition, outside-in $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ signaling also induce morphological changes and elevated Ca²⁺ oscillations in platelets.^{8,18} Given that Ca²⁺ was measured in the absence of plasma VWF, it points to a likely role of $\alpha_2\beta_1$ in our assay conditions. This would agree with the similar Ca²⁺ oscillations observed herein on TN-C and in platelets adhering to the $\alpha_2\beta_1$ -specific GFOGER peptide.¹⁸ Future studies are required to determine the contribution of the different receptors and of the additional amplification by soluble agonists, such as ADP or thromboxane A₂, which are released by activated platelets.

Platelets efficiently adhered to TN-C across a wide range of wall shear rates, with maximal adhesion at approximately 1000 s⁻¹ to 1500 s⁻¹. So far, VWF¹², collagen¹⁴ and thrombospondin-1 were the only adhesive proteins known to support human platelet adhesion under high shear; the other matrix proteins, including FGN and fibronectin, do not display this property. The shear conditions under which platelets interact with TN-C are of pathological relevance

because 1000 s⁻¹ represents the mean peak wall shear rate found in diseased carotid arteries presenting 78% stenosis.¹⁹ Given that 60% stenosis is clinically rated as significant and 70% is rated as severe,²⁰ the TN-C exposed upon plaque erosion or rupture could participate in platelet recruitment. Moreover, even in the case of very severe stenosis (>90%), local regions of low shear (<1000 s⁻¹) extend into the downstream expansion zone,¹⁹ where TN-C could also participate in the first step of thrombus growth.

Pharmacologically, blocking platelet/TN-C interaction could inhibit the initial stage of platelet recruitment and activation on a ruptured plaque and thereby potentially prevent excessive thrombosis. Because TN-C is almost absent in healthy vessels,²⁻⁴ agents blocking platelet/TN-C interaction might be expected to be highly selective for thrombosis and would not affect normal hemostasis. This possibility is supported by the fact that TN-C-deficient mice present a normal tail bleeding time (M.S., unpublished data, 2010). From a clinical point of view, an agent that prevents recruitment of platelets to a site of plaque rupture without affecting hemostasis would, in theory, provide a wide therapeutic window with a minor risk of bleeding.

Based on the present findings, the following working model is proposed. Upon erosion or rupture of an atherosclerotic plaque, TN-C present at high levels will become exposed to circulating blood, bind plasmatic VWF, and

capture circulating platelets through interaction with the GPIIb-IX complex. Exposed TN-C will also recruit platelets through direct interaction with integrin $\alpha_2\beta_1$. Stable adhesion will be established through integrins, primarily $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$, that bind to VWF and/or TN-C. Finally, engagement of these different receptors will induce platelet activation, resulting in shape change and increase in intracellular Ca^{2+} levels.

The full implication of TN-C in thrombosis and its importance with respect to other pathways remain to be clearly delineated. The observation that platelets do not form aggregates on TN-C suggests that it might be much less thrombogenic than highly reactive plaque components, such as collagen, lipid derivatives, or tissue factor. Rather, we postulate that TN-C could provide additional contacts increasing platelet–vessel wall interaction and platelet activation upon plaque rupture. In particular, the fact that platelet recruitment under flow was greatly enhanced on a mixed TN-C–VWF substrate compared with individual proteins strongly suggests that TN-C could act in combination with other platelet-reactive components to promote full integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation and efficient thrombus growth.

In conclusion, this previously unrecognized role of TN-C in platelet adhesion and activation could be of great significance in the context of the shear conditions encountered in arterial thrombosis. This study provides an interesting candidate to put into practice the concept of targeting platelet-reactive components preferentially expressed in atherosclerotic plaques to develop a safer antithrombotic treatment.

Acknowledgments

We thank Monique Freund, PhD, for animal care, Isabelle Gasser, MS, and Stéphanie Magnenat, BS, for technical assistance, and Juliette Mulvihill, PhD, for editorial help.

Sources of Funding

Dr Orend was supported by a grant from Institut National du Cancer and was the recipient of a “contrat d’interface” between Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Hautepierre Hospital.

Disclosures

None.

References

- Nesbitt WS, Mangin P, Salem HH, Jackson SP. The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis. *J Mol Med*. 2006;84:989–995.
- Wallner K, Li C, Shah PK, Fishbein MC, Forrester JS, Kaul S, Sharifi BG. Tenascin-C is expressed in macrophage-rich human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation*. 1999;99:1284–1289.
- von Lukowicz T, Silacci M, Wyss MT, Trachsel E, Lohmann C, Buck A, Luscher TF, Neri D, Matter CM. Human antibody against C domain of

tenascin-C visualizes murine atherosclerotic plaques ex vivo. *J Nucl Med*. 2007;48:582–587.

- Pedretti M, Rancic Z, Soltermann A, Herzog BA, Schliemann C, Lachat M, Neri D, Kaufmann PA. Comparative immunohistochemical staining of atherosclerotic plaques using F16, F8 and L19: three clinical-grade fully human antibodies. *Atherosclerosis*. 2009;208:382–389.
- Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal*. 2009;3:287–310.
- Sriramarao P, Mandler M, Bourdon MA. Endothelial cell attachment and spreading on human tenascin is mediated by alpha 2 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Cell Sci*. 1993;105(pt 4):1001–1012.
- Mangin P, Yuan Y, Goncalves I, Eckly A, Freund M, Cazenave JP, Gachet C, Jackson SP, Lanza F. Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization: involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA. *J Biol Chem*. 2003;278:32880–32891.
- Nesbitt WS, Kulkarni S, Giuliano S, Goncalves I, Doppeide SM, Yap CL, Sabatini BL, Svoboda K. Imaging calcium concentration dynamics in small neuronal compartments. *Sci STKE*. 2004;2004:15.
- Mangin P, David T, Lavaud V, Cranmer SL, Pikovski I, Jackson SP, Berndt MC, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F. Identification of a novel 14-3-3zeta binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ibalpha. *Blood*. 2004;104:420–427.
- Roth GJ. Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. *Blood*. 1991;77:5–19.
- Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996;84:289–297.
- Goldsmith HL, Turitto VT. Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report–Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thromb Haemost. *Thromb Haemost*. 1986;55:415–435.
- Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998;94:657–666.
- Konstantinides S, Ware J, Marchese P, Almus-Jacobs F, Loskutoff DJ, Ruggeri ZM. Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Ibalpha and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2014–2021.
- Yokoyama K, Erickson HP, Ikeda Y, Takada Y. Identification of amino acid sequences in fibrinogen gamma-chain and tenascin C C-terminal domains critical for binding to integrin alpha v beta 3. *J Biol Chem*. 2000;275:16891–16898.
- Leahy DJ, Hendrickson WA, Aukhil I, Erickson HP. Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science*. 1992;258:987–991.
- Inoue O, Suzuki-Inoue K, Dean WL, Frampton J, Watson SP. Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2. *J Cell Biol*. 2003;160:769–780.
- Gay M, Zhang LT. Numerical studies of blood flow in healthy, stenosed, and stented carotid arteries. *Int J Numer Meth Fl*. 2008;61:453–472.
- Biller J, Feinberg WM, Castaldo JE, Whittemore AD, Harbaugh RE, Dempsey RJ, Caplan LR, Kresowik TF, Matchar DB, Toole JF, Easton JD, Adams HP Jr, Brass LM, Hobson RW II, Brott TG, Sternau L. Guidelines for carotid endarterectomy: a statement for healthcare professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association. *Circulation*. 1998;97:501–509.

SUPPLEMENT MATERIAL

Detailed Methods

Materials

Prostaglandin E₁ (PGE₁), prostaglandin I₂ (PGI₂), bovine serum albumin (BSA), fatty acid-free human serum albumin (HSA), TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate)-phalloidin and human FGN were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and protein G-Sepharose from GE Healthcare (Little Chalfont, United Kingdom). 1-paraformaldehyde (PFA) was from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA) and O-phenylenediamine from Thermo Scientific (Waltham, MA). Human VWF was isolated from factor VIII concentrates (EFS-Alsace, Strasbourg, France) according to the method of Toti *et al.*¹ Botrocetin was purified from snake venom (Latoxan, Valence, France) as described previously.² Experiments were performed with different batches of human TN-C from the U251 glioma cell line (Millipore, Billerica, MA). Western blotting, silver and Coomassie blue stainings and two different techniques of mass spectrometry (MALDI-MS and LC-MS/MS) were used to ensure that very pure TN-C was used. This TN-C was structurally related to that found in atherosclerotic vessels.^{3, 4} In addition, similar results were obtained with a different source of TN-C (AbD Serotec, Raleigh, NC; data not shown). Apyrase was purified from potatoes as previously described.⁵ DM-BAPTA-AM (5,5'-dimethyl-1,2-bis(O-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid-tetra(acetoxymethyl) ester) and the indicators Oregon Green 488 BAPTA-AM-1 and Calcein red-orange-AM were from Molecular Probes (Eugene, OR). Acid citrate dextrose (ACD) solution was obtained from Bioluz (St-Jean-de-Luz, France), hirudin from Transgene (Illkirch-Graffenstaden, France) and heparin from Sanofi-Aventis (Paris, France). The integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonist eptifibatide (Integrilin[®]) was purchased from Schering-Plough (Kenilworth, NJ). The monoclonal antibody (mAb) DB7 against TN-C was from Millipore, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) from Jackson Lab (Bar Harbor, ME) and the HRP-conjugated anti-VWF

antibody from Dako (Glostrup, Denmark). Mouse monoclonal blocking antibodies were as follows: anti-human integrin β_1 , 4B4 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) and P5D2 (Abcam, Cambridge, United Kingdom); anti-human GPIIb/IIIa, AK2 (Abcam) and ALMA.12 (produced in our laboratory); anti-human integrin $\alpha_V\beta_3$, LM609 (Millipore); anti-human integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, chimeric mAb 7E3 Fab fragments abciximab (ReoPro[®]) (E. Lilly, Indianapolis, IN); anti-human VWF A1 domain, clone 701 kindly provided by Dr. C. Denis. Other antibodies used were: WM23, against the macroglycopeptide region of GPIIb/IIIa (Pr. S. Jackson, Monash University, Melbourne, Australia) and MOPC-21, a mouse IgG₁ κ isotype control (Biolegend, San Diego, CA).

Mice

Mice were backcrossed onto the C57BL/6 background for a minimum of 6 or 12 generations and were maintained in the animal facilities of the Etablissement Français du sang-Alsace. VWF-deficient (VWF^{-/-}) mice were from Dr. C. Denis,⁶ β_1 -null ($\beta_1^{-/-}$) mice from Dr. R. Fässler (Max Planck Institute, Martinsried, Germany)⁷ and α_2 -null ($\alpha_2^{-/-}$) mice from Dr. B. Eckes (University of Cologne, Cologne, Germany).⁸ A WT littermate was purchased from Charles River (Wilmington, MA).

Blood Collection and Preparation of Washed Platelets and Red Blood Cells

Blood was drawn from the abdominal aorta in 8-week-old mice (about 5 animals for each condition) anesthetized intraperitoneally with a mixture of xylazine (20 mg per kg body weight, Rompun[®], Bayer, Leverkusen, Germany) and ketamine (100 mg per kg body weight, Imalgene 1,000[®], Merial, Lyon, France). All experiments conformed to the French legislation for animal experimentation and followed the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Human blood was collected from healthy volunteers who had not taken any antiplatelet medication in the preceding 2 weeks. Platelets were washed using ACD-anticoagulated whole blood as previously described.⁵ Briefly, the platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugating blood at

250 x g for 16 min. Following a 10 min rest period, the PRP was centrifuged at 2,200 x g for 16 min. The platelet poor plasma was then removed by aspiration and the pelleted platelets were gently resuspended in an equal volume of isotonic Tyrode's Buffer (138 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 12 mmol/L NaHCO₃, 0.4 mmol/L NaH₂PO₄, 1 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L Hepes, 3.5 mg/mL HSA, 5.5 mmol/L glucose, pH 7.3) supplemented with 10 U/mL heparin and 0.5 μmol/L PGI₂. Following another 10 min rest period, 0.5 μmol/L PGI₂ was added to the platelets before centrifugation at 1,900 x g for 8 min. This step was performed twice and platelets were finally resuspended to a final concentration of 3 x 10⁸ platelets/mL in Tyrode's Buffer supplemented with 0.02 U/mL apyrase. Washed platelets were kept at 37°C for 30 min prior to experimentation in order for apyrase activity to decay and studies were achieved within 6 hours after blood collection. To prepare reconstituted blood, red blood cells (RBCs) were obtained after centrifugating whole blood at 250 x g for 16 min. The PRP and leukocyte layers were removed and the RBCs were washed twice in Tyrode's buffer and treated with 0.02 U/mL apyrase, prior to reconstitution with autologous washed platelets (50% (v/v)) at a final concentration of 250 x 10⁶ platelets/mL.

Static Adhesion Assay

Glass coverslips were coated with 100 μg/mL TN-C, FGN or VWF for 2 hours at RT and blocked with PBS-10 mg/mL (1%) HSA for 60 min. We checked that the protein concentrations used for coating gave maximal platelet adhesion. Human platelets (4.5 x 10⁶/coverslip) in Tyrode's buffer were allowed to adhere to the coated surfaces at 37°C. After 20 or 40 min, non-adherent platelets were washed away and adherent cells were fixed with PBS-40 mg/mL (4%) PFA and imaged by differential interference contrast (DIC) microscopy.⁹ In the case of VWF surfaces, the modulator botrocetin (2 μg/mL) was added since this matrix supports weak adhesion in the absence of fluid shear.¹⁰ Where indicated, the platelets were pretreated for 20 min with PGE₁ (10 μmol/L) to keep them in a resting state and prevent granule secretion.

***In Vitro* Flow-Based Adhesion Assay**

Rectangular glass microcapillaries (VitroCom, Mountain Lakes, NJ) were coated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TN-C, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FGN or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VWF overnight at 4°C and blocked with PBS-10 mg/mL (1%) BSA for 30 min at RT. Concerning the flow experiments in which a double matrix was used, we have preliminarily determined the lowest concentrations of VWF (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and TN-C (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) providing maximal platelet adhesion. Hirudinated (100 U/mL) whole blood or reconstituted blood was perfused through the coated capillaries with a syringe pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA) at 37°C and at various flow rates as previously described.¹¹ Platelet adhesion was observed in real time under an inverted Leica DMI 4000 B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using a 63x, 1.4 numerical aperture oil objective and a DIC technique. Images were acquired with a Photometrics charge-coupled device (CCD) camera (CoolSNAP HQ Monochrome, Photometrics, Tucson, AZ) and analyzed off-line using Metamorph software version 7.6 (Molecular Devices, Downingtown, PA). Platelet adhesive behavior was analyzed frame by frame (15 frames/s) and classified as (i) rolling when platelets constantly moved over the surface of the matrix, (ii) stationary adhesion when they did not move more than one half of a single cell diameter over a 10 s period, and (iii) detaching when detachment occurred within 2 s following the initial contact.

Morphologic Analyses

Hirudinated (100 U/mL) whole blood was perfused through glass microcapillaries coated with TN-C (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), FGN (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or VWF (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 3 min at 300 s^{-1} , followed by washing with PBS at 300 s^{-1} for 2 min. Adherent platelets were observed by DIC microscopy (Leica DMI 4000 B, 63x/1.4 oil objective). Change in cell shape was defined as the transformation of a resting discoid platelet into an activated spherical cell with filopodial projections more than 0.2 μm in length and a flattened “fried egg”-like morphology.

Analysis of Cytosolic Ca²⁺ Fluxes

Platelet intracellular Ca²⁺ changes were monitored according to a modification of a previously published method.¹² Briefly, human platelets resuspended at 500 x 10⁶/mL after the first washing step were simultaneously loaded with the membrane-permeating non ratiometric Ca²⁺ indicator dye Oregon Green 488 BAPTA-AM-1 (4 μmol/L) and the morphological dye Calcein red-orange-AM (2.0 μmol/L) for 30 min at 37°C. The dye-loaded platelets were washed twice and finally resuspended in Tyrode's buffer containing apyrase (0.02 U/mL). These platelets were incubated with either vehicle (1:1,000 DMSO) or DM-BAPTA-AM (50 μmol/L) for 10 min and reconstituted with 50% (v/v) autologous packed RBCs at 250 x 10⁶ platelets/mL, prior to perfusion over TN-C (100 μg/mL), FGN (300 μg/mL) or VWF (100 μg/mL) at 300 s⁻¹. The increases in platelet and Ca²⁺-dependent fluorescence intensity upon adhesion of the cells were measured in the ranges 572-700 nm and 495-535 nm, respectively, by confocal laser scanning microscopy (Leica TCS SP5, Leica Microsystems) (1.85 frames/s for 8 min). The mean fluorescence ratio R_{max} was determined from the signal of washed platelets preincubated with A23187 (5 mmol/L) + Ca²⁺ (10 mmol/L) and allowed to adhere to glass coverslips (50 platelets per experiment), while R_{min} was calculated from that of platelets preincubated with DM-BAPTA-AM (70 μmol/L) + EGTA (ethyleneglycoltetraacetic acid) (2 mmol/L) and allowed to adhere to 10 mg/mL (1%) BSA-coated coverslips (50 platelets per experiment). The ratio of signal intensity between the two dye channels was converted to intracellular Ca²⁺ concentrations as described previously (Leica TCS SP5 LASAF software).¹² The estimated Ca²⁺ concentration is indicated relative to the zero point set by DM-BAPTA-AM and EGTA Ca²⁺ chelation. Basal Ca²⁺ levels were determined by measuring the fluorescence ratio (mean ratio=0.6, n=45) in platelets adhering to non-reactive 10 mg/mL (1%) BSA-coated coverslips. A specific Ca²⁺ signal was defined as a change in fluorescence ratio of more than two standard deviations (2σ=0.38, n=45) relative to the mean fluorescence ratio in resting platelets and corresponded to peaks ranging over 50 nmol/L.

***In Vitro* TN-C Binding Assay**

Blocking solution composition: 1:1,000 Tween 20 and 1 mg/mL (0.1%) BSA in PBS.

Immunoprecipitation

Lysis buffer composition: 1:100 Triton X-100, 20 mmol/L Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane)-HCl, 5 mmol/L Na₃VO₄, 100 mmol/L NaF, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4.

References

1. Toti F, Gachet C, Ohlmann P, Stierle A, Grunebaum L, Wiesel ML, Cazenave JP. Electrophoretic studies on molecular defects of von Willebrand factor and platelet glycoprotein IIb-IIIa with antibodies produced in egg yolk from laying hens. *Haemostasis*. 1992;22:32-40.
2. Andrews RK, Booth WJ, Gorman JJ, Castaldi PA, Berndt MC. Purification of botrocetin from Bothrops jararaca venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry*. 1989;28:8317-8326.
3. von Lukowicz T, Silacci M, Wyss MT, Trachsel E, Lohmann C, Buck A, Luscher TF, Neri D, Matter CM. Human antibody against C domain of tenascin-C visualizes murine atherosclerotic plaques ex vivo. *J Nucl Med*. 2007;48:582-587.
4. Pedretti M, Rancic Z, Soltermann A, Herzog BA, Schliemann C, Lachat M, Neri D, Kaufmann PA. Comparative immunohistochemical staining of atherosclerotic plaques using F16, F8 and L19: Three clinical-grade fully human antibodies. *Atherosclerosis*. 2009.
5. Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol*. 2004;272:13-28.
6. Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Cullere M, Hynes RO, Wagner DD. A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9524-9529.
7. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J*. 2001;20:2120-2130.
8. Holtkotter O, Nieswandt B, Smyth N, Muller W, Hafner M, Schulte V, Krieg T, Eckes B. Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J Biol Chem*. 2002;277:10789-10794.
9. Mangin P, Yuan Y, Goncalves I, Eckly A, Freund M, Cazenave JP, Gachet C, Jackson SP, Lanza F. Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIIA. *J Biol Chem*. 2003;278:32880-32891.

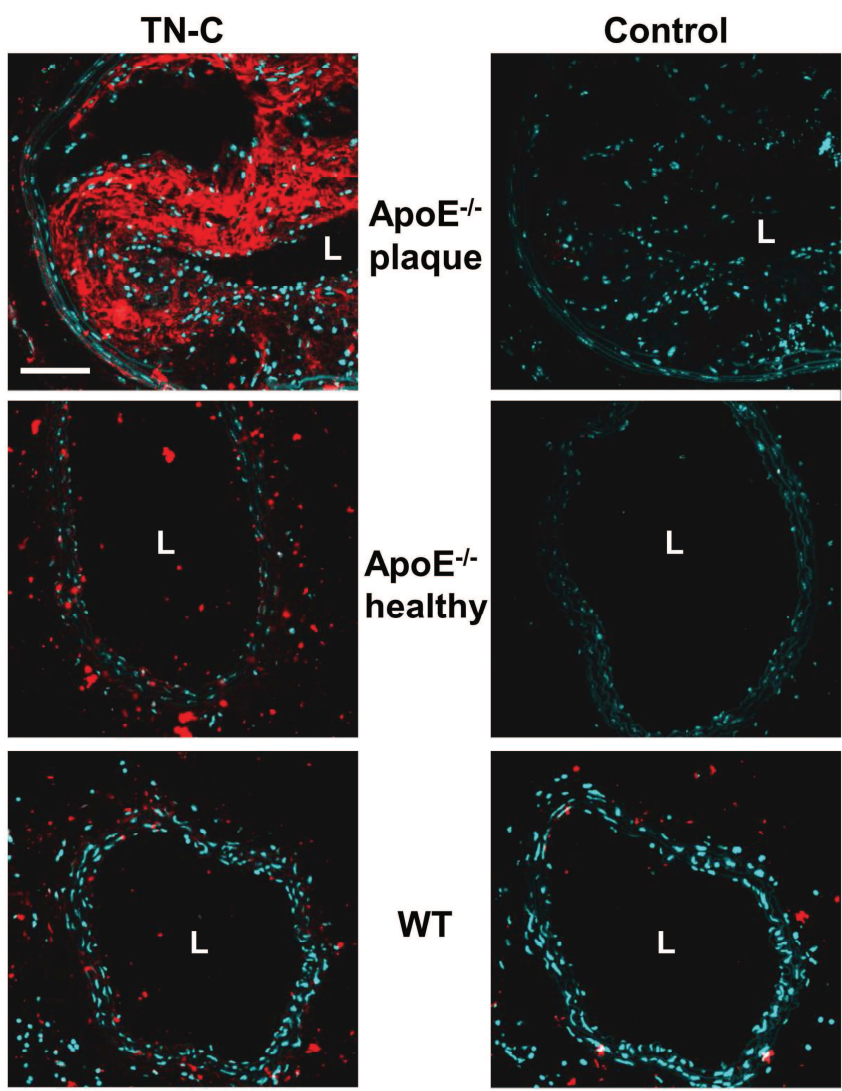
10. Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 1992;267:11300-11306.
11. Kulkarni S, Nesbitt WS, Dopheide SM, Hughan SC, Harper IS, Jackson SP. Techniques to examine platelet adhesive interactions under flow. *Methods Mol Biol*. 2004;272:165-186.
12. Yasuda R, Nimchinsky EA, Scheuss V, Pologruto TA, Oertner TG, Sabatini BL, Svoboda K. Imaging calcium concentration dynamics in small neuronal compartments. *Sci STKE*. 2004;2004:pl5.

Supplemental Figure Legends

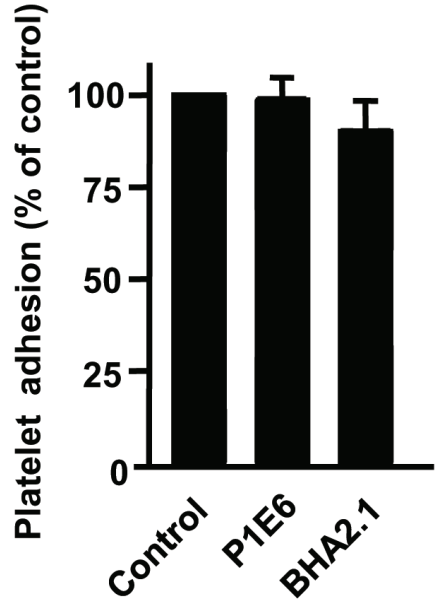
Supplemental Figure I. TN-C is highly expressed in mouse atherosclerotic plaques whereas it is almost absent in healthy vessel wall. Representative confocal images of transversal PFA-fixed cryosections of an atherosclerotic (*ApoE*^{-/-} plaque) or healthy portion (*ApoE*^{-/-} healthy) of a carotid artery from an ApoE-deficient mouse or of a carotid artery from a wild-type mouse (*WT*). TN-C (*left panel*) was detected with a specific mAb (TNC1.2, Dr. G. Orend), followed by a Cy5-conjugated secondary antibody (red). Sections were co-labeled with the nuclear marker DAPI (blue) to visualize the vessel wall. Scale bar, 75 μm . *L* indicates lumen.

Supplemental Figure II. Antibodies blocking collagen binding to $\alpha_2\beta_1$ do not prevent platelet adhesion to TN-C. Hirudinized human whole blood was preincubated for 10 min with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of irrelevant mouse IgG (*Control*) or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of a mAb blocking collagen binding to $\alpha_2\beta_1$ (*P1E6*, *BHA2.1*) and perfused through TN-C-coated (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) glass microcapillaries at 300 s^{-1} . Control experiments were performed to ensure that P1E6 and BHA2.1 inhibited collagen-induced platelet aggregation. Adherent platelets were counted in one random field for each condition after 7 min of perfusion and their number was expressed as a percentage of that in control set to 100%. Results are the mean \pm S.E.M. of three separate experiments (P1E6, $p=0.44$, NS; BHA2.1, $p=0.18$, NS).

Supplemental Figure I



Supplemental Figure II



Conclusion

Nous avons observé que la fibrilline-2, la fibuline-5, l'ostéonectine, la périostine, la profiline-1, NOV et les galectines-1 et -3 ne permettent pas l'adhérence plaquettaire (non montré). De même, alors que les plaquettes ont été décrites pour adhérer sur la galectine-8 (**Romaniuk et al., 2010**), l'ostéopontine (**Bennett et al., 1997**), CYR61 et le CTGF (**Jedsadayamata et al., 1999**) en condition statique, cela n'est pas le cas en présence de flux, même faible. En revanche, de nombreuses plaquettes adhèrent sur TN-C, formant une monocouche, y compris dans des conditions de flux élevés retrouvés dans la gorge d'une sténose. Contrairement au FW et au fibrinogène, la TN-C permet l'adhérence stable des plaquettes. Ces propriétés remarquables s'expliquent notamment par le fait qu'au moins trois récepteurs sont impliqués, à savoir les intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ et la GPIIb/IIIa, qui lie le FW plasmatique adsorbé sur la TN-C. Enfin, les plaquettes adhérant sur TN-C passent de la forme discoïde de repos à une morphologie sphérique, émettent des filopodes et présentent des oscillations calciques, traduisant leur activation. L'ensemble des données obtenues suggère que la TN-C pourrait participer à la thrombose. En raison de son expression préférentielle dans les plaques d'athérosclérose, elle pourrait représenter un candidat attractif pour un ciblage de la thrombose affectant peu l'hémostase.

Rôle des β -arrestines dans l'activation plaquettaire,
en hémostasie et en thrombose

Publication 3 :

**“ β -arrestin-1 participates in thrombosis and regulates integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$
signalling without affecting P2Y receptors desensitization and function”**

Mathieu Schaff¹; Nicolas Receveur¹; Catherine Bourdon¹; Philippe Ohlmann¹; François Lanza¹; Christian Gachet¹; Pierre H Mangin¹

¹INSERM UMR-S949, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), Strasbourg, F-67065, France

Thromb Haemost. 2012 Apr;107(4):735-48.

Introduction

β -arr1 et β -arr2 sont deux protéines cytosoliques exprimées de manière ubiquitaire qui, en s'associant à certains récepteurs activés, particulièrement ceux couplés aux protéines G, participent à leur désensibilisation, un processus les rendant insensibles à toute stimulation ultérieure (DeWire et al., 2007). De plus, les β -arrestines activent des voies de signalisation propres, régulant des fonctions cellulaires telles que l'adhérence et la migration à travers notamment la modulation de l'affinité des intégrines et de l'organisation du cytosquelette (DeWire et al., 2007). De récentes études dans des lignées cellulaires transfectées ont suggéré un rôle des β -arrestines dans la désensibilisation des récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ (Hoffmann et al., 2008; Mundell et al., 2006; Reiner et al., 2009; Savi et al., 2006). Alors que la fonction des β -arrestines dans les plaquettes restait inconnue au commencement de ce travail, il a récemment été montré que les souris invalidées pour le gène de β -arr1 sont protégées contre la thrombose artérielle (Li et al., 2011). Ce défaut proviendrait au moins en partie d'une diminution de la réponse du récepteur PAR-4, tandis que l'activité des récepteurs de l'ADP ne serait pas modifiée (Li et al., 2011).

Le but de cette étude a été d'étudier le rôle des β -arrestines dans (i) l'activation plaquettaire, et (ii) l'hémostase et la thrombose. Deux lignées de souris invalidées pour le gène de β -arr1 ou β -arr2 ont été utilisées. Concernant le premier objectif, nous avons évalué la capacité des plaquettes de ces souris à s'activer en réponse aux agonistes classiques (ADP, thrombine, peptide sélectif de PAR-4, analogue stable du TxA₂) et après adhérence sur différentes glycoprotéines incluant le FW, le collagène et le fibrinogène. Le rôle des β -arrestines *in vivo* a été déterminé dans deux modèles expérimentaux de thrombose et par la mesure du temps de saignement après section de la queue des souris.

β -arrestin-1 participates in thrombosis and regulates integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ signalling without affecting P2Y receptors desensitisation and function

Mathieu Schaff¹⁻³; Nicolas Receveur¹⁻³; Catherine Bourdon¹⁻³; Philippe Ohlmann¹⁻³; François Lanza¹⁻³; Christian Gachet¹⁻³; Pierre Henri Mangin¹⁻³

¹INSERM U949, Strasbourg, France; ²UMR-S949, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ³Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), Strasbourg, France

Summary

β -arrestin-1 (β -arr1) and β -arrestin-2 (β -arr2) are cytosolic proteins well-known to participate in G protein-coupled receptor desensitisation and signalling. We used genetically-inactivated mice to evaluate the role of β -arr1 or β -arr2 in platelet function, P2Y receptor desensitisation, haemostasis and thrombosis. Platelet aggregation, soluble fibrinogen binding and P-selectin exposure induced by various agonists were near normal in β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} platelets. In addition, deficiency in β -arr1 or β -arr2 was not critical for P2Y receptors desensitisation. A functional redundancy between β -arr1 and β -arr2 may explain these unchanged platelet responses. Interestingly, β -arr1^{-/-} but not β -arr2^{-/-} mice were protected against laser- and FeCl₃-induced thrombosis. The tail bleeding times, number of rebleeds and volume of

blood loss were unchanged in β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} mice, suggesting no defect in haemostasis. β -arr1^{-/-} platelet activation upon adhesion to immobilised fibrinogen was inhibited, as attested by a $37 \pm 5\%$ ($n = 3$, $p < 0.0001$) decrease in filopodia extension, suggesting defective signalling through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. β -arr1 appeared to be located downstream of Src family kinases and to regulate $\alpha_{IIb}\beta_3$ signalling by increasing Akt phosphorylation. Overall, this study supports a role for β -arr1 in promoting thrombus formation, in part through its participation in $\alpha_{IIb}\beta_3$ signalling, and no role of β -arr1 and β -arr2 in agonist-induced platelet activation and P2Y receptors desensitisation.

Keywords

β -arrestins, platelets, thrombosis, $\alpha_{IIb}\beta_3$, Akt

Correspondence to:

Pierre Henri Mangin
INSERM UMR-S949, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace)
10, rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France
Tel.: +33 3 88 21 25 25, Fax: +33 3 88 21 25 21
E-mail: pierre.mangin@efs-alsace.fr

Received: June 27, 2011

Accepted after major revision: January 5, 2012

Prepublished online: February 8, 2012

doi :10.1160/TH11-06-0430

Thromb Haemost 2012; 107: 735–748

Introduction

β -arrestin-1 (β -arr1) and β -arrestin-2 (β -arr2), also called arrestin-2 and arrestin-3, respectively, are ubiquitously-expressed cytosolic proteins found in mammals, and form the non-visual arrestin family (1). They bind to activated G protein-coupled receptors (GPCRs) and were originally described as serving to desensitise activation of G proteins and to target the receptors to clathrin-coated pits for endocytosis, thereby terminating the agonist-induced signalling. More recently, it has been established that both β -arr1 and β -arr2 also transduce signals of agonist-occupied GPCRs by acting as adaptors, recruiting a variety of proteins including GTPases and diverse kinases such as phosphoinositide 3-kinase (PI3K), Akt, Src kinases and mitogen-activated protein kinases (1). The resulting multiprotein scaffolding promotes G protein-independent alternative signalling which regulate many cellular responses such as adhesion, proliferation, differentiation, migration, and apoptosis.

P2Y₁ and P2Y₁₂ are G protein-coupled adenosine 5'-diphosphate (ADP) receptors playing a key role in platelet activation and thrombosis (2). Platelets activated by ADP become refractory to restimulation, a phenomenon which has been attributed to P2Y₁ desensitisation and internalisation (3–5). Although a substantial fraction of P2Y₁₂ is rapidly internalised upon stimulation (4), whether this process is accompanied by a functional desensitisation remains unclear. We previously published that ADP-pre-

treated platelets retained P2Y₁₂ activity (3, 4). For unidentified reasons, this was not the case in another study by Hardy et al. (5), suggesting that P2Y₁₂ underwent desensitisation. Both β -arr1 and β -arr2 were shown to associate with stimulated P2Y₁ and P2Y₁₂ in transfected cell systems (6–8). However, whether β -arrestins mediate P2Y receptor desensitisation in platelets remains to be established.

Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ plays a pivotal role in haemostasis and arterial thrombosis by supporting platelet adhesion and aggregation at sites of vascular injury (9). A key attribute of $\alpha_{IIb}\beta_3$ is its capacity to shift from a resting low to an activated high affinity conformation for its main ligand, fibrinogen. This transformation is mediated by platelet-activating inside-out signals derived from tyrosine kinase-linked and G protein-coupled receptors. Upon fibrinogen binding, $\alpha_{IIb}\beta_3$ initiates its own signalling cascade involving several proteins notably Src kinases, phospholipase C γ 2, PI3K and Akt (9–11). The so-called outside-in $\alpha_{IIb}\beta_3$ signalling promotes intracellular Ca²⁺ mobilisation and cytoskeletal reorganisation leading to filopodia emission, and is important to platelet function in haemostasis and arterial thrombosis (12–15). While β -arrestins also regulate a variety of non GPCRs, their importance in $\alpha_{IIb}\beta_3$ function is unknown (1).

Recently, it has been described that β -arr1 deficiency resulted in a thrombosis defect in a FeCl₃ carotid injury model (16). *In vitro* studies showed reduced soluble fibrinogen binding after stimu-

Thrombosis and Haemostasis 107.4/2012

lation of the platelet protease-activated receptor (PAR) 4. Whether the decreased thrombosis observed in β -arr1^{-/-} mice is due to the defective response through PAR4 or arises from additional signalling pathways remains to be established.

The objectives of this study were to evaluate the role of β -arr1 and β -arr2 in (i) agonist-induced platelet activation, (ii) P2Y₁ and P2Y₁₂ desensitisation, and (iii) haemostasis and experimental thrombosis. Mouse platelets with deficiency in β -arr1 or β -arr2 responded normally to a series of agonists, and displayed similar desensitisation to ADP as wild-type (WT) platelets, suggesting that these proteins do not play a key role in these processes. We observed a contribution of β -arr1, but not β -arr2, to arterial thrombosis after laser or FeCl₃ injury. The tail bleeding times, rebleeding occurrences and volume of blood loss were unchanged in β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} mice, suggesting no defect in haemostasis. Upon adhesion to immobilised fibrinogen, β -arr1-knock-out platelets exhibited defective integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated shape change. The role of β -arr1 in $\alpha_{IIb}\beta_3$ outside-in signals appeared to be dependent on Src family kinases and linked to the upregulation of Akt phosphorylation.

Materials and methods

Materials

Alexa Fluor 488-labelled fibrinogen, DIOC₆ (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) and the indicators Oregon Green 488 BAPTA/AM-1 and Calcein red-orange/AM were from Molecular Probes (Paisley, UK). FITC-coupled anti-P-selectin antibody (RB40.34) was purchased from BD Pharmingen (Le Pont-De-Claix, France) and FeCl₃ solution from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Fatty acid-free human serum albumin (HSA), fura-2/AM, TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate)-phalloidin, bovine thrombin, U46619, ADP, ADP β S, indomethacin, PP1 and PP2 were provided by Sigma-Aldrich (Lyon, France). AR-C69931MX (Cangrelor), a P2Y₁₂ antagonist, was from the Medicines Company (Parsippany, NJ, USA) and MRS2179, a P2Y₁ blocker, from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Cross-linked collagen-related peptide (CRP-XL) was obtained from Dr. R.W. Farndale (University of Cambridge, Cambridge, UK), PAR4-selective agonist AYPGKF peptide was synthesised by PolyPeptide Group (Strasbourg, France) and Horm fibrillar type I collagen from equine tendon was from Nycomed (Zurich, Switzerland). Human fibrinogen was provided by Kabi (Bad Homburg, Germany) and 1-paraformaldehyde (PFA) by Electron Microscopy Sciences (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Recombinant hirudin was from Transgene (Illkirch-Graffenstaden, France) and acid citrate dextrose (ACD) solution from Bioluz (St-Jean-de-Luz, France). Apyrase was purified from potatoes as previously described (17). Monoclonal antibodies to total Akt and phosphorylated Akt at Ser473 (D9E) or Thr308 (244F9) were from Cell Signaling Technology (Ozyme, St-Quentin-en-Yvelines, France).

Mice

β -arr1- and β -arr2-deficient mice (18, 19) were provided by Pr. R.J. Lefkowitz (Duke University, Durham, NC, USA) and backcrossed for six generations on C57BL/6 background. WT mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). Mice were maintained in the animal facilities of the Etablissement Français du Sang-Alsace. We used 8- to 10-week-old mice, anaesthetised intraperitoneally with a mixture of xylazine (20 mg per kg body weight, Rompun[®], Bayer, Leverkusen, Germany) and ketamine (100 mg per kg body weight, Imalgene 1,000[®], Merial, Lyon, France). All experiments conformed to the French legislation for animal experimentation and followed the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Washed platelet preparation

Blood was drawn from the abdominal aorta into ACD anticoagulant, pooled (4–6 animals), and platelets were washed by sequential centrifugations and adjusted to 3×10^8 platelets/ml in Tyrode's albumin buffer containing 0.02 U/ml apyrase (17, 20).

Aggregation studies

Washed platelets aggregation was measured turbidimetrically using a four-channel CARAT TX4 aggregometer (Entec, Ilmenau, Germany) as previously described (17).

Measurement of fibrinogen binding and P-selectin exposure

Washed platelets (5×10^7 /ml) were stimulated with the indicated agonists in the presence of Alexa Fluor 488-fibrinogen (20 μ g/ml) or FITC-anti-P-selectin antibody (25 μ g/ml), mixed and at predetermined time points fixed with PBS-20 mg/ml PFA for 20 minutes (min). Platelets were pelleted by centrifugation at 1,000 \times g for 2 min and resuspended in 500 μ l phosphate-buffered saline (PBS). The fluorescence intensity of each platelet sample was measured in the range 525–50 nm after excitation with a 488-nm argon-ion laser using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France). The extents of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation and P-selectin exposure were represented by the levels of Alexa Fluor 488-fibrinogen and FITC-anti-P-selectin binding, respectively, expressed as the geometric mean of the relative fluorescence intensity of 10,000 platelets (in arbitrary units) (Kaluza software, Beckman Coulter). Basal fluorescence, as measured in resting platelets, was subtracted from all data points.

ELISA-based VASP whole blood assay

Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation state was determined using a standardised ELISA (CY-QUANT VASP/P2Y₁₂[®], Biocytex, Marseille, France) (21, 22). Briefly, hirudinized (100 U/ml) whole blood drawn from the abdominal aorta was pretreated for 20 min with Tyrode's albumin buffer or ADP (10 μ M). Each sample was then incubated for 10 min at room temperature (RT) with either prostaglandin E₁ (PGE₁) or PGE₁ plus ADP in two separate wells of a 96-well plate. After cell lysis, VASP was captured by a selective anti-VASP antibody coated on the wells. A peroxidase-conjugated anti-phosphorylated VASP antibody was then added, and the plates were incubated with a chromogenic substrate solution and read at 450 nm. The platelet reactivity index (PRI), which reflects the ability of P2Y₁₂ to inhibit PGE₁-induced VASP phosphorylation, was calculated from blank-corrected optical densities (OD) as follows: PRI (%) = $[(OD_{PGE1} - OD_{PGE1 + ADP}) / OD_{PGE1}] \times 100$.

Static adhesion assay

Glass coverslips were coated with 100 μ g/ml fibrinogen for 2 hours (h) at RT and blocked with PBS-10 mg/ml HSA for 1 h. Washed platelets (3 \times 10⁷/ml) were pretreated for 15 min with AR-C69931MX (10 μ M), MRS2179 (100 μ M) and indomethacin (100 μ M) alone or in the presence of either vehicle (1:1,000 DMSO), PP1 or PP2 (10 μ M), and allowed to adhere to the coated surfaces at 37°C. After 20 min, non-adherent platelets were washed away and adherent cells were fixed with PBS-40 mg/ml PFA, stained with TRITC-phalloidin (2 μ g/ml) and imaged using a Leica DMI 4000 B epifluorescence microscope with a 63x, 1.4 numerical aperture oil objective (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) (23).

Scanning electron microscopy (SEM)

Adherent platelets were fixed with 25 mg/ml glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3) containing 20 mg/ml sucrose. SEM was performed as described elsewhere (23).

Analysis of cytosolic Ca²⁺ fluxes

ADP-induced Ca²⁺ elevations were measured as previously reported (24). Briefly, washed platelets resuspended in Ca²⁺-free Tyrode's buffer (7.5 \times 10⁸ cells/ml) were loaded with fura-2/AM (15 μ M) for 45 min at 37°C. The dyed platelets were pelleted at 1,900 \times g for 3 min, resuspended to 2 \times 10⁸/ml in Tyrode's buffer containing apyrase and 1 mg/ml HSA, and challenged with P2Y receptor agonists using a PTI Deltascan spectrofluorimeter (Photon Technology International, Ford, UK). Fluorescence measurements were

performed at 510 nm after exciting alternatively at 340 and 380 nm, and converted to intracellular Ca²⁺ levels. Cytosolic Ca²⁺ changes upon platelet adhesion to fibrinogen were measured using a previously published method (20). Briefly, washed platelets (5 \times 10⁸/ml) were simultaneously loaded with Oregon Green 488 BAPTA/AM-1 (5 μ M), Calcein red-orange/AM (10 μ M) and the membrane transporter inhibitor probenecid (2.5 μ M) for 45 min at 37°C. The dyed platelets were pelleted at 1,900 \times g for 3 min, re-suspended at 1 \times 10⁸/ml in Tyrode's albumin buffer, and allowed to adhere to fibrinogen-coated (100 μ g/ml) coverslips for 20 min. The increases in platelet and Ca²⁺-dependent fluorescence intensity upon adhesion were measured in the ranges 572–700 nm and 495–535 nm, respectively, by confocal laser scanning microscopy, and converted to intracellular Ca²⁺ levels (Leica TCS SP5).

Clot retraction

Blood drawn into sodium citrate (3.15 mg/ml) from the abdominal aorta of 2–3 mice was pooled, centrifuged at 250 \times g for 1 min and platelet-rich plasma (PRP) was adjusted to 8 \times 10⁸ platelets/ml with autologous platelet-poor plasma. PRP (500 μ l) was added to quartz cuvettes maintained at 37°C in the presence of 20 mM CaCl₂. The clots were allowed to retract for up to 80 min and photographed every 5 min. The extent of retraction was then quantified using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Measurement of Akt phosphorylation

Platelets adhering to fibrinogen were incubated in lysis buffer (1:50 Triton X-100, 40 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), 10 mM Na₂VO₃, 100 mM NaF, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 300 mM NaCl, pH 7.4) for 10 min at 4°C and centrifuged at 7,000 \times g for 7 min. The supernatants were resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. The levels of total and phosphorylated Akt were determined by Western blotting using monoclonal antibodies as previously described (25).

Laser-induced mesenteric artery thrombosis model

Thrombosis was performed as previously described (26). Briefly, platelets were labelled by injection of DIOC₆ (5 μ l of a 100 μ M solution per g body weight), a membrane fluorescent dye, and a localised deep injury of a mesenteric arteriole was induced with a high intensity 440-nm-pulsed nitrogen dye laser applied for 30–40 seconds (s) (300–400 hits) with a Micropoint system (Photonic Instruments, Andor Technology, Belfast, UK). Thrombus formation was monitored (1 image/s) by fluorescence microscopy using a Sensicam charge-coupled device (CCD) camera (The Cooke Cor-

Table 1: Platelet count and surface expression of different glycoproteins in WT, β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} mice. Platelet counts are the mean \pm SEM for groups of at least 12 mice. Surface expression of the indicated glycoproteins was determined in whole blood by staining with selective antibodies followed by flow cytometry analysis. Platelets were gated by FSC/SSC characteristics (10,000 platelets per sample). Results are expressed as the geometric mean \pm SEM of the relative fluorescence intensity, in arbitrary units (three mice per group).

	WT	β -arr1 ^{-/-}	β -arr2 ^{-/-}
GP1Ib/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)	3.9 \pm 0.1	4.2 \pm 0.04	4.5 \pm 0.1
GP1Ia (β_1)	0.43 \pm 0.02	0.56 \pm 0.09	0.46 \pm 0.06
GP1a (α_2)	0.73 \pm 0.03	0.68 \pm 0.07	0.69 \pm 0.01
GPVI	0.20 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01
GPV	0.65 \pm 0.01	0.63 \pm 0.03	0.60 \pm 0.02
GPIX	1.47 \pm 0.06	1.44 \pm 0.01	1.49 \pm 0.03
GP1b α	1.74 \pm 0.07	1.65 \pm 0.06	1.64 \pm 0.01
Platelet count (x10 ⁶ /ml)	1,038 \pm 47	969 \pm 53	1,151 \pm 35

poration, Romulus, MI, USA), and images were analysed with the SlideBook software (Intelligent Imaging Innovations, Göttingen, Germany).

FeCl₃-induced carotid artery thrombosis model

DIOC₆ was injected into the jugular vein (5 μ l of a 100 μ M solution per g body weight) to label platelets and assist thrombus visualisation. The left common carotid artery was exposed and vascular injury was induced by topically applying over the adventitia for 2 min a Whatman #1 filter paper (1 x 0.5 mm) saturated with 0.2 μ l of a 75 mg/ml FeCl₃ saline solution (27). The artery was then rinsed with saline and thrombus formation was monitored in real time under a fluorescent microscope (Macroflu, Leica Microsystems) using a 5x, 0.5 numerical aperture objective. Images (1 image/s) were acquired using a CCD camera (CoolSNAP HQ2, Photometrics, Roper Scientific, Evry, France) and analysed with Metamorph software version 7.6 (Molecular Devices, Roper Scientific).

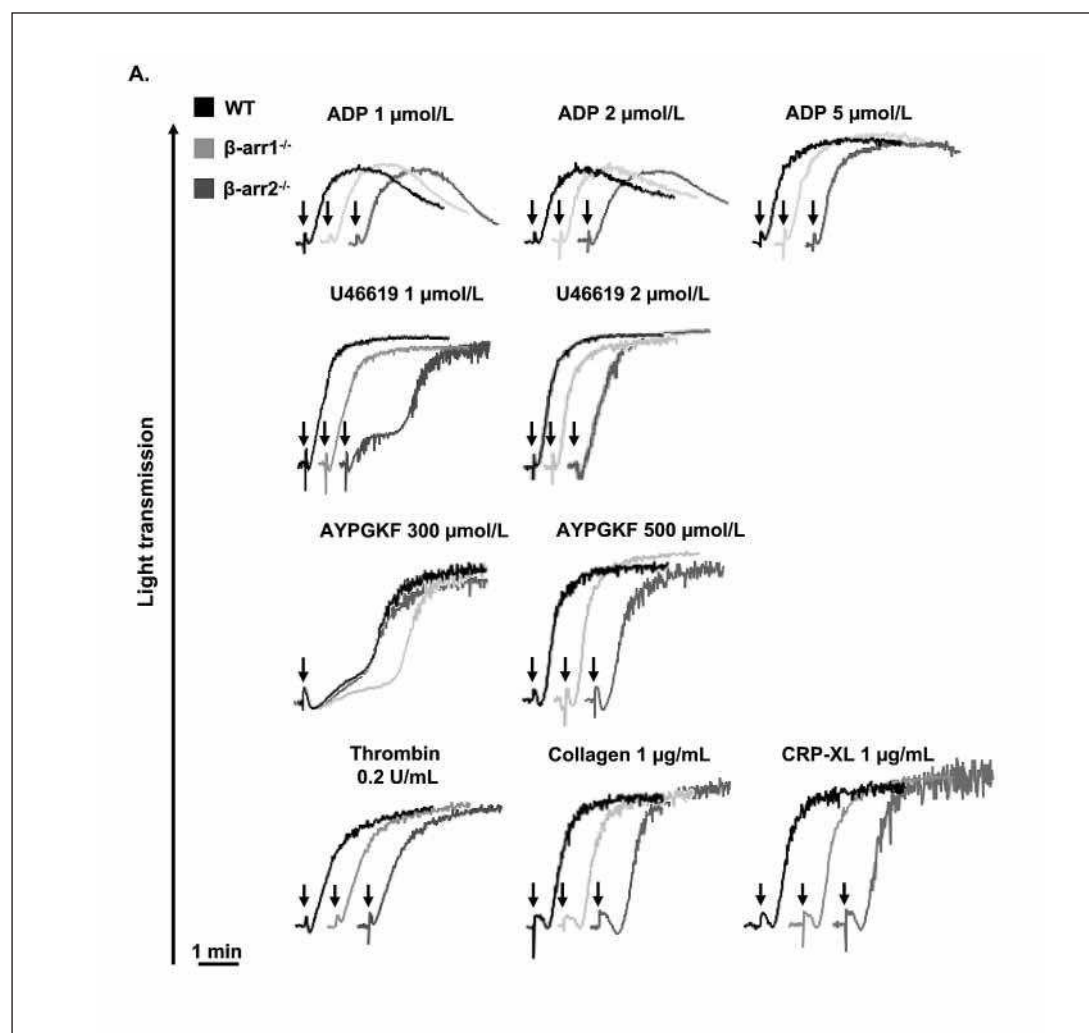


Figure 1: Role of β -arr1 and β -arr2 in platelet aggregation, soluble fibrinogen binding and P-selectin exposure. A) Washed platelets (2×10^8 /ml) from WT, β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} mice were aggregated by a range of agonists in the presence (ADP, U46619, AYPGKF, type I collagen and CRP-XL) or absence (thrombin) of fibrinogen (64 μ g/ml). Arrows indicate the point of agonist addition. Aggregation profiles are representative of four separate experiments.

Bleeding time

The bleeding time was measured by transversally severing a 3-mm segment from the distal tail of 8- to 10-week-old isoflurane-anesthetized mice. The amputated tail was immediately immersed in 9 mg/ml isotonic saline at 37°C during 30 min and the time required for arrest of bleeding was recorded. The tube containing saline with blood was then homogenised and centrifuged at 550 x g during 5 min. The supernatant was removed and 2 ml of lysis buffer (NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 1 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2) was added to the pellet. After homogenisation, the optical density was read at 540 nm and compared to a standard curve to determine the volume of blood loss.

Statistical analyses

All values are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM) unless otherwise indicated. Data were compared by two-

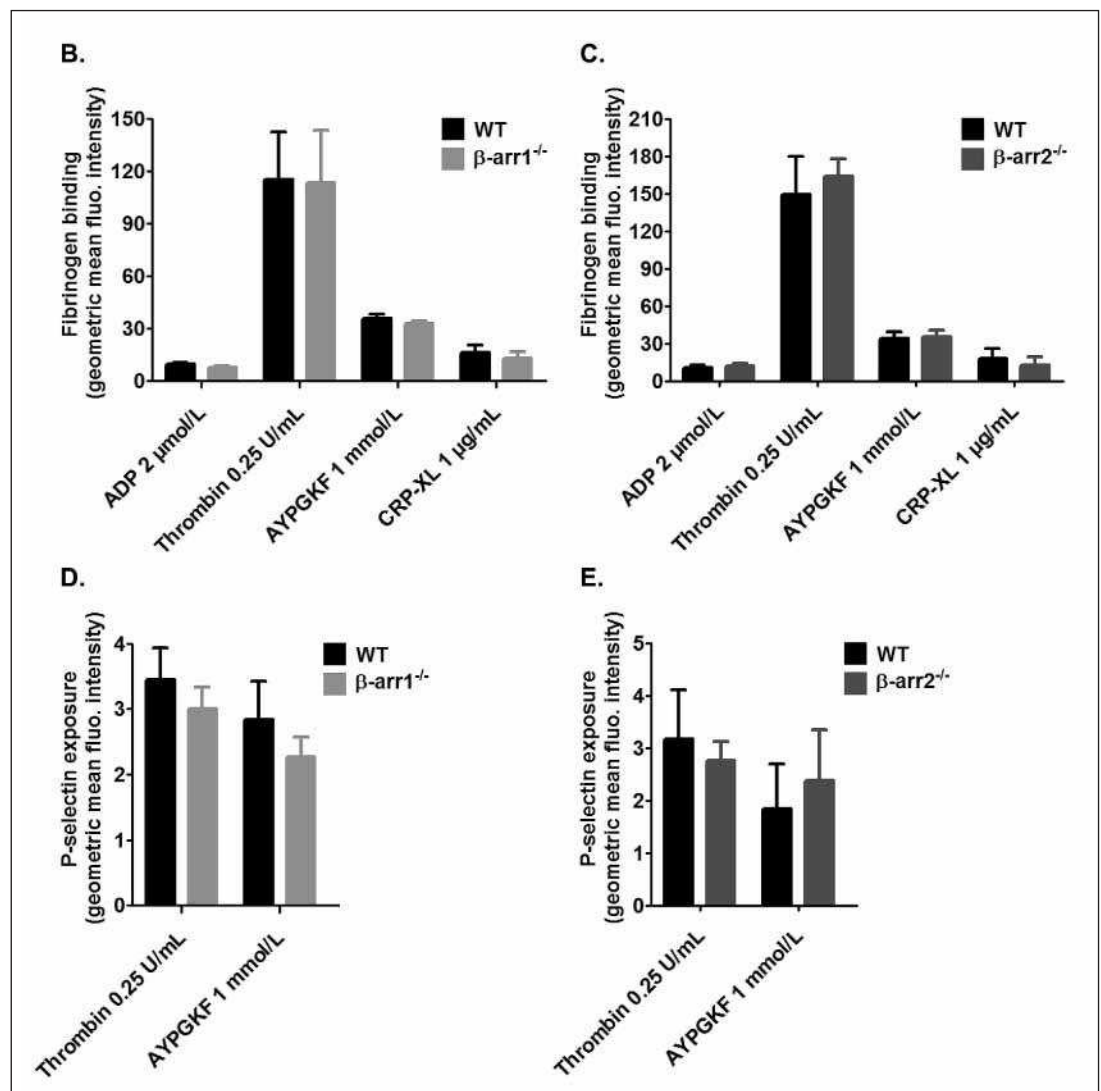
tailed Student's t-tests using Prism software (GraphPad, La Jolla, CA, USA) and differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Platelet aggregation, soluble fibrinogen binding and P-selectin exposure in β -arr1- and β -arr2-deficient platelets

Deletion of β -arr1 or β -arr2 did not affect the platelet count and expression of the major surface glycoproteins (► Table 1). We examined the ability of β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} platelets to become activated after stimulation with a range of agonists. As shown in ► Figure 1A and ► Suppl. Figure 1 (available online at www.thrombosis-online.com), WT and knock-out platelets displayed equivalent aggregation profiles in response to various concentrations of

Figure 1 continued: B-E) WT, β -arr1^{-/-} (B, D) and β -arr2^{-/-} (C, E) washed platelets (5×10^7 /ml) were stimulated with various agonists in the presence of Alexa Fluor 488-fibrinogen (B, C) or a FITC-anti-P-selectin antibody (D, E). After 20 or 10 min, the samples were fixed and the extent of fibrinogen binding and P-selectin exposure was measured by flow cytometry. Results represent the geometric mean \pm SEM of the relative fluorescence intensity in arbitrary units, obtained in four separate experiments performed in duplicate (10,000 platelets analysed per experiment).



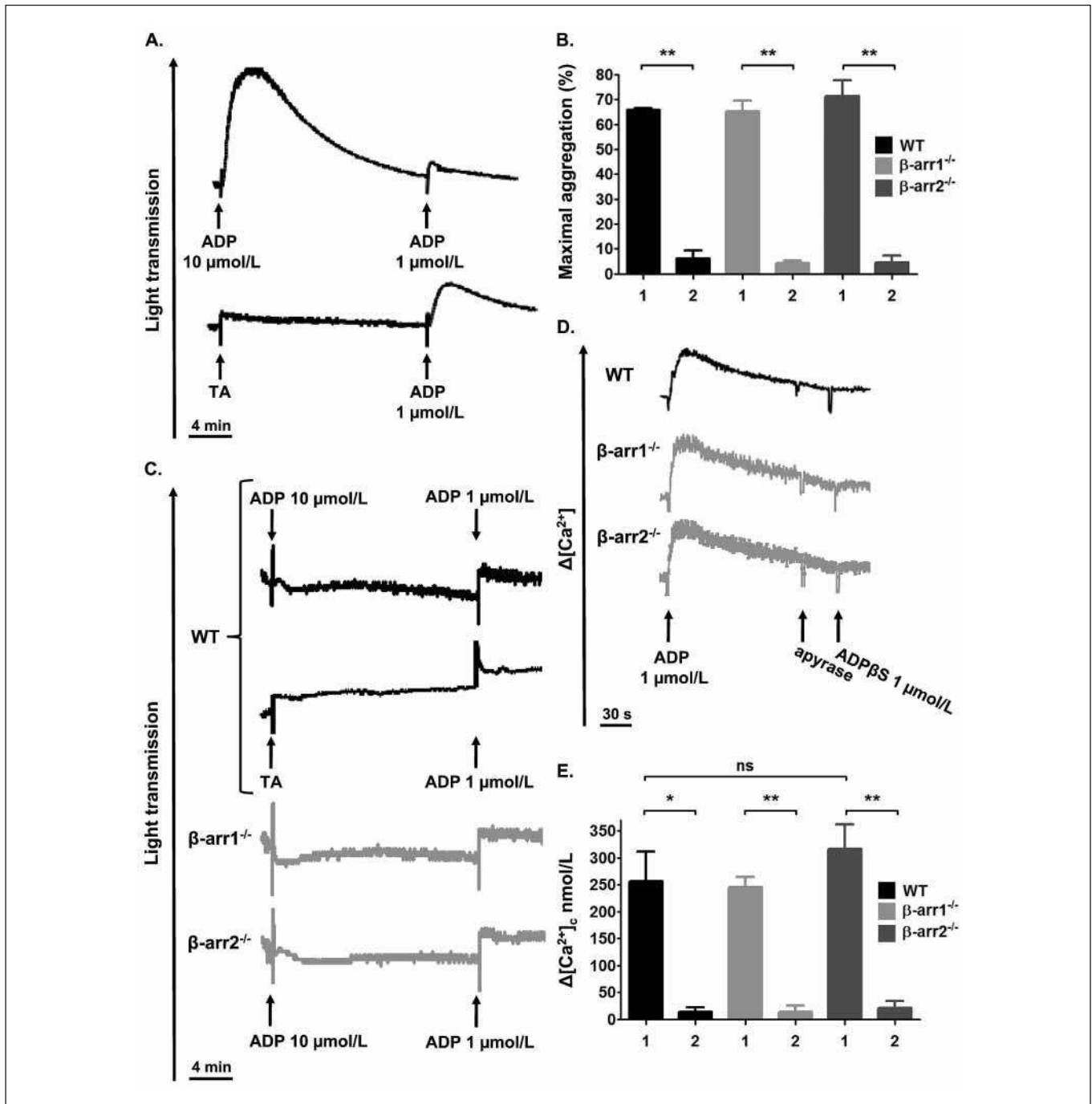
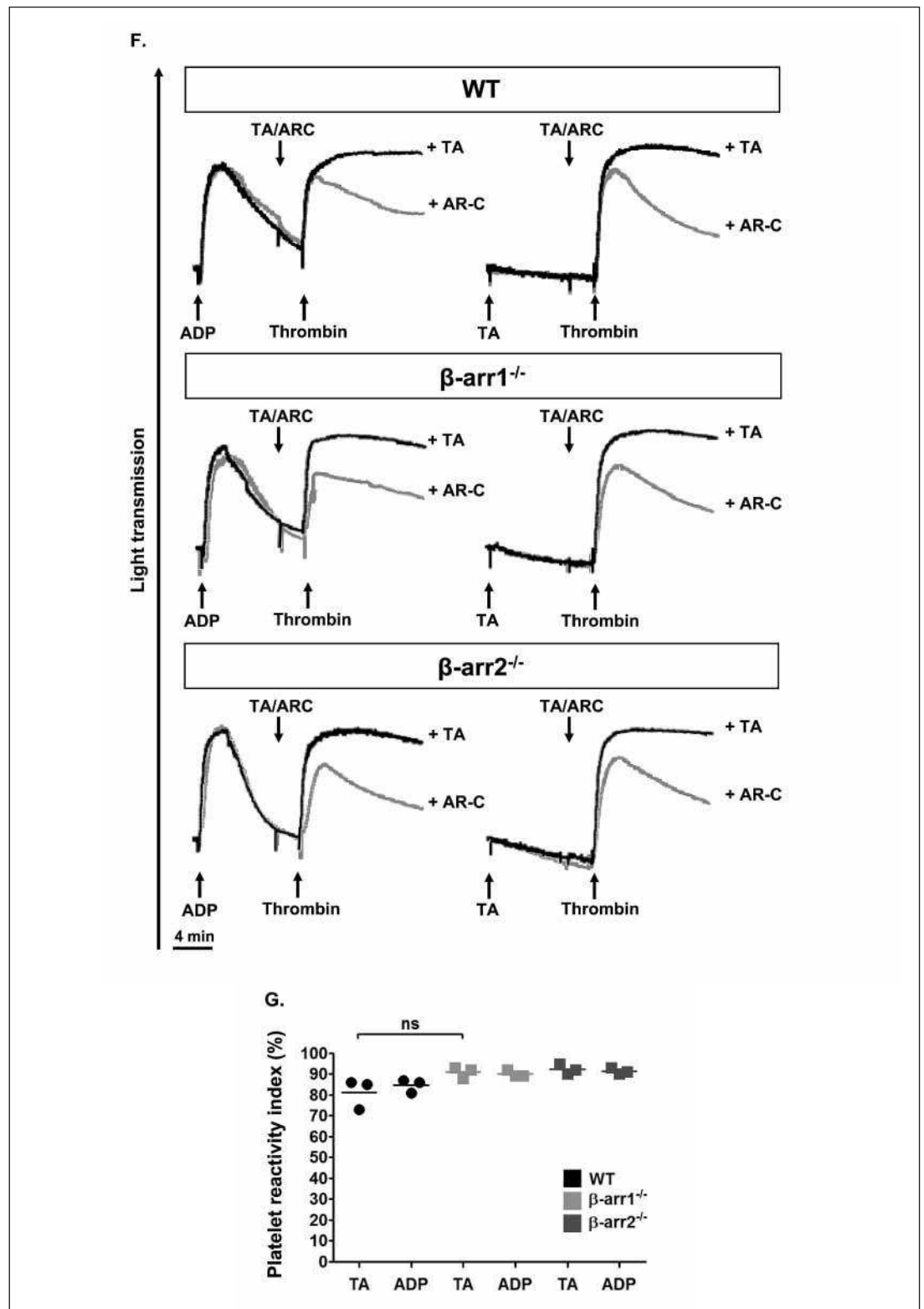


Figure 2: Role of β -arr1 and β -arr2 in P2Y receptors desensitisation.

A) Top: WT platelets (2×10^8 /ml) were aggregated by 10 μ M ADP in the presence of 64 μ g/ml fibrinogen, followed by a second challenge with ADP (1 μ M) after 20 min. Bottom: WT platelets were incubated with vehicle (Tyrode's albumin buffer, [TA]) and stimulated with 1 μ M ADP after 20 min. B) Washed platelets (2×10^8 /ml) from WT, β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} mice were aggregated as in A. Bars represent the maximal amplitude of aggregation after addition of 10 μ M ADP (1) and restimulation with 1 μ M ADP (2). Data are the mean \pm SEM from three separate experiments. ** $p < 0.01$. C) Aggregation: WT, β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} platelets (2×10^8 /ml) pretreated with AR-

C69931MX (10 μ M) for 15 min were incubated with 10 μ M ADP or TA in the presence of 64 μ g/ml fibrinogen, followed by a second challenge with ADP (1 μ M) after 20 min. D, E) Variations in Ca^{2+} levels were measured by spectrofluorimetry in fura-2/AM-loaded (15 μ M) WT, β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} platelets (2×10^8 /ml) stimulated with 1 μ M ADP. After 2 min, apyrase (0.2 U/ml) was added for 30 s and the cells were restimulated with 1 μ M ADP β S. Representative profiles are shown (D). Bars represent the maximal increase in cytosolic Ca^{2+} after addition of ADP (1) and restimulation with ADP β S (2). Data are the mean \pm SEM from three separate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (E).

Figure 2 continued:
 F) Black curves: aggregation of WT, β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} platelets (2×10^8 /ml) in response to 0.05 U/ml thrombin, 13 min after a first addition of either 10 μ M ADP or TA in the presence of 64 μ g/ml fibrinogen. Grey curves: WT, β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} platelets were aggregated or not by ADP as above, followed by addition of AR-C69931MX (10 μ M), 3 min before stimulation with thrombin. The profiles are representative of at least three independent experiments.
 G) Hirudinized (100 U/ml) whole blood from WT, β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} mice was pretreated or not with 10 μ M ADP for 20 min, and the ability of P2Y₁₂ to inhibit PGE₁-induced VASP phosphorylation was determined by ELISA. Distribution of the platelet reactivity index in three different mice is shown. The mean value is indicated with horizontal bars.



ADP, thrombin, type I fibrillar collagen and CRP-XL, a glycoprotein VI-selective ligand. In addition, serotonin-induced shape change and the ability of either adrenaline or serotonin to potentiate aggregation in response to 1 μ M ADP were unchanged (data not shown). By contrast, β -arr2^{-/-} but not β -arr1^{-/-} platelet aggregation was delayed and exhibited a biphasic appearance restricted to the lowest concentration (1 μ M) of the thromboxane A₂ (TxA₂) analog U46619, indicating minor participation of β -arr2 in TP receptor signalling (► Fig. 1A). A similar defect was observed in β -arr1^{-/-} platelets using subthreshold concentrations (300 μ M) of AYPGKF, a PAR4 agonist peptide (► Fig. 1A). In parallel, we observed that soluble fibrinogen binding induced by ADP (2 μ M), thrombin (0.25 U/ml), AYPGKF (1 mM) and CRP-XL (1 μ g/ml) was normal in β -arr1- and β -arr2-null compared to control platelets (► Fig. 1B, C). Finally, no defective P-selectin exposure, a marker of granule secretion, was found following thrombin (0.25 U/ml) and AYPGKF (1 mM) stimulation (► Fig. 1D, E). Altogether, these results suggested that β -arr1 and β -arr2 play no major role in the signalling machinery leading to activation of platelets by a wide range of agonists.

β -arr1 and β -arr2 are not critical for P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors desensitisation

WT platelets activated by ADP become refractory to restimulation, a phenomenon attributed to P2Y receptor desensitisation (3–5), and illustrated by absence of shape change and reduced aggregation in response to a second ADP challenge (► Fig. 2A and ► Suppl. Fig. 2A and C, available online at www.thrombosis-online.com). A similar refractoriness was observed in the knock-out platelets, suggesting that neither β -arr1 nor β -arr2 play a critical role in P2Y receptor desensitisation (► Fig. 2B and ► Suppl. Fig. 2B and D, available online at www.thrombosis-online.com). To investigate this in more details, we studied P2Y₁ desensitisation in platelets pretreated with 10 μ M of the P2Y₁₂ blocker AR-C69931MX. As expected, addition of ADP (10 μ M) to WT platelets caused a shape change without aggregation (► Fig. 2C) (2, 28). Upon restimulation with 1 μ M ADP, no response was observed, reflecting desensitisation of P2Y₁ (► Fig. 2C). Platelets lacking either β -arr1 or β -arr2 exhibited similar responses, indicating that these proteins do not contribute to P2Y₁ desensitisation (► Fig. 2C). These results were confirmed by looking at ADP-induced Ca²⁺ mobilisation, which is mediated by P2Y₁ (3, 24). Similarly as in the WT, β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} platelets stimulated with ADP followed by its removal with apyrase, were unable to exhibit Ca²⁺ rises in response to a second challenge with the metabolically stable P2Y receptor agonist ADP β S (► Fig. 2D, E). Although a substantial fraction of P2Y₁₂ is rapidly internalised upon stimulation (4), whether this phenomenon is accompanied by a functional desensitisation is still a matter of debate (3–5). Therefore, we re-examined P2Y₁₂ desensitisation and the potential role of β -arrestins in this process. We used the capacity of P2Y₁₂ to potentiate thrombin-induced platelet aggregation (► Fig. 2F, grey curves) as a marker of its sensitisation

state (2, 4). As shown in ► Figure 2F, the rate and amplitude of aggregation in response to 0.05 U/ml thrombin were similar in WT platelets pre-stimulated or not with 10 μ M ADP, suggesting no functional desensitisation of P2Y₁₂. Equivalent aggregation profiles were obtained when these experiments were performed in β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} platelets (► Fig. 2F). To get a more direct measurement of P2Y₁₂ signalling, we analysed intraplatelet VASP phosphorylation, a method used to monitor the efficacy of anti-P2Y₁₂ therapy (21, 22). ELISA showed that in WT platelets pretreated with 10 μ M ADP, P2Y₁₂ was still able to profoundly inhibit PGE₁-induced VASP phosphorylation, reflecting once again absence of desensitisation (► Fig. 2G). Similar results were found in β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} platelets, confirming that these proteins are unlikely to contribute to P2Y₁₂ desensitisation (► Fig. 2G).

β -arr1 participates in integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated filopodia extension

We next evaluated the impact of a β -arrestin deficiency on platelet activation mediated by adhesion receptors. As compared to the WT, the ability of β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} platelets to adhere to von Willebrand factor or collagen and undergo shape change, which reflects activation of the cells, was unchanged (data not shown). In contrast, following adhesion to fibrinogen, the proportion of β -arr1^{-/-} but not β -arr2^{-/-} platelets extending filopodia was reduced by 37 \pm 5% (n = 3, p < 0.0001) (► Fig. 3A, B), while the number of adherent cells remained unaltered (data not shown). As these experiments were performed in the presence of ADP and TxA₂ blockers, this would suggest abnormal cytoskeletal reorganisation through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, the main platelet receptor for fibrinogen.

β -arr1 functions downstream of Src family kinases and regulates Akt phosphorylation mediated by $\alpha_{IIb}\beta_3$

Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ signalling has been reported to be initiated by Src family kinases such as c-Src and Fyn (9). To explore whether β -arr1 is a target of Src kinases, washed platelets were preincubated with PP1 and PP2, two pan-inhibitors of this family of proteins, prior to adhesion to fibrinogen. As shown in ► Figure 3B, PP1 reduced the proportion of WT (31 \pm 6%) and β -arr1^{-/-} (25 \pm 5%) platelets extending filopodia to a similar extent (n = 3, p = 0.44). Similar results were obtained with PP2 (30 \pm 4% of WT platelets with filopodia versus 33 \pm 3% in mutants, n = 4, p = 0.50), suggesting that β -arr1 is located downstream of Src kinases in $\alpha_{IIb}\beta_3$ signalling. Src kinases have been proposed to modulate various signalling events including Ca²⁺ mobilisation (9). Upon adhesion to fibrinogen, equivalent Ca²⁺ increases were observed in WT and mutant platelets, indicating that β -arr1 does not participate in this process (► Fig. 3C). In addition, β -arr1^{-/-} platelets exhibited normal fibrin clot retraction, another event in which $\alpha_{IIb}\beta_3$ and Src kinases play a

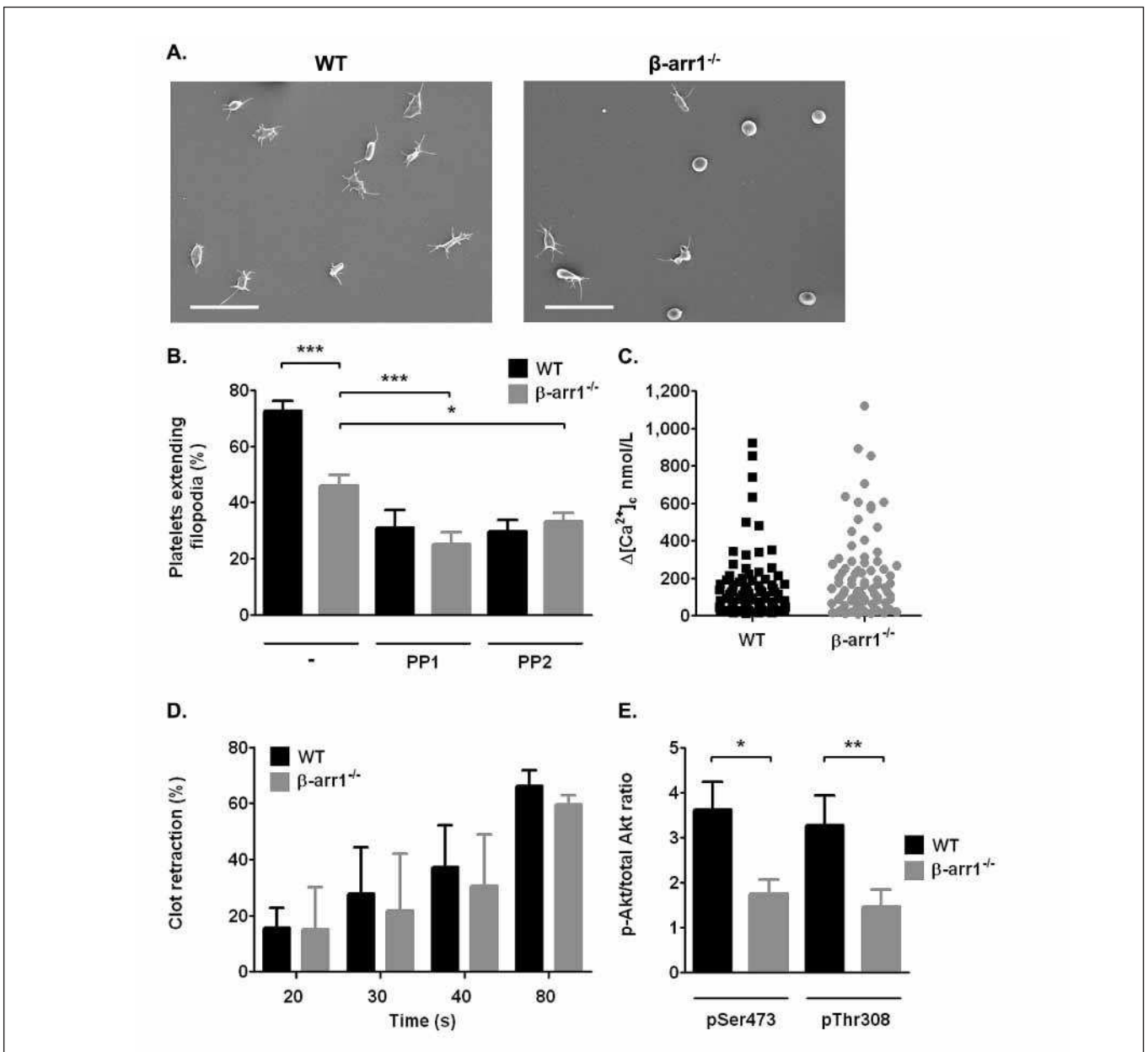


Figure 3: Role of β -arr1 in $\alpha_{IIb}\beta_3$ signalling. A, B) WT and β -arr1^{-/-} washed platelets were pretreated for 15 min with AR-C69931MX (10 μ M), MRS2179 (100 μ M) and indomethacin (100 μ M) alone or in the presence of PP1 or PP2 (10 μ M), and applied for 20 min to fibrinogen-coated (100 μ g/ml) coverslips. Adherent platelets were fixed and examined by SEM. Representative images of WT and β -arr1^{-/-} platelets are shown. Scale bars, 10 μ m (A). The adherent platelets were also stained with TRITC-phalloidin and the mean percentage of cells with filopodial extensions was determined by epifluorescence microscopy in eight random fields in at least three independent experiments (B). C) WT and β -arr1^{-/-} washed platelets loaded with Ca²⁺ and morphological dyes were allowed to adhere to fibrinogen-coated (100 μ g/ml) coverslips as in A, B. Changes in fluorescence were monitored for 20 min by confocal microscopy, and cytosolic Ca²⁺ concentrations were determined. The dot plot dis-

tribution of the relative maximal increase in individual adherent platelets is shown. D) Citrated platelet-rich plasma from WT and β -arr1^{-/-} mice was added to quartz cuvettes maintained at 37°C in the presence of 20 mM CaCl₂ and clot retraction, visible as a consolidated morphology and transparent clot liquor, was photographed every 5 min for 80 min. Bars represent the mean percentage reduction of the initial clot surface area at different time points, determined by two-dimensional image analysis. E, WT and β -arr1^{-/-} washed platelets were allowed to adhere to fibrinogen as in A, B, lysed, centrifuged and the supernatants were resolved by SDS-PAGE followed by Western blotting. Bars represent the relative ratio of phosphorylated to total Akt, calculated by densitometry analysis. Data represent the mean \pm SEM of three or four independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.0001.

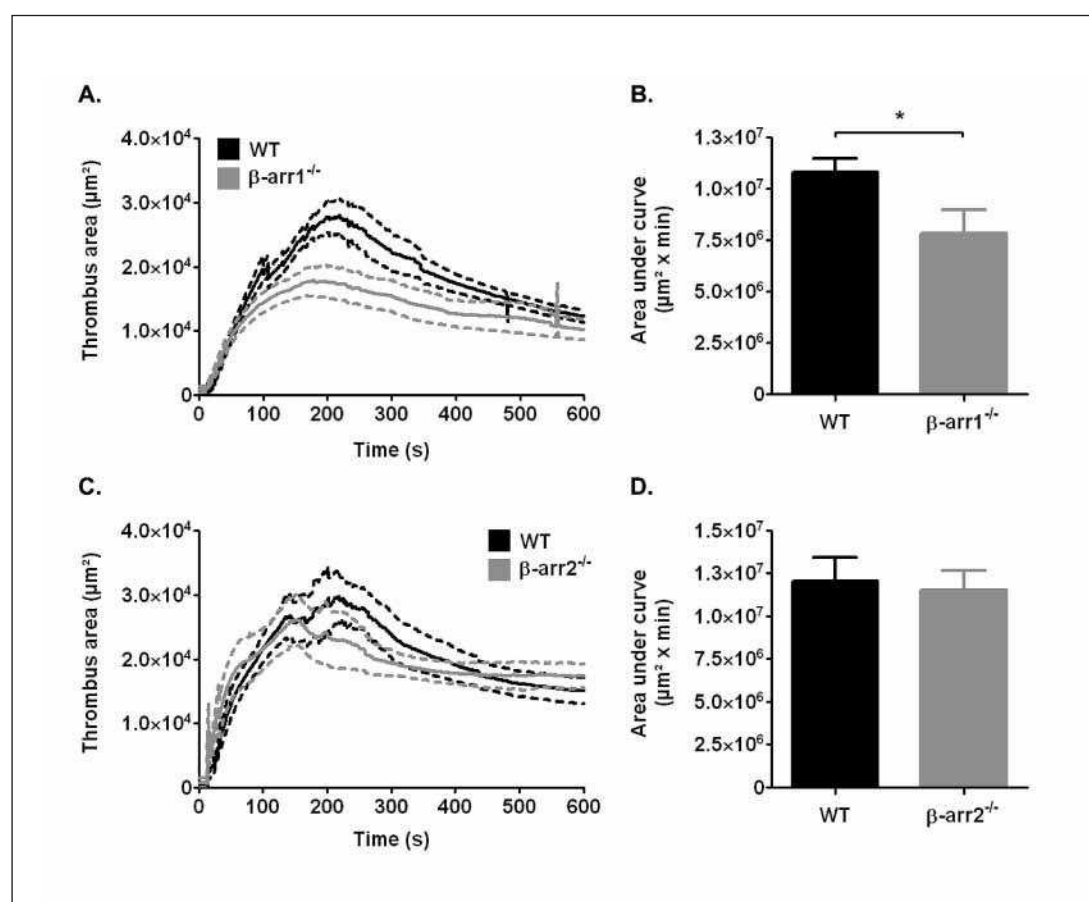


Figure 4: β -arr1^{-/-} but not β -arr2^{-/-} mice exhibit a decreased thrombotic response after laser injury of the mesenteric artery. A localised deep injury of an exposed mesenteric arteriole of WT, β -arr1^{-/-} (A, B) and β -arr2^{-/-} (C, D) mice was generated with a high intensity 440-nm-pulsed nitrogen dye laser applied for 30 s, and thrombus formation was monitored by fluorescence microscopy (26). A, C) Time-course of the thrombus growth, represented by its mean surface area. Dotted curves represent the SEM. B, D) Bar graphs represent the area under the curves shown in A and C, respectively. Data are from 12 vessels in five mice (A, B), three vessels in three β -arr2^{-/-} mice or five vessels in three WT mice (C, D). *p < 0.05.

critical role (► Fig. 3D). The downstream effectors of Src kinases also include Akt (10, 11), which has been proposed to be targeted by β -arr1 in various cellular systems (1, 16, 29). To determine whether β -arr1 participates in $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ signalling by regulating Akt, WT and β -arr1^{-/-} washed platelets were allowed to adhere to fibrinogen for 20 min and then lysed, and the level of Akt phosphorylation was measured by Western blotting. Interestingly, β -arr1^{-/-} platelets presented a decrease of $52 \pm 9\%$ ($n = 4$, $p < 0.05$) and $56 \pm 12\%$ ($n = 4$, $p < 0.01$) in the phosphorylation of Ser473 and Thr308, respectively (► Fig. 3E). Overall, these results suggested that upon binding of fibrinogen to $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, β -arr1 regulates filopodia emission through a process involving Src kinases and increased Akt phosphorylation.

β -arr1^{-/-} but not β -arr2^{-/-} mice are protected in two models of arterial thrombosis

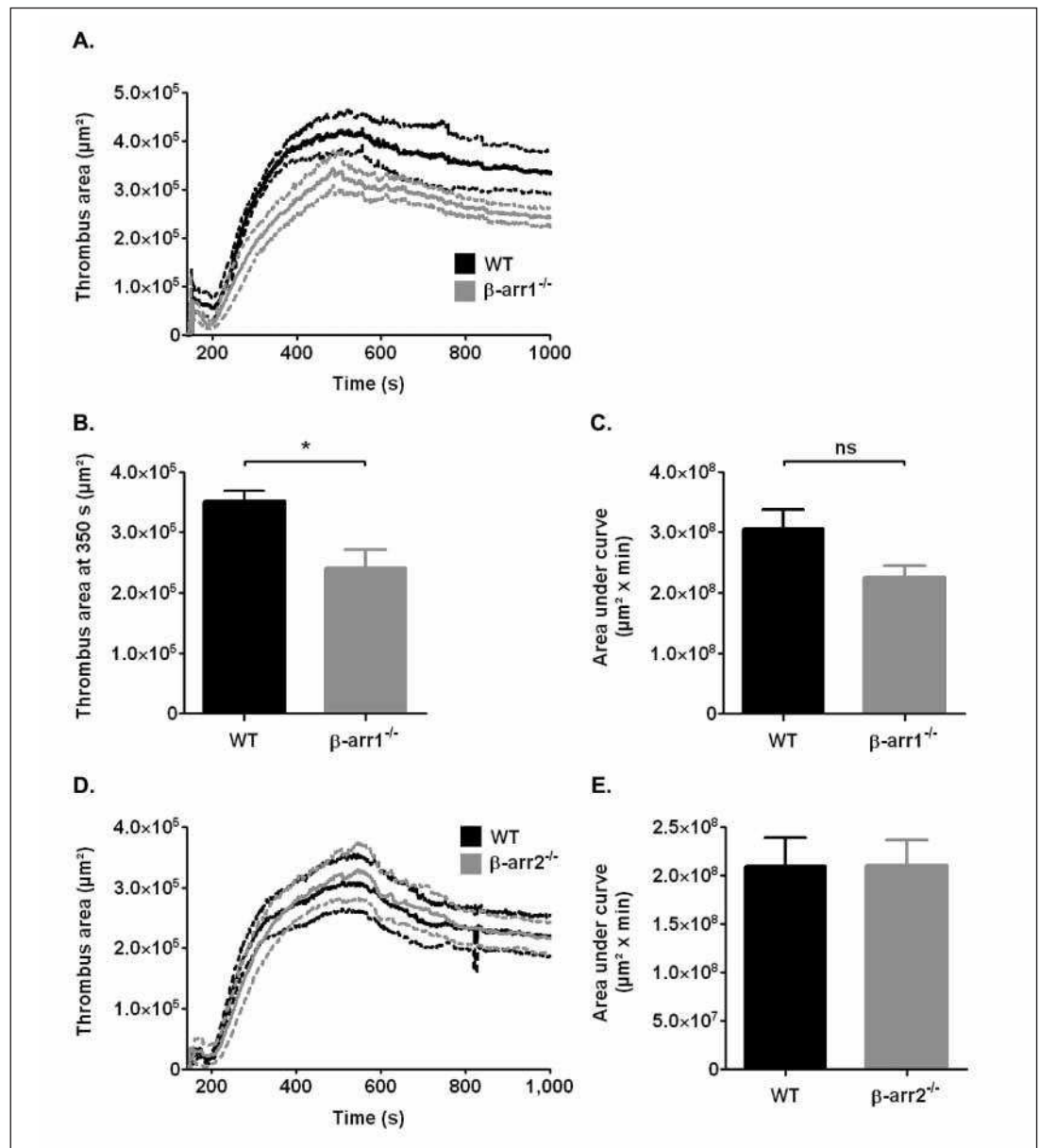
The role of β -arr1 and β -arr2 in arterial thrombosis was investigated using two *in vivo* models. When mesenteric arterioles were injured with a laser beam, a deficiency in β -arr1 led to a $28 \pm 10\%$ ($n = 12$ vessels in five mice, $p < 0.05$) reduction in total thrombus surface area as compared to the WT (► Fig. 4A, B). This result is in

agreement with a recent study revealing that β -arr1^{-/-} mice are less sensitive to FeCl_3 -induced carotid thrombosis (16). Using a similar model, we observed a delay in thrombus growth with a thrombus area which was significantly reduced at early (350 s: $32 \pm 9\%$ reduction, $n = 6$, $p < 0.05$) but not later times (>480 s) (► Fig. 5A-C). In contrast, thrombus formation was comparable between WT and β -arr2 knock-outs (► Figs. 4C and D, 5D and E), pointing to a modest role of β -arr1 and no role of β -arr2 in this process.

β -arr1-deficient mice exhibit normal tail bleeding

To establish whether the decreased thrombosis observed in β -arr1-deficient mice is mirrored by defective haemostasis, standardised tail-bleeding experiments were performed. The bleeding time was equivalent in β -arr1-null (149 ± 33 s, $n = 12$) and WT (137 ± 26 s, $n = 12$) mice (► Fig. 6A), as were the number of re-bleeds (► Fig. 6B) and total bleeding time (► Fig. 6C) over 30 min. Despite an increased blood loss in a few mutant mice, the mean volume was not significantly different in WT (► Fig. 6D). The bleeding phenotype was also unaltered in β -arr2^{-/-} mice (► Fig. 6A-D). Overall, these results suggested a minor contribution of β -arr1 and β -arr2 to primary haemostasis.

Figure 5: β -arr1^{-/-} but not β -arr2^{-/-} mice exhibit a delayed thrombotic response after FeCl₃ injury of the carotid artery. A 75 mg/ml FeCl₃ solution was applied for 2 min to the exposed carotid artery of WT, β -arr1^{-/-} (A-C) and β -arr2^{-/-} (D, E) mice, and thrombus growth was recorded by video microscopy (27). A, D) Time-course of the thrombus growth, represented by its mean surface area. Dotted curves represent the SEM. B) Mean thrombus area after 350 s in WT and β -arr1^{-/-} mice. C, E) Bar graphs represent the area under the curves shown in A and D, respectively. Data are from six (A-C) or seven (D, E) mice. * $p < 0.05$.



Discussion

In the present study, we addressed the question of the role of β -arrestins in platelet functions. Neither β -arr1 nor β -arr2 appeared to critically regulate inside-out signals induced by a wide range of agonists. We also provide evidence that P2Y₁ receptor desensitisation and platelet refractoriness to ADP still occur in β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} platelets. Two *in vivo* models supported a modest role of β -arr1 and no role of β -arr2 in arterial thrombosis. The lack of β -arr1 or β -arr2 expression was not critical for haemostasis since the tail bleeding phenotype was unchanged. Our results identified a novel function for β -arr1 through the regulation of integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ signalling. Upon fibrinogen binding to $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, β -arr1 participates in cytoskeletal reorganisation leading to filopodia extension

by a process involving Src kinases and probably upregulation of Akt activity.

In agreement with our previous studies (3, 4), we observed that mouse platelets activated by ADP were unable to fully re-aggregate in response to a second challenge, as a result of P2Y₁ but not P2Y₁₂ receptor desensitisation. Most of GPCRs desensitise through phosphorylation by GPCR kinases (GRKs), which promotes β -arrestin recruitment thereby precluding G protein coupling and ultimately leading to receptor internalisation (1). Although β -arr1 and β -arr2 were reported to interact with activated P2Y₁ in transfected HEK-293 cells (6, 7), our study shows that the deficiency in either of these proteins did not prevent platelet P2Y₁ desensitisation, as judged by the absence of re-aggregation and Ca²⁺ elevation in response to a second ADP challenge. However, one cannot exclude a

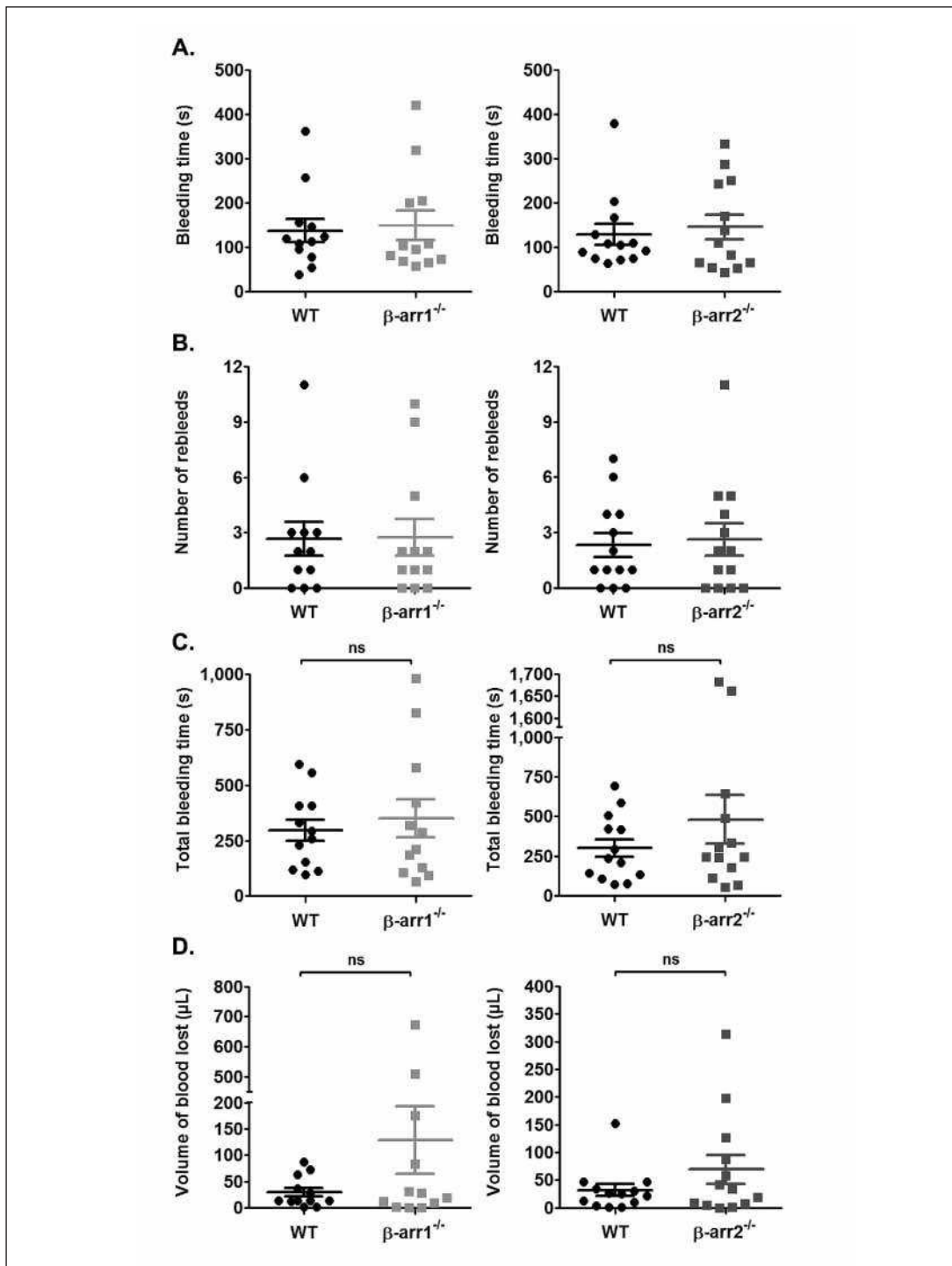


Figure 6: β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} mice present normal tail bleeding. A 3-mm segment from the distal tail of 8- to 10-week-old WT, β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} mice was amputated and the time required for initial arrest of bleeding was measured (A). The rebleeding occurrences (B), total bleeding time (C) and volume of blood lost (D) were then recorded over a 30-min period. Symbols represent individual mice (n = 12 or 13) and the mean \pm SEM is indicated with horizontal bars.

compensatory mechanism between the two isoforms. This hypothesis is supported by the fact that in mouse embryonic fibroblasts ablation of both β -arr1 and β -arr2 was required to inhibit desensitisation of the angiotensin II type 1A receptor (30). Since double β -arr1/ β -arr2 deficiency is embryonically lethal, tissue-specific knock-outs would be needed to definitely resolve this question. Alternatively, P2Y₁ phosphorylation on its own may be sufficient to induce desensitisation without any need for a β -arres-

tin. Such a mechanism has been proposed in transfected 1321N1 cells in which P2Y₁ phosphorylation and internalisation did not require GRKs but protein kinase C (5, 8). Concerning P2Y₁₂, we previously demonstrated that even though it was rapidly and transiently internalised upon stimulation, no functional desensitisation was objectivated (3, 4). In agreement with these observations, the present study did not highlight a functional desensitisation of P2Y₁₂ in mouse platelets. These results suggested that

β -arrestins are not key players of P2Y₁₂ desensitisation. However, recent identification of a patient carrying a mutation in P2Y₁₂ gene suggested that β -arrestins may bind a 4-amino acid motif at the extreme C-terminus of P2Y₁₂, thereby promoting its internalisation and subsequent recycling (31).

Arrestins also act as adaptors, allowing for the assembly of multi-protein complexes which transduce the signals of a variety of receptors in many cell types (1). We provided evidence that β -arr1 and β -arr2 were not critical for the activation of platelets by a large series of agonists including ADP. This is in accordance with a recent report by Li et al. (16) showing normal ADP-induced Akt phosphorylation in β -arr1^{-/-} platelets. These results appear surprising since β -arr1 and β -arr2 were proposed to bind and potentially regulate both P2Y₁ and P2Y₁₂ (6–8), which are indispensable for normal platelet response to ADP (2). As suggested above, a functional redundancy between β -arr1 and β -arr2 may help maintain normal P2Y receptor function in the knock-out platelets. According to Li et al. (16), β -arr1 modulates PAR4 signalling, as evidenced by a decrease in Alexa Fluor 488-labelled fibrinogen binding upon stimulation of β -arr1^{-/-} platelets with 50 to 100 μ M of the selective agonist AYPGKF. Using three different assays, we observed no defect in β -arr1^{-/-} platelet activation in response to the lowest concentrations of AYPGKF sustaining maximal effect. However, when stimulated with a subthreshold concentration (300 μ M), β -arr1^{-/-} platelets exhibited a slight delay in aggregation relative to control. Lower doses, as those used by Li et al. (16), could not be tested since they induced no functional response in any of the assays we utilised. The reason for this is unclear, but is probably related to differences in the platelet washing procedure causing various levels of sensitivity to agonists. Overall, our results are in agreement with those of Li et al. (16), suggesting that β -arr1 participates in PAR4 signalling, but its role could be limited since the defect was restricted to stimulations with low concentrations of the agonist.

Besides GPCRs, β -arrestins bind to other classes of surface receptors specifically single-membrane-spanning receptors for transforming growth factor- β , insulin-like growth factor 1 and low density lipoprotein (1). We propose a novel function of β -arr1 as a positive regulator of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ outside-in signalling, as indicated by decreased filopodia emission and Akt phosphorylation in β -arr1^{-/-} platelets adhering to fibrinogen. This is in agreement with the role of Akt in regulating cytoskeletal reorganisation which has been revealed in Akt-1-deficient mice (32). Whether β -arr1 and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ physically interact is unknown. β -arr1 directly binds to specific phosphorylated serine and threonine residues of agonist-occupied GPCRs, thereby competing with G proteins (1). Since the β_3 integrin subunit has been shown to bind the G protein α_{13} subtype (33), a similar mechanism might occur for $\alpha_{IIb}\beta_3$. However, our studies on platelet lysates using various types of detergents failed to co-precipitate β -arr1 and β_3 (data not shown). Alternatively, since we provided evidence that β -arr1 is located downstream of Src family kinases, which are known to constitutively bind the cytoplasmic tail of β_3 and initiate signal transduction (9), one may speculate that Src kinases recruit β -arr1 to the vicinity of $\alpha_{IIb}\beta_3$. β -arr1 would in turn facilitate the formation of a signalling

What is known about this topic?

- β -arrestin-1 (β -arr1) and β -arrestin-2 (β -arr2) are important regulators of G protein-coupled receptors desensitisation and signalling.
- P2Y₁, a G protein-coupled ADP receptor known to desensitise, can interact with both β -arr1 and β -arr2.
- A contribution of β -arr1 in PAR4-mediated platelet activation and in arterial thrombosis was recently revealed.

What does this paper add?

- β -arr1 and β -arr2 do not regulate agonist-induced platelet activation or P2Y receptors desensitisation.
- β -arr1^{-/-} but not β -arr2^{-/-} mice are less sensitive to FeCl₃- and laser-induced thrombosis but exhibit normal tail bleeding.
- β -arr1 plays a role in integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated filopodia extension by a process involving Src family kinases and probably Akt.

complex leading to Akt phosphorylation and its subsequent activation. This is supported by the fact that Src kinases and β -arr1 have been reported to associate downstream of PAR1 and PAR4, resulting in increased PI3K activity and Akt phosphorylation (16, 29). Although $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated activation of Akt is known to depend upon phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate generated by PI3K (11), whether β -arr1 also regulates PI3K function downstream of $\alpha_{IIb}\beta_3$ remains to be established. Recently, the small GTPase Cdc42 was proposed to participate in Akt phosphorylation and $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent filopodia formation in mouse platelets, suggesting that it could be involved in β -arr1-mediated responses (34).

Whether the modest decrease in thrombus formation in β -arr1^{-/-} mice could arise from reduced signalling through $\alpha_{IIb}\beta_3$ is still speculative at this point. However, there are precedents for diminished thrombosis in relation with abnormal $\alpha_{IIb}\beta_3$ outside-in signalling, notably DiYF mice, which have a mutation on Tyr747/Tyr759 of β_3 (12, 13). In addition, two mouse strains lacking either tetraspanin TSSC6 or the adaptor Lnk and exhibiting defective signalling through $\alpha_{IIb}\beta_3$ have also been described to be protected against experimental thrombosis (14, 15). Interestingly, while β -arr1 deficiency had no impact on the bleeding phenotype, DiYF, TSSC6^{-/-} as well as Lnk^{-/-} mice displayed a pronounced tendency to rebleed. One notable difference which could explain these differences is that clot retraction, which is important for thrombus stabilisation, occurred normally in β -arr1^{-/-} mice while it was delayed and less effective in DiYF, TSSC6^{-/-} and Lnk^{-/-} mice.

In conclusion, despite their well-recognised role in GPCR regulation, β -arr1 and β -arr2 were not critical in agonist-induced platelet activation and P2Y receptors desensitisation. Studies of mice genetically ablated for β -arr1 support a modest role of this protein in promoting thrombosis, at least in part through its participation in platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ signalling, while not affecting haemostasis. Given the ubiquitous expression of β -arrestins and integrins, it would be interesting to determine whether β -arrestins regulate integrin function in other cell types.

Acknowledgements

The authors would like to thank Anita Eckly, Jean-Yves Rinckel and Dominique Cassel for technical assistance, Monique Freund, Catherine Ziessel and Pascal Michel for animal care, and Juliette Mulvihill for reviewing the English of the manuscript. This work was supported by ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique). Mathieu Schaff was supported by a "Bourse Grenelle" from the French government.

Conflicts of interest

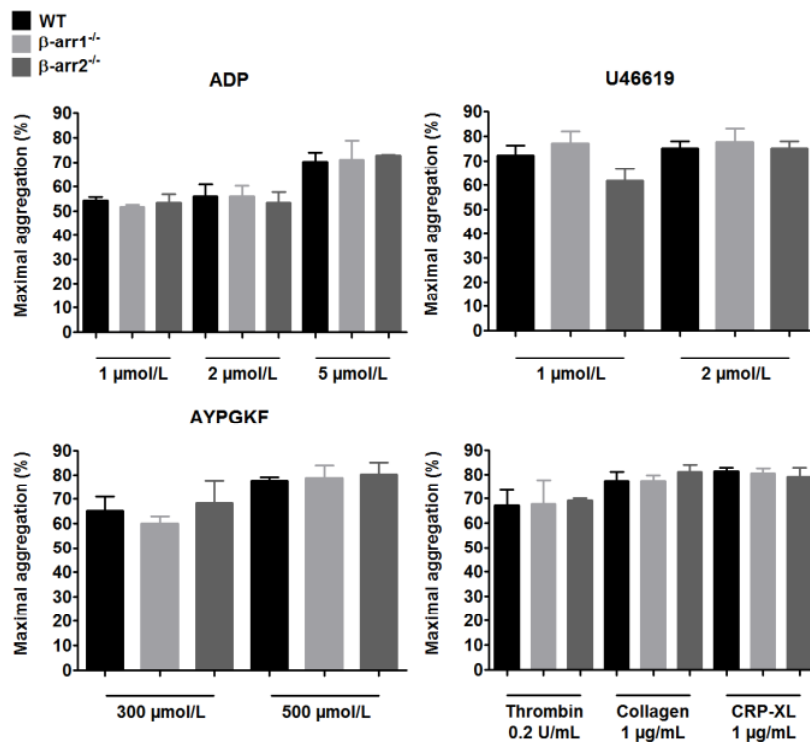
None declared.

References

- DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, et al. Beta-arrestins and cell signaling. *Ann Rev Physiol* 2007; 69: 483–510.
- Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost* 2008; 99: 466–472.
- Baurand A, Eckly A, Bari N, et al. Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors. *Thromb Haemost* 2000; 84: 484–491.
- Baurand A, Eckly A, Hechler B, et al. Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties? *Mol Pharmacol* 2005; 67: 721–733.
- Hardy AR, Conley PB, Luo J, et al. P2Y1 and P2Y12 receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms. *Blood* 2005; 105: 3552–3560.
- Hoffmann C, Ziegler N, Reiner S, et al. Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem* 2008; 283: 30933–30941.
- Reiner S, Ziegler N, Leon C, et al. beta-Arrestin-2 interaction and internalization of the human P2Y1 receptor are dependent on C-terminal phosphorylation sites. *Mol Pharmacol* 2009; 76: 1162–1171.
- Mundell SJ, Luo J, Benovic JL, et al. Distinct clathrin-coated pits sort different G protein-coupled receptor cargo. *Traffic* 2006; 7: 1420–1431.
- Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, et al. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1752–1762.
- Woulfe DS. Akt signaling in platelets and thrombosis. *Expert Rev Hematol* 2010; 3: 81–91.
- Banfic H, Downes CP, Rittenhouse SE. Biphasic activation of PKB/alpha/Akt in platelets. Evidence for stimulation both by phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate, produced via a novel pathway, and by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; 273: 11630–11637.
- Valiyaveetil M, Feng W, Mahabaleswar G, et al. Phosphorylation of platelet alphaIIb beta3 is crucial for arterial thrombosis in vivo and microparticle generation. Abstracts from American Heart Association Scientific Sessions Orlando 2007 Nov 4–7; *Circulation* 2007; 116: IL_75: Abstract 450.
- Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, et al. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function. *Nature* 1999; 401: 808–811.
- Goschnick MW, Lau LM, Wee JL, et al. Impaired „outside-in“ integrin alphaIIb beta3 signaling and thrombus stability in TSSC6-deficient mice. *Blood* 2006; 108: 1911–1918.
- Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, et al. Lnk regulates integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo. *J Clin Invest* 2010; 120: 179–190.
- Li D, D'Angelo L, Chavez M, et al. Arrestin-2 differentially regulates PAR4 and ADP receptor signaling in platelets. *J Biol Chem* 2011; 286: 3805–3814.
- Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, et al. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol* 2004; 272: 13–28.
- Conner DA, Mathier MA, Mortensen RM, et al. beta-Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circulation Res* 1997; 81: 1021–1026.
- Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, et al. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 1999; 286: 2495–2498.
- Schaff M, Receveur N, Bourdon C, et al. Novel function of tenascin-C, a matrix protein relevant to atherosclerosis, in platelet recruitment and activation under flow. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 117–124.
- Barragan P, Paganelli F, Camoin-Jau L, et al. Validation of a novel ELISA-based VASP whole blood assay to measure P2Y12-ADP receptor activity. *Thromb Haemost* 2010; 104: 410–411.
- Boulay-Moine D, Bourguet N, Miet S, et al. Evaluation of platelet agonists and antagonists by a novel ELISA-based VASP assay and compatibility with whole blood samples from several animal species. Poster presentation at the XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Kyoto 2011 Jul 23–28; Poster P-MO-050.
- Mangin P, Yuan Y, Goncalves I, et al. Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA. *J Biol Chem* 2003; 278: 32880–32891.
- Hechler B, Leon C, Vial C, et al. The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 1998; 92: 152–159.
- Mangin P, David T, Lavaud V, et al. Identification of a novel 14–3–3zeta binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ib alpha. *Blood* 2004; 104: 420–427.
- Hechler B, Nonne C, Eckly A, et al. Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 173–184.
- Eckly A, Hechler B, Freund M, et al. Mechanisms underlying FeCl(3) -induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 779–789.
- Eckly A, Gendraul JL, Hechler B, et al. Differential involvement of the P2Y1 and P2YT receptors in the morphological changes of platelet aggregation. *Thromb Haemost* 2001; 85: 694–701.
- Goel R, Phillips-Mason PJ, Raben DM, et al. alpha-Thrombin induces rapid and sustained Akt phosphorylation by beta-arrestin1-dependent and -independent mechanisms, and only the sustained Akt phosphorylation is essential for G1 phase progression. *J Biol Chem* 2002; 277: 18640–18648.
- Kohout TA, Lin FS, Perry SJ, et al. beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1601–1606.
- Nisar S, Daly ME, Federici AB, et al. An intact PDZ motif is essential for correct P2Y12 purinoceptor traffic in human platelets. *Blood* 2011; 118: 5641–5651.
- Chen J, De S, Damron DS, et al. Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice. *Blood* 2004; 104: 1703–1710.
- Gong H, Shen B, Flevaris P, et al. G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphaIIb beta3 and mediates integrin „outside-in“ signaling. *Science* 2010; 327: 340–343.
- Akbar H, Shang X, Perveen R, et al. Gene targeting implicates Cdc42 GTPase in GPVI and non-GPVI mediated platelet filopodia formation, secretion and aggregation. *PLoS One* 2011; 6: e22117.

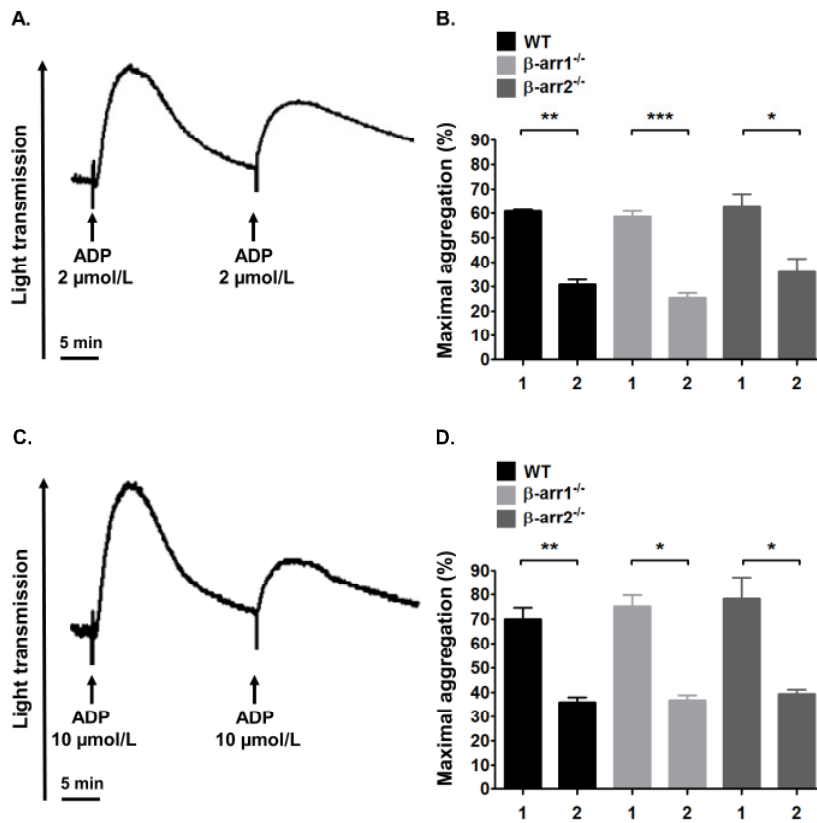
Supplementary Figures to Schaff et al. “ β -arrestin-1 participates in thrombosis and regulates integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ signalling without affecting P2Y receptors desensitisation and function” (Thromb Haemost 2012; 107.4)

Figure S1



Suppl. Figure 1: Role of β -arr1 and β -arr2 in platelet aggregation. Washed platelets (2×10^8 /mL) from WT, β -arr1^{-/-} and β -arr2^{-/-} mice were aggregated by various concentrations of the indicated agonists, as in Figure 1A. Bars represent the maximal amplitude of aggregation, determined 3 min after agonist addition. Data are the mean \pm SEM from 3 separate experiments.

Figure S2



Suppl. Figure 2: Role of $\beta\text{-arr1}$ and $\beta\text{-arr2}$ in P2Y receptors desensitization. A, C) WT platelets ($2 \times 10^8/\text{mL}$) were aggregated by 2 or 10 $\mu\text{mol/L}$ ADP in the presence of 64 $\mu\text{g/mL}$ fibrinogen, followed by a second challenge with ADP (2 or 10 $\mu\text{mol/L}$) after 20 min. The profiles are representative of 3 independent experiments. B, D) Washed platelets ($2 \times 10^8/\text{mL}$) from WT, $\beta\text{-arr1}^{-/-}$ and $\beta\text{-arr2}^{-/-}$ mice were aggregated as in A and C, respectively. Bars represent the maximal amplitude of aggregation after the initial (1) and second (2) stimulations. Data are the mean \pm SEM from 3 separate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.0001$.

Conclusion

Nos résultats montrent que la délétion de β -arr1 ou β -arr2 n'affecte pas la désensibilisation des récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂. De plus, les plaquettes mutantes s'activent normalement en réponse aux agonistes classiques, indiquant que les β -arrestines ne jouent pas de rôle critique dans ce processus. En revanche, les plaquettes déficientes en β -arr1 émettent significativement moins de filopodes que les sauvages après adhérence sur fibrinogène, révélant un défaut dans la réorganisation du cytosquelette initiée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. L'évaluation de différents marqueurs de la signalisation de cette intégrine nous a permis de montrer que β -arr1 intervient en aval de Src kinases, et en augmentant le niveau de phosphorylation d'Akt, une kinase connue pour participer à l'activation plaquettaire (**Woulfe, 2010**). Par rapport aux souris sauvages, celles déficientes en β -arr1 présentent une légère diminution de la thrombose artérielle après lésion par le FeCl₃ ou par un tir laser, alors qu'aucun défaut n'est observé en l'absence de β -arr2. Quelle que soit la lignée, le temps de saignement et le volume de sang perdu après section de la queue restent inchangés, indiquant l'absence de répercussion sur l'hémostase. Ces données confirment les récents travaux de Li *et al.* montrant un rôle de β -arr1 en thrombose (**Li et al., 2011**), et mettent en évidence que cette protéine régule la signalisation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. D'un point de vue pharmacologique, notre étude suggère que le ciblage de β -arr1 ou β -arr2 ne serait pas une stratégie anti-thrombotique efficace.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Suite à une lésion vasculaire, l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes permettent l'arrêt du saignement mais peuvent également conduire à la thrombose artérielle sur plaque d'athérosclérose, aujourd'hui première cause de morbidité et de mortalité dans le monde (OMS, 2011). Les antiplaquettaires actuels, dirigés contre l'activation et l'agrégation, ont une efficacité reconnue et ont permis de réduire considérablement la mortalité d'origine ischémique. Cependant, ces médicaments ont pour inconvénient d'augmenter le risque de saignement, ce qui compromet leur utilisation, particulièrement chez les patients victimes d'ischémie cérébrale ou subissant une revascularisation chirurgicale par pontage ou endartériectomie (Fabre and Gurney, 2010; Yousuf and Bhatt, 2011). Des données récentes suggèrent que l'inhibition de l'adhérence des plaquettes au sous-endothélium (Diener et al., 2009; Ulrichs et al., 2011; Zahid et al., 2012) ou de certaines protéines des voies de signalisation intra-plaquettaires (Konopatskaya et al., 2009; Martin et al., 2010; Nagy et al., 2009; Woulfe et al., 2004), permettrait de prévenir la thrombose tout en préservant l'hémostase. Dans cette optique, l'objectif de cette thèse a été d'évaluer la pertinence du ciblage d'un récepteur d'adhérence, l'intégrine $\alpha_6\beta_1$, et des protéines de signalisation β -arr1 et β -arr2. Nous avons également cherché à identifier de nouvelles protéines adhésives préférentiellement exprimées dans les plaques d'athérosclérose, dans l'hypothèse que l'inhibition de leur interaction avec les plaquettes pourrait représenter une stratégie particulièrement prometteuse.

Les trois principaux résultats de ce travail ont été la mise en évidence : (i) de propriétés adhésives prononcées pour les plaquettes des laminines vasculaires 411, 511 et 521, (ii) d'une contribution potentielle du principal récepteur de ces glycoprotéines, l'intégrine $\alpha_6\beta_1$, à la thrombose artérielle mais pas à l'hémostase, et (iii) d'un rôle de la TN-C, une glycoprotéine sélective des plaques d'athérosclérose, dans l'adhérence et l'activation des plaquettes. Ces propriétés de la TN-C sont d'autant plus remarquables que les douze autres protéines adhésives de plaque que nous avons testées ne présentaient aucune réactivité pour les plaquettes.

Les expériences de perfusion de sang sur une surface de TN-C, LN411, LN511 ou LN521 permettent d'élaborer un modèle commun, dans lequel ces glycoprotéines exposées au sang suite à une lésion vasculaire lient le FW plasmatique, permettant de capturer les

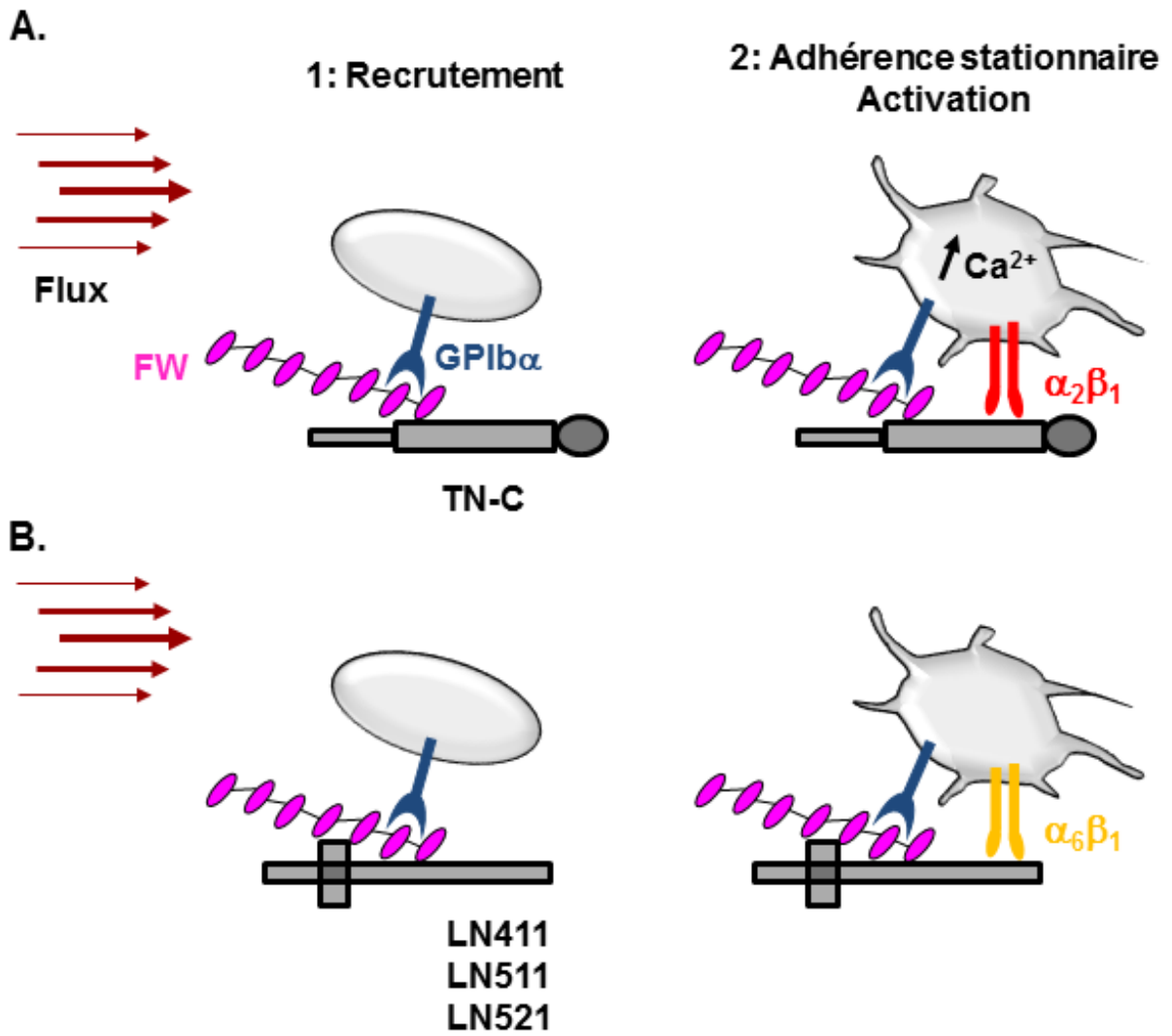


Figure 37 : Modèle putatif de l'adhérence des plaquettes sur TN-C (A), LN411, LN511 et LN521 (B).

plaquettes circulantes via la GPIb α (**Figure 37**). La stabilisation de l'adhérence repose sur l'association directe de la TN-C et des laminines avec une intégrine, respectivement $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$. Il s'agit de la première démonstration qu'une protéine matricielle autre que le collagène est capable de lier l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ sur les plaquettes. Enfin, les plaquettes adhérant sur TN-C et les laminines passent de la forme discoïde de repos à une morphologie sphérique, émettent des filopodes et présentent des oscillations calciques, traduisant leur activation. Il est remarquable d'observer qu'un mécanisme d'adhérence similaire, impliquant à la fois une intégrine et l'axe GPIb α /FW, a été décrit pour d'autres protéines adhésives comme la fibronectine (**Beumer et al., 1995**), le fibrinogène, la fibrine (**Endenburg et al., 1995; Hantgan et al., 1990**) et les collagènes I, III (**Savage et al., 1998**), IV (**Henrita van Zanten et al., 1996**) et VI (**Ross et al., 1995**). Ainsi, la GPIb α participe directement au recrutement des plaquettes par le FW (**Ruggeri, 1999**) et la TSP-1 (**Jurk et al., 2003**), et indirectement à leur adhérence sur de nombreuses autres protéines via le FW qui y est adsorbé. A ce stade, les régions du FW impliquées dans la liaison à la TN-C et aux laminines restent inconnues. Néanmoins, une première expérience a suggéré que le domaine A3 ne participerait pas à l'interaction avec les laminines (non montré).

Dans la perspective de développer des agents capables de prévenir la thrombose tout en préservant l'hémostase, ce travail a permis de dégager deux nouvelles pistes intéressantes basées sur le ciblage de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ ou de l'interaction plaquette/TN-C.

Une limite de la première étude est que les souris déficientes pour l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ ont été évaluées dans des modèles de thrombose sur vaisseaux sains ne présentant pas de lésions d'athérosclérose. Les souris sont naturellement résistantes à l'athérosclérose, en partie parce qu'à l'inverse de l'homme, elles ont des concentrations plasmatiques élevées de HDL (*High density lipoproteins*) et faibles de LDL (**Jawien et al., 2004**). En revanche, les souris invalidées pour le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE), qui est impliquée dans le catabolisme des lipoprotéines, sont connues pour développer des plaques fibro-lipidiques similaires aux plaques humaines (**Jawien et al., 2004**) et surexprimant notamment les LN511 et 521 (**Rauch et al., 2011**). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont révélé que des souris ApoE^{-/-} irradiées puis greffées avec de la moelle osseuse de souris $\alpha_6\beta_1$ ^{-/-} ne présentent pas d'inhibition de la thrombose après rupture d'une plaque par une aiguille ou des ultrasons (non montré). Ces données, qui demandent à être confirmées avec de plus gros effectifs, suggèrent

une contribution mineure des laminines à la thrombose sur plaque comparativement à d'autres protéines telles que les collagènes fibrillaires et le facteur tissulaire. Ainsi, cibler uniquement $\alpha_6\beta_1$ pourrait produire un effet anti-thrombotique limité ; cependant, l'efficacité d'une combinaison avec d'autres antiplaquettaires et/ou un anticoagulant reste indéterminée. Il est également nécessaire d'évaluer la réponse thrombotique des souris chimériques dans d'autres modèles de rupture de plaque, induite par exemple en comprimant une artère athéroscléreuse à l'aide d'une pince (**Reddick et al., 1998**).

Une autre question importante concerne l'effet d'un ciblage de l'interaction plaquette/TN-C sur la thrombose artérielle. Des premières expériences ont révélé que les souris déficientes en TN-C ne présentent de défauts ni dans le temps de saignement après section de la queue, ni dans la thrombose induite par un tir laser sur des artères saines (non montré). Ceci n'est pas inattendu au vu du très faible niveau d'expression de la TN-C dans les vaisseaux ne comportant pas de lésions d'athérosclérose (**Pedretti et al., 2010; Wallner et al., 1999**). Pour étudier le rôle de la TN-C dans la thrombose sur plaque, une approche consisterait à utiliser des souris doublement déficientes pour la TN-C et l'ApoE. Cependant, de récentes études ont montré que la délétion de la TN-C affecte le développement des plaques d'athérosclérose, qui sont plus étendues avec un contenu en lipides et en macrophages spumeux plus important (**Wang et al., 2007; Wang et al., 2012**). Ceci pourrait biaiser les conclusions quant au rôle de l'interaction plaquette/TN-C en thrombose, d'autant plus que l'absence de TN-C favoriserait aussi la dégradation de la fibrine initiée par le t-PA (**Brellier et al., 2011**). Une alternative consisterait à traiter des souris ApoE^{-/-} avec des agents inhibant l'interaction plaquette/TN-C, qui empêcheraient par exemple la liaison du FW plasmatique à la TN-C. Le développement de telles molécules est facilité par l'existence de nombreux peptides recombinants couvrant les principaux domaines de la TN-C (**Joshi et al., 1993; Prieto et al., 1992; Weber et al., 1995**) ou du FW (**Chen et al., 2012; Shahbazi et al., 2007**). Un ciblage par des anticorps est également envisageable, et pourrait dans un premier temps s'appuyer sur des anticorps anti-TN-C existants, dont certains sont actuellement testés en clinique en tant qu'agents anticancéreux (**Midwood and Orend, 2009; National Institutes of Health, 2012a; National Institutes of Health, 2012b**).

Malgré l'importance reconnue des β -arrestines dans la désensibilisation et la signalisation des RCPG en général (**DeWire et al., 2007**), la délétion de β -arr1 ou β -arr2

affecte modestement les fonctions plaquettaires et la thrombose artérielle. Une redondance fonctionnelle entre ces deux isoformes, qui présentent 78% d'homologie de séquence en acides aminés (**DeWire et al., 2007**), pourrait expliquer ces résultats. Les souris doublement déficientes pour β -arr1 et β -arr2 décédant au stade embryonnaire (**Schmid and Bohn, 2009**), seul le développement d'une souche n'exprimant pas ces protéines spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire permettrait de conclure définitivement. Au demeurant, nous montrons que β -arr1 participe à l'émission de filopodes déclenchée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, probablement en augmentant le niveau de phosphorylation d'Akt. Alors qu'un rôle de β -arr1 dans la régulation d'Akt a déjà été rapporté en aval de PAR-1 et -4 (**Goel et al., 2002; Li et al., 2011**), il s'agit de la première mise en évidence qu'une arrestine peut réguler la signalisation d'une intégrine. Les deux travaux précédents révèlent également que β -arr1 lie et stimule des PI3K, qui génèrent du phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃) permettant le recrutement d'Akt à la membrane, où ses résidus Thr³⁰⁸ et Ser⁴⁷³ sont phosphorylés par respectivement la PDK (*Phosphoinositide-dependent kinase*)-1 et la PDK-2 (**Goel et al., 2002; Li et al., 2011**). L'activation de PI3K par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est connue (**Gratacap et al., 2011; Watson et al., 2005**), mais un rôle de β -arr1 dans ce processus reste à démontrer. Contrairement aux observations dans certaines lignées cellulaires (**Hoffmann et al., 2008; Reiner et al., 2009**), β -arr1 et β -arr2 ne jouent pas de rôle critique dans la désensibilisation des récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ dans la plaquette. Ceci est en accord avec l'observation que la désensibilisation de P2Y₁ dans la lignée d'astrocytome 1321N1 n'implique pas les β -arrestines mais la phosphorylation du récepteur par une PKC (**Mundell et al., 2006**). A ce stade, le rôle des β -arrestines dans la désensibilisation d'autres récepteurs plaquettaires, notamment les PAR et les TP, reste indéterminé.

Au-delà de la sphère hémostatique, les plaquettes et la TN-C ont été décrites pour jouer un rôle dans la dissémination métastatique des cellules tumorales (**Bambace and Holmes, 2011; Midwood et al., 2011**). Il a été proposé que les plaquettes interagissent avec les métastases, empêchant leur reconnaissance et leur destruction par les lymphocytes T et les cellules NK (*Natural killer*), et favorisant leur arrêt aux sites d'invasion (**Bambace and Holmes, 2011**). Ceci est favorisé par le fait que les cellules métastatiques libèrent des activateurs plaquettaires comme l'ADP et le TxA₂, et s'entourent d'une MEC riche en protéines adhésives comme la fibrine (**Bambace and Holmes, 2011; Jain et al., 2007**). Cette

MEC renferme également de la TN-C, qui favorise la survie des métastases par un mécanisme faisant intervenir les voies NOTCH et WNT (*Wingless type*) (**Oskarsson et al., 2011**). De plus, la TN-C pourrait être un acteur clef du recrutement des plaquettes par les métastases. Cette hypothèse est supportée par de récentes observations de l'équipe du Dr. Gertraud Orend (INSERM U682, Strasbourg) montrant une co-localisation des plaquettes avec la TN-C à la surface de métastases de cancer mammaire de souris (non montré). Une évaluation plus précise de l'interaction plaquette/TN-C pourrait être obtenue en perfusant du sang anti-coagulé sur des cellules tumorales sécrétantes et déficientes ou non pour la TN-C. Il est intéressant d'observer que la dissémination métastatique est fortement entravée chez les souris invalidées pour la GPIIb/IIIa (**Jain et al., 2007**), la GPVI (**Jain et al., 2009**) ou l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Nierodzik et al., 1995; Trikha et al., 2002**), suggérant que des thérapies ciblant l'adhérence plaquettaire pourraient avoir une efficacité anticancéreuse. L'utilisation d'antiplaquettaires serait d'autant plus pertinente que certains cancers comme celui du pancréas, du poumon, du côlon ou encore les glioblastomes, augmentent le risque de thrombose artérielle, en partie parce qu'ils induisent une hyperréactivité plaquettaire et une dysfonction endothéliale (**Blann and Dunmore, 2011**).

ANNEXE

**Atherosclerotic Plaque Overexpressed Tenascin-C Efficiently Supports Platelet
Adhesion and Activation**

Mathieu Schaff^{1,2,3}, Jean-Pierre Cazenave^{1,2,3}, Christian Gachet^{1,2,3}, François Lanza^{1,2,3} and Pierre H. Mangin^{1,2,3}

¹INSERM U949, Strasbourg, F-67065, France; ²Université de Strasbourg, UMR-S949, Strasbourg, F-67081, France; ³Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), Strasbourg, F-67065, France

This Commentary is based on: Schaff M, Receveur N, Bourdon C, Wurtz V, Denis CV, Orend G, Gachet C, Lanza F, Mangin PH. 2011. Novel function of tenascin-C, a matrix protein relevant to atherosclerosis, in platelet recruitment and activation under flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(1):117-24.

Please address correspondence to:

Pierre Henri Mangin, Ph.D.

INSERM UMR-S949

Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace)

Université de Strasbourg

10, rue Spielmann, BP 36

67065 Strasbourg Cedex

France

Tel: +33 3 88 21 25 25

Fax: +33 3 88 21 25 21

Email: pierre.mangin@efs-alsace.fr

Available online at <http://www.athero.org/commentaries/comm1050.asp>

Background

Blood platelets play a critical role in hemostasis, the physiological process that results in the formation of a clot to avoid blood loss following vessel wall injury. Platelets are also key players in arterial thrombosis leading to ischemic diseases such as stroke or myocardial infarction, which are a leading cause of morbidity and mortality in Western countries (WHO: www.who.int). Increased attention has therefore been directed toward platelets as antithrombotic targets. Aspirin, thienopyridine P2Y₁₂ antagonists and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ blockers are the main clinically used antiplatelet agents and act by impeding platelet activation and aggregation [1]. These drugs decrease morbidity and mortality associated with atherothrombosis, but as they directly target the hemostatic function of platelets, their use is linked to an increased bleeding risk. Due to high rates of hemorrhagic complications, antagonists of $\alpha_{IIb}\beta_3$ are not appropriate for chronic use and restricted to acute conditions such as percutaneous coronary intervention [2]. The widely used anti-P2Y₁₂ clopidogrel significantly prolongs bleeding time, and the recently marketed third generation thienopyridine prasugrel, despite improved clinical benefit, also increases the risk of major bleeding relative to clopidogrel [2-4].

Rationale

The development of more selective antithrombotic drugs causing minimal perturbation of hemostasis could pave the way to safe and potentially more effective strategies in the prevention and treatment of ischemic events. This task is challenged by the fact that the main cellular and molecular events regulating thrombosis appear to be similar to those underlying hemostasis. Nevertheless, differences exist between these two processes notably in the nature of the vascular material exposed to platelets. Thrombosis occurs in advanced atherosclerotic arteries, presenting endothelial dysfunction and chronic inflammation of the intima leading to active tissue remodeling and progressive thickening and hardening of the vessel wall [5]. The so-called atheromatous plaques are very rich in highly platelet-reactive materials such as collagens and lipid derivatives. They also overexpress a number of matrix proteins that are essentially absent from the healthy vessel wall. Identification of plaque-selective and platelet-reactive proteins may provide interesting targets for safer strategies with a reduced bleeding risk. In this quest, tenascin-C (TN-C) appears to be an interesting candidate because (i) this large matrix glycoprotein is mostly found in atherosclerotic arteries [6], and (ii) it has been reported to exhibit cell-adhesive properties [7]. Remarkably, TN-C has been localized around the ruptured areas of advanced plaques, suggesting that it becomes exposed to circulating blood and platelets upon plaque rupture. The aim of our study was to explore whether TN-C supports platelet adhesion and activation under flow conditions.

Platelets efficiently adhere to immobilized TN-C under dynamic conditions

We used a flow-based assay in which glass microcapillaries coated with purified TN-C were perfused with human hirudin-anticoagulated blood at a constant flow rate using a programmable syringe pump. Various wall shear rates were applied precisely replicating those in healthy ($300\text{--}800\text{ s}^{-1}$), as well as stenosed ($>800\text{ s}^{-1}$) arteries [8]. TN-C was compared to other subendothelial proteins known to support platelet adhesion, namely von Willebrand factor (VWF) [9], fibrinogen [9], thrombospondin-1 [10], and laminin-411 [11]. Real-time differential interference contrast microscopy showed that, after 3 minutes of perfusion, platelet adhesion to TN-C exhibited a bell-shaped curve as a function of wall shear rate, with maximal adhesion at $1,000\text{ s}^{-1}$ ($49,790\pm 8,629$ platelets/ mm^2 , $n=7$) (Figure 1). Adhesion to VWF similarly increased up to $1,000\text{--}1,500\text{ s}^{-1}$ ($56,600\pm 2,307$ platelets/ mm^2 , $n=3$) but then plateaued until $3,000\text{ s}^{-1}$. By comparison, adhesion to fibrinogen, thrombospondin-1 and laminin-411 was less important ($< 15,000$ platelets/ mm^2) and inefficient at high shear rates.

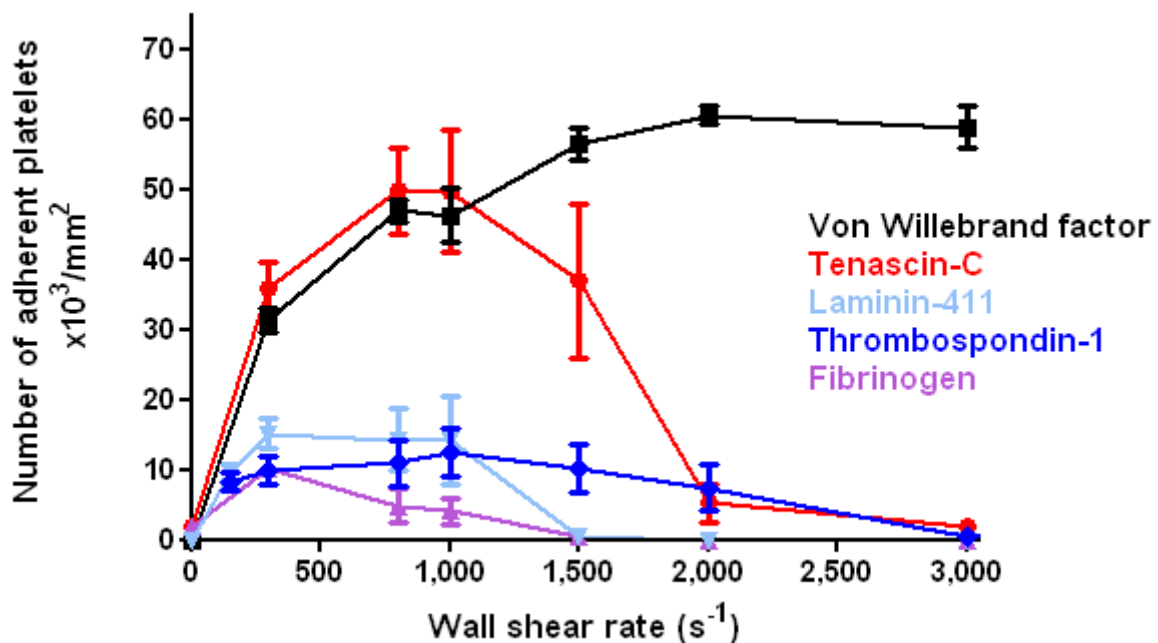


Figure 1. Human whole blood anticoagulated with hirudin was perfused at various wall shear rates through microcapillaries coated with saturating concentrations of the indicated purified proteins. The total number of adherent platelets was counted in 1 random field after 3 minutes of perfusion. Data are mean \pm SEM in 3 to 7 separate experiments.

The adhesive behavior was analyzed by time-lapse video-microscopy. Under conditions found in large arteries such as the coronary (300 s^{-1}), $87 \pm 4\%$ ($n=4$) of platelets attaching to TN-C remained stationary adherent, whereas a majority rolled over VWF ($79 \pm 2\%$, $n=4$), laminin-411 ($53 \pm 4\%$, $n=3$) and thrombospondin-1 ($44 \pm 9\%$, $n=3$), and most of them rapidly detached from fibrinogen ($83 \pm 3\%$, $n=4$) (Figure 2). Overall, these results revealed that TN-C efficiently supports platelet adhesion across a wide range of shear rates.

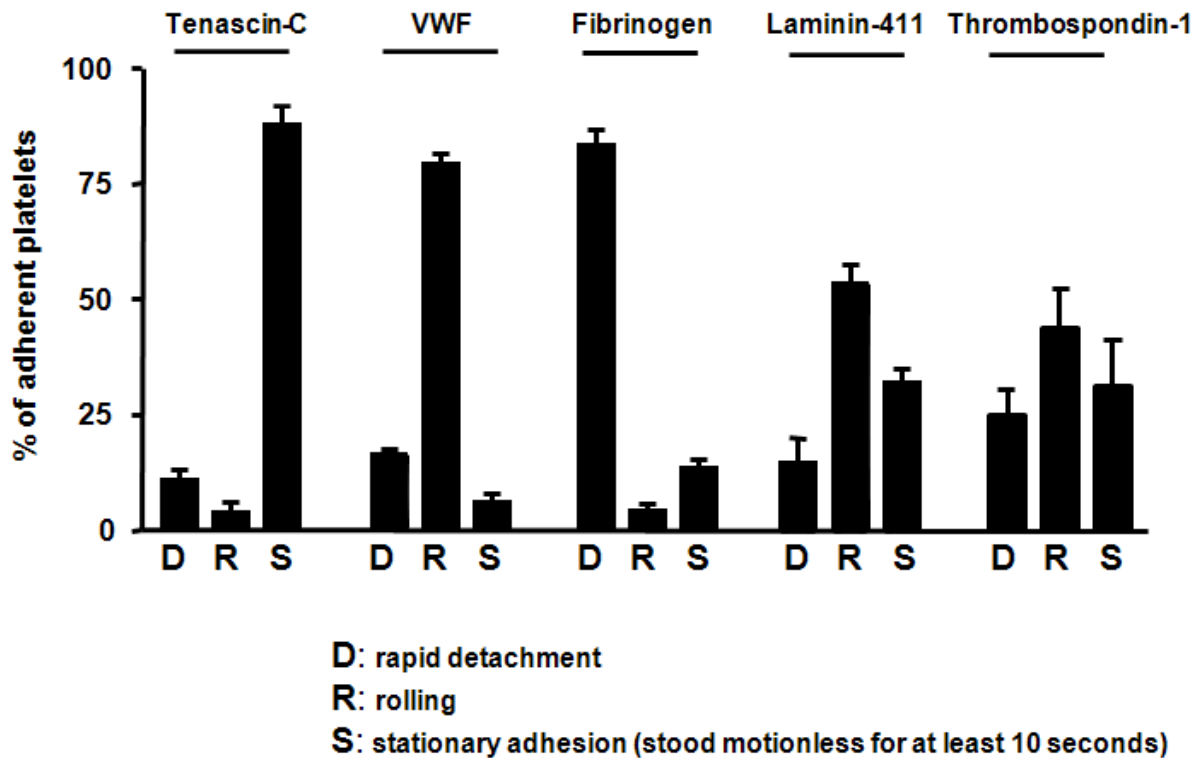


Figure 2. Human whole blood anticoagulated with hirudin was perfused at 300 s^{-1} through matrix protein-coated microcapillaries, and platelet adhesive behavior (detachment, rolling, stationary adhesion) was analyzed. Data are mean \pm SEM from 1 random field in 3 or 4 separate experiments.

Molecular mechanisms underlying platelet adhesion to TN-C

Using a panel of blocking monoclonal antibodies and blood from genetically-modified mice, we demonstrated critical requirement for integrin $\alpha_2\beta_1$, since its inhibition almost abrogated platelet adhesion under low (300 s^{-1}) and high ($1,500 \text{ s}^{-1}$) shears ($n=3$). This represents the first occurrence for a matrix protein other than collagen interacting with platelet $\alpha_2\beta_1$. Platelet/TN-C interaction also involves integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, as attested by a 40% inhibition ($n=4$, $P < 0.01$, paired t -test) using the selective antagonist abciximab. Interestingly, blocking the VWF binding site of the GPIb-IX complex reduced platelet adhesion by $64 \pm 10\%$ ($n=3$, $P < 0.05$) at 300 s^{-1} , and almost suppressed it at a higher shear of $1,500 \text{ s}^{-1}$. This raised the possibility that, similarly to what occurs on a collagen matrix, plasmatic VWF could serve as an intermediate platelet ligand. This hypothesis was further supported by (i) the

similar effect of an anti-VWF antibody preventing its binding to GPIb, and (ii) the demonstration that VWF and TN-C can directly interact using ELISA and immunoprecipitation experiments.

Adhesive properties of TN-C and VWF synergize in platelet adhesion

Our results indicated that plasmatic VWF participates in platelet adhesion to immobilized TN-C by associating with this protein. Because *in vivo*, VWF is also present in the intima of atherosclerotic arteries [12] that have been reported to exhibit high levels of TN-C [6], we wondered whether these proteins co-distributed. Using immunohistostaining, we observed co-localization of VWF and TN-C in the luminal region of mouse atherosclerotic plaques (Figure 3). To assess the potential functional importance of this close proximity, the adhesive properties of a combined TN-C/VWF matrix were explored. Using blood from VWF-deficient mice to prevent participation of plasmatic VWF, we observed that, under high flow, the number of platelets adhering to a mixed protein surface was markedly enhanced by 2.9 and 2.6 times relative to TN-C and VWF used alone, respectively (n=3, $P<0.001$). These results indicated that TN-C synergizes with VWF, raising the possibility that TN-C could act in combination with other platelet-reactive components of the vascular wall to promote excessive thrombus formation.

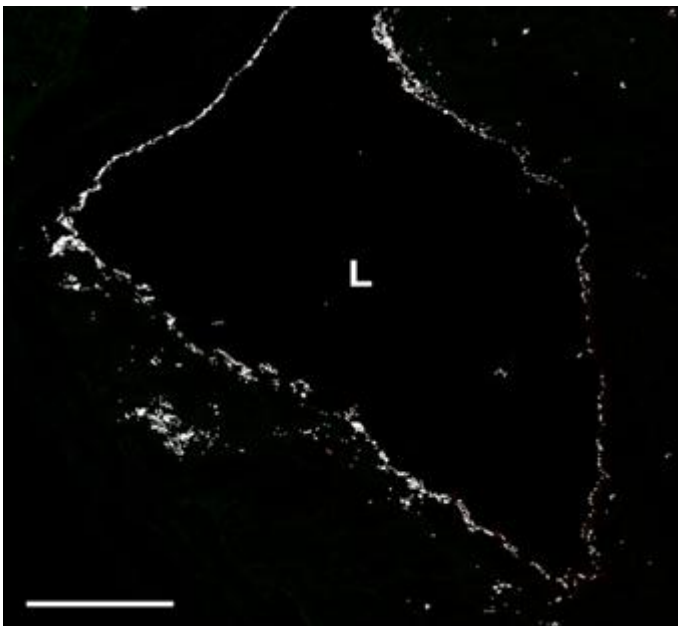


Figure 3. A cross-section of an atherosclerotic carotid from an apolipoprotein E-deficient mouse was co-stained with two antibodies against TN-C and VWF, followed by confocal microscopy analysis. The image shows colocalized pixels, highlighted as a white overlay mask using ImageJ and the JACoP plugin. Scale bar, 75 μm . *L* indicates lumen.

Activation of platelets adherent to TN-C

Interestingly, high-resolution microscopy revealed that $82\pm 4\%$ ($n=3$) of platelets adhering to TN-C changed their shape and extended filopodia, indicating their activation. This was confirmed by the observation that most of them exhibited cytosolic calcium oscillations. These results suggested that the role of TN-C exceeds its ability to recruit platelets and participates in their activation.

Model of the putative role of TN-C in arterial thrombosis

Based on our results, a working model can be proposed, whereby upon erosion or dissection of an atherosclerotic plaque, high levels of TN-C become exposed to circulating blood, adsorbing plasmonic VWF and ensuring platelet capture through the GPIb-IX complex (Figure 4). Stable adhesion is then provided by direct binding to integrins, primarily $\alpha_2\beta_1$ and to a lesser extent, $\alpha_{IIb}\beta_3$. Interaction with $\alpha_{IIb}\beta_3$ could also be indirect through VWF, a known ligand of this integrin. These different receptors can all contribute to induce platelet activation, resulting in shape change with extension of filopodia and increased cytosolic calcium levels.

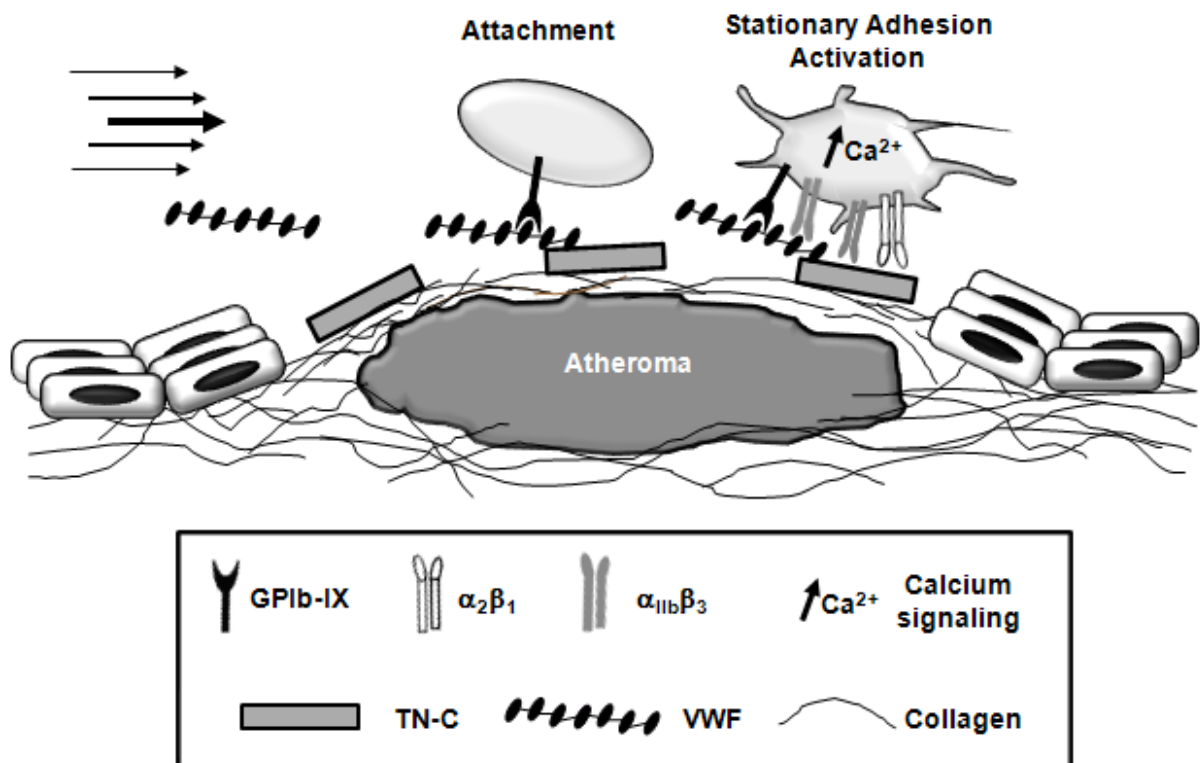


Figure 4. Possible model for the participation of TN-C in arterial thrombosis.

Conclusion

We have provided evidence for the ability of TN-C to support platelet adhesion and activation under flow conditions relevant to stenosed arteries. Its absence in normal vessels and its marked upregulation in atherosclerosis [6] and after balloon catheterization [13], support the hypothesis that TN-C may participate in arterial thrombosis but not hemostasis. This possibility is supported by the fact that TN-C-deficient mice present a normal tail bleeding time (MS, unpublished data, 2010). The role of TN-C in thrombosis is currently under investigation using atherosclerotic-prone apolipoprotein E-deficient mice lacking TN-C in models of plaque injury [14]. From a clinical standpoint, agents blocking platelet/TN-C interaction might provide a safer therapeutic option as they are expected to be highly selective for thrombosis with a minor risk of bleeding.

References

1. Michelson AD. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:154-169.
2. Serebruany VL, Malinin AI, Eisert RM, Sane DC. Risk of bleeding complications with antiplatelet agents: meta-analysis of 338,191 patients enrolled in 50 randomized controlled trials. *Am J Hematol.* 2004;75:40-47.
3. Bhatt DL. Prasugrel in clinical practice. *N Engl J Med.* 2009;361:940-942.
4. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann FJ, Ardissino D, De Servi S, Murphy SA, Riesmeyer J, Weerakkody G, Gibson CM, Antman EM. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2007;357:2001-2015.
5. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-874.
6. Wallner K, Li C, Shah PK, Fishbein MC, Forrester JS, Kaul S, Sharifi BG. Tenascin-C is expressed in macrophage-rich human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation.* 1999;99:1284-1289.
7. Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal.* 2009;3:287-310.
8. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood.* 1996;88:1525-1541.
9. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 1996;84:289-297.
10. Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, Brodde MF, Steiner M, Savion N, Varon D, Sixma JJ, Van Aken H, Kehrel BE. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *Faseb J.* 2003;17:1490-1492.
11. Geberhiwot T, Ingerpuu S, Pedraza C, Neira M, Lehto U, Virtanen I, Korttesmaa J, Tryggvason K, Engvall E, Patarroyo M. Blood platelets contain and secrete laminin-8 (alpha4beta1gamma1) and adhere to laminin-8 via alpha6beta1 integrin. *Exp Cell Res.* 1999;253:723-732.
12. Matter CM, Schuler PK, Alessi P, Meier P, Ricci R, Zhang D, Halin C, Castellani P, Zardi L, Hofer CK, Montani M, Neri D, Lüscher TF. Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin. *Circulation Res.* 2004;95:1225-1233.

13. Wallner K, Sharifi BG, Shah PK, Noguchi S, DeLeon H, Wilcox JN. Adventitial remodeling after angioplasty is associated with expression of tenascin mRNA by adventitial myofibroblasts. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:655-661.
14. Hechler B, Gachet C. Comparison of two murine models of thrombosis induced by atherosclerotic plaque injury. *Thromb Haemost.* 2011;105 Suppl 1:S3-12.

BIBLIOGRAPHIE

- Aarts, P.A., S.A. van den Broek, G.W. Prins, G.D. Kuiken, J.J. Sixma, and R.M. Heethaar. 1988. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. *Arteriosclerosis* 8:819-824.
- Ablynx. 2011. Ablynx reports phase II data for ALX-0081 in high risk ACS patients undergoing a PCI procedure. *Media release Ghent 2011 Nov 10* <http://hugin.info/137912/R/1562875/484367.pdf>
- Adams, J.C. 2001. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:25-51.
- Agbanyo, F.R., J.J. Sixma, P.G. de Groot, L.R. Languino, and E.F. Plow. 1993. Thrombospondin-platelet interactions. Role of divalent cations, wall shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *The Journal of clinical investigation* 92:288-296.
- Aird, W.C. 2005. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost* 3:1392-1406.
- Al-Ansari, S., C.J. Zeebregts, R.H. Slart, M. Peppelenbosch, and R.A. Tio. 2009. Galectins in atherosclerotic disease. *Trends Cardiovasc Med* 19:164-169.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002. *Molecular biology of the cell* - 4th edition. éd. Garland Science, 1616 p., New York.
- Andrews, R.K., W.J. Booth, J.J. Gorman, P.A. Castaldi, and M.C. Berndt. 1989. Purification of botrocetin from Bothrops jararaca venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry* 28:8317-8326.
- Andrews, R.K., A.D. Munday, C.A. Mitchell, and M.C. Berndt. 2001. Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* 98:681-687.
- Angiolillo, D.J., D. Capodanno, and S. Goto. 2010. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J* 31:17-28.
- Arthur, J.F., S. Dunkley, and R.K. Andrews. 2007. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *British journal of haematology* 139:363-372.
- Aumailley, M., L. Bruckner-Tuderman, W.G. Carter, R. Deutzmann, D. Edgar, P. Ekblom, J. Engel, E. Engvall, E. Hohenester, J.C. Jones, H.K. Kleinman, M.P. Marinkovich, G.R. Martin, U. Mayer, G. Meneguzzi, J.H. Miner, K. Miyazaki, M. Patarroyo, M. Paulsson, V. Quaranta, J.R. Sanes, T. Sasaki, K. Sekiguchi, L.M. Sorokin, J.F. Talts, K. Tryggvason, J. Uitto, I. Virtanen, K. von der Mark, U.M. Wewer, Y. Yamada, and P.D. Yurchenco. 2005. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24:326-332.
- Avouac, B., B. Combe, and B. Darne. 2003. Prescription of NSAIDs in patients treatment with platelet inhibitors or anticoagulants. *Presse Med* 32:S38-43.
- Azzam, K., L.I. Garfinkel, C. Bal dit Sollier, M. Cisse Thiam, and L. Drouet. 1995. Antithrombotic effect of a recombinant von Willebrand factor, VCL, on nitrogen laser-induced thrombus formation in guinea pig mesenteric arteries. *Thrombosis and haemostasis* 73:318-323.
- Bagnato, C., J. Thumar, V. Mayya, S.I. Hwang, H. Zebroski, K.P. Claffey, C. Haudenschild, J.K. Eng, D.H. Lundgren, and D.K. Han. 2007. Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 6:1088-1102.
- Bagot, C.N., and R. Arya. 2008. Virchow and his triad: a question of attribution. *British journal of haematology* 143:180-190.
- Bambace, N.M., and C.E. Holmes. 2011. The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb Haemost* 9:237-249.

- Baracchini, C., M. Gruppo, F. Mazzalai, R. Lorenzetti, G. Meneghetti, and E. Ballotta. 2011. Predictors of neck bleeding after eversion carotid endarterectomy. *J Vasc Surg* 54:699-705.
- Bartolucci, A.A., M. Tendera, and G. Howard. 2011. Meta-analysis of multiple primary prevention trials of cardiovascular events using aspirin. *Am J Cardiol* 107:1796-1801.
- Bartunek, J., E. Barbato, J.B. Holz, K. Vercauteren, H. Ulrichs, AblynxNV., and G. Heyndrickx. 2008. ALX-0081 a novel anti-thrombotic: results of a single-dose phase 1 study in healthy volunteers and further development in patients with stable angina undergoing PCI. *Abstracts from American Heart Association Scientific Sessions New Orleans 2008 Nov 8-12. Circulation* 118:S_656 Abstract Number 2009.
- Bartunek, J., E. Barbato, K. Vercauteren, C. Duby, W. Wijns, G. Heyndrickx, and J.B. Holz. 2010. Safety and efficacy of anti-von Willebrand factor nanobody ALX-0081 in stable angina patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Abstracts from American Heart Association Scientific Sessions Chicago 2010 Nov 14-17. Circulation* 122: Abstract Number 15084.
- Basra, S.S., P. Tsai, and N.M. Lakkis. 2011. Safety and efficacy of antiplatelet and antithrombotic therapy in acute coronary syndrome patients with chronic kidney disease. *Journal of the American College of Cardiology* 58:2263-2269.
- Baudry, G. 2011. Préparation au concours de l'internat - dossiers à questions fermées - cardiologie pathologies cardiovasculaires. éd. Vernazobres-Gregoire, coll. Médecine, 270 p., Paris.
- Baumgartner, H.R. 1973. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition, and formation of mural thrombi. *Microvasc Res* 5:167-179.
- Baumgartner, H.R., R. Muggli, T.B. Tschopp, and V.T. Turitto. 1976. Platelet adhesion, release and aggregation in flowing blood: effects of surface properties and platelet function. *Thrombosis and haemostasis* 35:124-138.
- Baurand, A., A. Eckly, N. Bari, C. Leon, B. Hechler, J.P. Cazenave, and C. Gachet. 2000. Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors. *Thrombosis and haemostasis* 84:484-491.
- Baurand, A., A. Eckly, B. Hechler, G. Kauffenstein, J.L. Galzi, J.P. Cazenave, C. Leon, and C. Gachet. 2005. Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties? *Molecular pharmacology* 67:721-733.
- Becker, R.C., D.J. Moliterno, L.K. Jennings, K.S. Pieper, J. Pei, A. Niederman, K.M. Ziada, G. Berman, J. Strony, D. Joseph, K.W. Mahaffey, F. Van de Werf, E. Veltri, and R.A. Harrington. 2009. Safety and tolerability of SCH 530348 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II study. *Lancet* 373:919-928.
- Bender, M., I. Hagedorn, and B. Nieswandt. 2011. Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl₃-induced thrombosis. *J Thromb Haemost* 9:1423-1426.
- Bennett, J.S., C. Chan, G. Vilaire, S.A. Mousa, and W.F. DeGrado. 1997. Agonist-activated alpha_vbeta₃ on platelets and lymphocytes binds to the matrix protein osteopontin. *The Journal of biological chemistry* 272:8137-8140.
- Bergmeier, W., and R.O. Hynes. 2012. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:(2).
- Bergmeier, W., C.L. Piffath, T. Goerge, S.M. Cifuni, Z.M. Ruggeri, J. Ware, and D.D. Wagner. 2006. The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:16900-16905.

- Berliner, J.A., and A.D. Watson. 2005. A role for oxidized phospholipids in atherosclerosis. *The New England journal of medicine* 353:9-11.
- Best, D., Y.A. Senis, G.E. Jarvis, H.J. Eagleton, D.J. Roberts, T. Saito, S.M. Jung, M. Moroi, P. Harrison, F.R. Green, and S.P. Watson. 2003. GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood* 102:2811-2818.
- Beumer, S., H.F. Heijnen, I.J. MJ, E. Orlando, P.G. de Groot, and J.J. Sixma. 1995. Platelet adhesion to fibronectin in flow: the importance of von Willebrand factor and glycoprotein Ib. *Blood* 86:3452-3460.
- Beumer, S., I.J. MJ, P.G. de Groot, and J.J. Sixma. 1994. Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood* 84:3724-3733.
- Bhatt, D.L., K.A. Fox, W. Hacke, P.B. Berger, H.R. Black, W.E. Boden, P. Cacoub, E.A. Cohen, M.A. Creager, J.D. Easton, M.D. Flather, S.M. Haffner, C.W. Hamm, G.J. Hankey, S.C. Johnston, K.H. Mak, J.L. Mas, G. Montalescot, T.A. Pearson, P.G. Steg, S.R. Steinhubl, M.A. Weber, D.M. Brennan, L. Fabry-Ribaudou, J. Booth, and E.J. Topol. 2006. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *The New England journal of medicine* 354:1706-1717.
- Bhatt, D.L., and E.J. Topol. 2003. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nature reviews* 2:15-28.
- Bird, J.E., P.L. Smith, J.S. Bostwick, P. Shipkova, and W.A. Schumacher. 2011. Bleeding response induced by anti-thrombotic doses of a phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-beta inhibitor in mice. *Thrombosis research* 127:560-564.
- Bizzozero, G. 1881. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e sulla sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *Osserv Gazz Clin* 17:785-787.
- Blann, A.D., and S. Dunmore. 2011. Arterial and venous thrombosis in cancer patients. *Cardiol Res Pract* 2011:394740.
- Bolar, N., L. Van Laer, and B.L. Loeys. 2012. Marfan syndrome: from gene to therapy. *Curr Opin Pediatr* 24:498-504.
- Boneu, B., and J.P. Cazenave. 1997. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose - 2ème édition. éd. Alinéa, 281 p., Reims.
- Bonnefoy, A., K. Daenens, H.B. Feys, R. De Vos, P. Vandervoort, J. Vermylen, J. Lawler, and M.F. Hoylaerts. 2006. Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting (sub)endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13. *Blood* 107:955-964.
- Bornstein, P., and E.H. Sage. 2002. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14:608-616.
- Bou-Gharios, G., M. Ponticos, V. Rajkumar, and D. Abraham. 2004. Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell Prolif* 37:207-220.
- Bouman, H.J., E. Schomig, J.W. van Werkum, J. Velder, C.M. Hackeng, C. Hirschhauser, C. Waldmann, H.G. Schmalz, J.M. ten Berg, and D. Taubert. 2011. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nature medicine* 17:110-116.
- Bousser, M.G., P. Amarenco, A. Chamorro, M. Fisher, I. Ford, K.M. Fox, M.G. Hennerici, H.P. Mattle, P.M. Rothwell, A. de Cordoue, and M.D. Fratacci. 2011. Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events (PERFORM): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet* 377:2013-2022.
- Brellier, F., K. Hostettler, H.R. Hotz, C. Ozcakir, S.A. Cologlu, D. Togbe, B. Ryffel, M. Roth, and R. Chiquet-Ehrismann. 2011. Tenascin-C triggers fibrin accumulation by downregulation of tissue plasminogen activator. *FEBS letters* 585:913-920.
- Bristol-Myers Squibb. 2011. Product sales summary 4Q 2010. *New York City 2011* http://www.bms.com/Documents/investors/product_sales_2010.pdf

- Brown, C.H., L.B. Leverett, C.W. Lewis, C.P. Alfrey, Jr., and J.D. Hellums. 1975. Morphological, biochemical, and functional changes in human platelets subjected to shear stress. *J Lab Clin Med* 86:462-471.
- Bültmann, A., C. Herdeg, Z. Li, G. Munch, C. Baumgartner, H. Langer, E. Kremmer, T. Geisler, A. May, M. Ungerer, and M. Gawaz. 2006. Local delivery of soluble platelet collagen receptor glycoprotein VI inhibits thrombus formation in vivo. *Thrombosis and haemostasis* 95:763-766.
- Bültmann, A., Z. Li, S. Wagner, M. Peluso, T. Schonberger, C. Weis, I. Konrad, K. Stellos, S. Massberg, B. Nieswandt, M. Gawaz, M. Ungerer, and G. Munch. 2010. Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis--a possible role of fibronectin. *J Mol Cell Cardiol* 49:532-542.
- Caglayan, E., G.R. Romeo, K. Kappert, M. Odenthal, M. Sudkamp, S.C. Body, S.K. Shernan, D. Hackbusch, M. Vantler, A. Kazlauskas, and S. Rosenkranz. 2010. Profilin-1 is expressed in human atherosclerotic plaques and induces atherogenic effects on vascular smooth muscle cells. *PLoS One* 5:e13608.
- Callewaert, F., J. Roodt, H. Ulrichs, T. Stohr, W.J. van Rensburg, S. Lamprecht, S. Rossenu, S. Priem, W. Willems, and J.B. Holz. 2012. Evaluation of efficacy and safety of the anti-vWF Nanobody ALX-0681 in a preclinical baboon model of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 120:3603-3610.
- Camps, J., J. Joven, B. Mackness, M. Mackness, D. Tawfik, D. Draganov, L.G. Costa, G. Paragh, I. Seres, S. Horke, R. James, A. Hernandez, S. Reddy, D. Shih, M. Navab, D. Rochu, and M. Aviram. 2011. Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. *Nature medicine* 17:1041-1042; author reply 1042-1044.
- Canault, M., C. Grosdidier, P.E. Morange, M. Guinier, V. Baccini, A.T. Nurden, D. Tregouet, and M.C. Alessi. 2012. A point mutation in CalDAG-GEFI gene affects inside-out signaling and platelet spreading in humans. *Abstracts from the 1st European Platelet Network (EUPLAN) conference Maastricht 2012 Sep 19-21 Abstract Number 018*.
- Cathcart, M.C., R. Tamosiuniene, G. Chen, T.G. Neilan, A. Bradford, K.J. O'Byrne, D.J. Fitzgerald, and G.P. Pidgeon. 2008. Cyclooxygenase-2-linked attenuation of hypoxia-induced pulmonary hypertension and intravascular thrombosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 326:51-58.
- Cattaneo, M. 2011. Molecular defects of the platelet P2 receptors. *Purinergic Signal* 7:333-339.
- Cattaneo, M., C. Gachet, J.P. Cazenave, and M.A. Packham. 2002. Adenosine diphosphate(ADP) does not induce thromboxane A2 generation in human platelets. *Blood* 99:3868-3869; author reply 3869-3870.
- Cau, P., and R. Seïte. 2001. Les cours du PCEM - cours de biologie cellulaire - 2ème édition. éd. Ellipses, 538 p., Paris.
- Cazenave, J.P., P. Ohlmann, D. Cassel, A. Eckly, B. Hechler, and C. Gachet. 2004. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods in molecular biology* 272:13-28.
- Cazenave, J.P., M.A. Packham, M.A. Guccione, and J.F. Mustard. 1975. Inhibition of platelet adherence to damaged surface of rabbit aorta. *J Lab Clin Med* 86:551-563.
- Celestini, A., and F. Violi. 2007. A review of picotamide in the reduction of cardiovascular events in diabetic patients. *Vasc Health Risk Manag* 3:93-98.
- Chang, J.C., H.H. Chang, C.T. Lin, and S.J. Lo. 2005. The integrin alpha6beta1 modulation of PI3K and Cdc42 activities induces dynamic filopodium formation in human platelets. *J Biomed Sci* 12:881-898.

- Chassot, P.G., D.R. Spahn, and A. Delabays. 2012. Précis d'anesthésie cardiaque - Annexe B : antiplaquettaires. *Lausanne avril 2012 71p*. <http://www.precisdanesthesiecardiaque.ch/Pdf/Annexe%20B%20Antiplaquettaires.pdf>
- Chen, C.C., and L.F. Lau. 2009. Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 41:771-783.
- Chen, H., D. Locke, Y. Liu, C. Liu, and M.L. Kahn. 2002a. The platelet receptor GPVI mediates both adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion. *The Journal of biological chemistry* 277:3011-3019.
- Chen, J., T.G. Diacovo, D.G. Grenache, S.A. Santoro, and M.M. Zutter. 2002b. The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *The American journal of pathology* 161:337-344.
- Chen, J., M. Ling, X. Fu, J.A. Lopez, and D.W. Chung. 2012. Simultaneous Exposure of Sites in von Willebrand Factor for Glycoprotein Ib Binding and ADAMTS13 Cleavage: Studies With Ristocetin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32:2625-2630.
- Chintala, M., K. Shimizu, M. Ogawa, H. Yamaguchi, M. Doi, and P. Jensen. 2008. Basic and translational research on proteinase-activated receptors: antagonism of the proteinase-activated receptor 1 for thrombin, a novel approach to antiplatelet therapy for atherothrombotic disease. *J Pharmacol Sci* 108:433-438.
- Chintala, M., J. Strony, B. Yang, S. Kurowski, and Q. Li. 2010. SCH 602539, a protease-activated receptor-1 antagonist, inhibits thrombosis alone and in combination with cangrelor in a Folts model of arterial thrombosis in cynomolgus monkeys. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30:2143-2149.
- Chiquet-Ehrismann, R., and M. Chiquet. 2003. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 200:488-499.
- Chiu, J.J., and S. Chien. 2011. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 91:327-387.
- Cho, J., and D.F. Mosher. 2006. Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost* 4:1461-1469.
- Choi, J., and J.C. Kermode. 2011. New therapeutic approaches to combat arterial thrombosis: better drugs for old targets, novel targets, and future prospects. *Mol Interv* 11:111-123.
- Chopek, M.W., J.P. Girma, K. Fujikawa, E.W. Davie, and K. Titani. 1986. Human von Willebrand factor: a multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry* 25:3146-3155.
- Christopher, R.A., S.R. Judge, P.A. Vincent, P.J. Higgins, and P.J. McKeown-Longo. 1999. The amino-terminal matrix assembly domain of fibronectin stabilizes cell shape and prevents cell cycle progression. *J Cell Sci* 112 (Pt 19):3225-3235.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., S.S. Smyth, S.M. Schoenwaelder, T.H. Fischer, and G.C. White, 2nd. 2005. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *The Journal of clinical investigation* 115:680-687.
- Chung, J., A.G. Gao, and W.A. Frazier. 1997. Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin alphaIIb beta3. *The Journal of biological chemistry* 272:14740-14746.
- Chung, J., X.Q. Wang, F.P. Lindberg, and W.A. Frazier. 1999. Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in alpha2beta1-mediated platelet activation. *Blood* 94:642-648.
- Clark, R.A., H.P. Erickson, and T.A. Springer. 1997. Tenascin supports lymphocyte rolling. *The Journal of cell biology* 137:755-765.

- Collet, J.P., T. Cuisset, G. Range, G. Cayla, S. Elhadad, C. Pouillot, P. Henry, P. Motreff, D. Carrie, Z. Boueri, L. Belle, E. Van Belle, H. Rousseau, P. Aubry, J. Monsegu, P. Sabouret, S.A. O'Connor, J. Abtan, M. Kerneis, C. Saint-Etienne, O. Barthelemy, F. Beygui, J. Silvain, D.E. M, and G. Montalescot. 2012. Bedside Monitoring to Adjust Antiplatelet Therapy for Coronary Stenting. *The New England journal of medicine* 367:2100-2109.
- Collins, B., and C. Hollidge. 2003. Antithrombotic drug market. *Nature reviews* 2:11-12.
- Consonni, A., L. Cipolla, G. Guidetti, I. Canobbio, E. Ciralo, E. Hirsch, M. Falasca, M. Okigaki, C. Balduini, and M. Torti. 2012. Role and regulation of phosphatidylinositol 3-kinase beta in platelet integrin alpha2beta1 signaling. *Blood* 119:847-856.
- Cook, J.J., G.R. Sitko, B. Bednar, C. Condra, M.J. Mellott, D.M. Feng, R.F. Nutt, J.A. Shafer, R.J. Gould, and T.M. Connolly. 1995. An antibody against the exosite of the cloned thrombin receptor inhibits experimental arterial thrombosis in the African green monkey. *Circulation* 91:2961-2971.
- Cooke, B.M., S. Usami, I. Perry, and G.B. Nash. 1993. A simplified method for culture of endothelial cells and analysis of adhesion of blood cells under conditions of flow. *Microvasc Res* 45:33-45.
- Coughlin, S.R. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 3:1800-1814.
- Crittenden, J.R., W. Bergmeier, Y. Zhang, C.L. Piffath, Y. Liang, D.D. Wagner, D.E. Housman, and A.M. Graybiel. 2004. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nature medicine* 10:982-986.
- Cuisset, T., P.E. Morange, J. Quilici, J.L. Bonnet, C. Gachet, and M.C. Alessi. 2011. Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. *Nature medicine* 17:1039; author reply 1042-1034.
- Danchin, N., T. Simon, G. Mulak, V. Bataille, C. Barnay, J. Ferrieres, S. D., C. Gobillot, L. Vaur, P. Gueret, D. Blanchard, and J.P. Cambou. 2007. The french acute ST-elevation myocardial Infarction (FAST-MI) registry: major improvement in early and 6-month mortality over the past 10 years and its relation with early use of recommended medications and reperfusion therapy. *Abstracts from the American College of Cardiology 56th Annual Scientific Session New Orleans 2007 Mar 24-27 Abstract Number 07-LBCT-354458-ACC*.
- Danielson, K.G., H. Baribault, D.F. Holmes, H. Graham, K.E. Kadler, and R.V. Iozzo. 1997. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *The Journal of cell biology* 136:729-743.
- De Jaeger, C., and P. Cherin. 2012. Matrice extracellulaire, physiologie et vieillissement vasculaire. *Médecine et longévité* 4:41-53.
- De Marco, L., A. Girolami, T.S. Zimmerman, and Z.M. Ruggeri. 1986. von Willebrand factor interaction with the glycoprotein IIb/IIIa complex. Its role in platelet function as demonstrated in patients with congenital afibrinogenemia. *The Journal of clinical investigation* 77:1272-1277.
- Defreyn, G., S.J. Machin, L.O. Carreras, M.V. Dauden, D.A. Chamone, and J. Vermynen. 1981. Familial bleeding tendency with partial platelet thromboxane synthetase deficiency: reorientation of cyclic endoperoxide metabolism. *British journal of haematology* 49:29-41.
- Denis, C., D. Baruch, C.M. Kielty, N. Ajzenberg, O. Christophe, and D. Meyer. 1993. Localization of von Willebrand factor binding domains to endothelial extracellular matrix and to type VI collagen. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 13:398-406.

- Derian, C.K., B.P. Damiano, M.F. Addo, A.L. Darrow, M.R. D'Andrea, M. Nedelman, H.C. Zhang, B.E. Maryanoff, and P. Andrade-Gordon. 2003. Blockade of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 with a small-molecule antagonist prevents thrombus formation and vascular occlusion in nonhuman primates. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 304:855-861.
- DeWire, S.M., S. Ahn, R.J. Lefkowitz, and S.K. Shenoy. 2007. Beta-arrestins and cell signaling. *Annual review of physiology* 69:483-510.
- Dhore, C.R., J.P. Cleutjens, E. Lutgens, K.B. Cleutjens, P.P. Geusens, P.J. Kitslaar, J.H. Tordoir, H.M. Spronk, C. Vermeer, and M.J. Daemen. 2001. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21:1998-2003.
- Di Paola, J., A. Jugessur, T. Goldman, J. Reiland, D. Tallman, C. Sayago, and J.C. Murray. 2005. Platelet glycoprotein I(b)alpha and integrin alpha2 beta1 polymorphisms: gene frequencies and linkage disequilibrium in a population diversity panel. *J Thromb Haemost* 3:1511-1521.
- Di Stasio, E., and R. De Cristofaro. 2010. The effect of shear stress on protein conformation: Physical forces operating on biochemical systems: The case of von Willebrand factor. *Biophys Chem* 153:1-8.
- Diener, J.L., H.A. Daniel Lagasse, D. Duerschmied, Y. Merhi, J.F. Tanguay, R. Hutabarat, J. Gilbert, D.D. Wagner, and R. Schaub. 2009. Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779. *J Thromb Haemost* 7:1155-1162.
- Dubois, C., L. Panicot-Dubois, G. Merrill-Skoloff, B. Furie, and B.C. Furie. 2006. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* 107:3902-3906.
- Eckly, A., B. Hechler, M. Freund, M. Zerr, J.P. Cazenave, F. Lanza, P.H. Mangin, and C. Gachet. 2011. Mechanisms underlying FeCl(3)-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* 9:779-789.
- Eitzman, D.T., R.J. Westrick, E.G. Nabel, and D. Ginsburg. 2000. Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice. *Blood* 95:577-580.
- El Ghannudi, S., P. Ohlmann, L. Jesel, B. Radulescu, E. El Adraa, U. Crimizade, M.L. Wiesel, C. Gachet, and O. Morel. 2011. Impaired inhibition of P2Y(12) by clopidogrel is a major determinant of cardiac death in diabetes mellitus patients treated by percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis* 217:465-472.
- Endenburg, S.C., R.R. Hantgan, L. Lindeboom-Blokzijl, H. Lankhof, W.G. Jerome, J.C. Lewis, J.J. Sixma, and P.G. de Groot. 1995. On the role of von Willebrand factor in promoting platelet adhesion to fibrin in flowing blood. *Blood* 86:4158-4165.
- Erhardt, J.A., J.R. Toomey, S.A. Douglas, and D.G. Johns. 2006. P2X1 stimulation promotes thrombin receptor-mediated platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 4:882-890.
- Eroschenko, V.P. 2000. Atlas of histology with functional correlations - 9th edition. éd. Lippincott Williams & Wilkins, 363 p., Philadelphia.
- Eusébio, J., J.L. Reny, P. Fontana, and M. Nendaz. 2010. Cardiovascular diseases, antiplatelet agents, anticoagulants and haemorrhagic risk. *Rev Med Suisse* 6:1942-1950.
- Fabre, J.E., and M.E. Gurney. 2010. Limitations of current therapies to prevent thrombosis: a need for novel strategies. *Mol Biosyst* 6:305-315.
- Fabre, J.E., M. Nguyen, A. Latour, J.A. Keifer, L.P. Audoly, T.M. Coffman, and B.H. Koller. 1999. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nature medicine* 5:1199-1202.
- Falati, S., S. Patil, P.L. Gross, M. Stapleton, G. Merrill-Skoloff, N.E. Barrett, K.L. Pixton, H. Weiler, B. Cooley, D.K. Newman, P.J. Newman, B.C. Furie, B. Furie, and J.M.

- Gibbins. 2006. Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood* 107:535-541.
- Farndale, R.W., J.J. Sixma, M.J. Barnes, and P.G. de Groot. 2004. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* 2:561-573.
- Farquharson, C., and S.P. Robins. 1989. Immunolocalization of Collagen Type-I and Type-III in the Arterial-Wall of the Rat. *Histochem J* 21:172-178.
- Faruqi, T.R., E.J. Weiss, M.J. Shapiro, W. Huang, and S.R. Coughlin. 2000. Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. *The Journal of biological chemistry* 275:19728-19734.
- Fauvel-Lafeve, F. 1999. Microfibrils from the arterial subendothelium. *Int Rev Cytol* 188:1-40.
- Fay, W.P., A.C. Parker, M.N. Ansari, X. Zheng, and D. Ginsburg. 1999. Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice. *Blood* 93:1825-1830.
- Ferguson, S.S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24.
- Fischer, D., R. Chiquet-Ehrismann, C. Bernasconi, and M. Chiquet. 1995. A single heparin binding region within the fibrinogen-like domain is functional in chick tenascin-C. *The Journal of biological chemistry* 270:3378-3384.
- Frenette, P.S., C.V. Denis, L. Weiss, K. Jurk, S. Subbarao, B. Kehrel, J.H. Hartwig, D. Vestweber, and D.D. Wagner. 2000. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *The Journal of experimental medicine* 191:1413-1422.
- Frolova, E.G., E. Pluskota, I. Krukovets, T. Burke, C. Drumm, J.D. Smith, L. Blech, M. Febbraio, P. Bornstein, E.F. Plow, and O.I. Stenina. 2010. Thrombospondin-4 regulates vascular inflammation and atherogenesis. *Circ Res* 107:1313-1325.
- Gachet, C. 2006. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 46:277-300.
- Gachet, C. 2012. P2Y(12) receptors in platelets and other hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Purinergic Signal* 8:609-619.
- Galbusera, M., M. Noris, and G. Remuzzi. 2006. Thrombotic thrombocytopenic purpura--then and now. *Semin Thromb Hemost* 32:81-89.
- Gallot, A., S. Davin, V. Ulmann, and A. Bellilchi. 2009. Obstacles et défis des big pharma aujourd'hui. *Fusions et acquisitions magazine* 232.
- Garattini, S., and V. Bertele. 2007. Non-inferiority trials are unethical because they disregard patients' interests. *Lancet* 370:1875-1877.
- Garcion, E., A. Faissner, and C. Ffrench-Constant. 2002. La ténascine-C : une molécule de la matrice extracellulaire impliquée dans le développement du système nerveux central. *Médecine/Sciences* 18:982-988.
- Gay, M., and L.T. Zhang. 2008. Numerical studies of blood flow in healthy, stenosed, and stented carotid arteries. *Int J Numer Meth Fl* 61:453-472.
- Geberhiwot, T., S. Ingerpuu, C. Pedraza, M. Neira, U. Lehto, I. Virtanen, J. Korttesmaa, K. Tryggvason, E. Engvall, and M. Patarroyo. 1999. Blood platelets contain and secrete laminin-8 (alpha4beta1gamma1) and adhere to laminin-8 via alpha6beta1 integrin. *Experimental cell research* 253:723-732.
- George, E.L., E.N. Georges-Labouesse, R.S. Patel-King, H. Rayburn, and R.O. Hynes. 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119:1079-1091.
- Georges-Labouesse, E., M. Mark, N. Messaddeq, and A. Gansmuller. 1998. Essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination. *Curr Biol* 8:983-986.

- Georges-Labouesse, E., N. Messaddeq, G. Yehia, L. Cadalbert, A. Dierich, and M. Le Meur. 1996. Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat Genet* 13:370-373.
- Giannarelli, C., M.U. Zafar, and J.J. Badimon. 2010. Prostanoid and TP-receptors in atherothrombosis: is there a role for their antagonism? *Thrombosis and haemostasis* 104:949-954.
- Gilbert, J.C., T. DeFeo-Fraulini, R.M. Hutabarat, C.J. Horvath, P.G. Merlino, H.N. Marsh, J.M. Healy, S. Boufakhreddine, T.V. Holohan, and R.G. Schaub. 2007. First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation* 116:2678-2686.
- Gilio, K., I.C. Munnix, P. Mangin, J.M. Cosemans, M.A. Feijge, P.E. van der Meijden, S. Olieslagers, M.B. Chrzanowska-Wodnicka, R. Lillian, S. Schoenwaelder, S. Koyasu, S.O. Sage, S.P. Jackson, and J.W. Heemskerk. 2009. Non-redundant roles of phosphoinositide 3-kinase isoforms alpha and beta in glycoprotein VI-induced platelet signaling and thrombus formation. *The Journal of biological chemistry* 284:33750-33762.
- Gleim, S., Z. Kasza, K. Martin, and J. Hwa. 2009. Prostacyclin receptor/thromboxane receptor interactions and cellular responses in human atherothrombotic disease. *Curr Atheroscler Rep* 11:227-235.
- Glukhova, M.A., M.G. Frid, B.V. Shekhonin, T.D. Vasilevskaya, J. Grunwald, M. Saginati, and V.E. Koteliensky. 1989. Expression of extra domain A fibronectin sequence in vascular smooth muscle cells is phenotype dependent. *The Journal of cell biology* 109:357-366.
- Goel, R., P.J. Phillips-Mason, D.M. Raben, and J.J. Baldassare. 2002. alpha-Thrombin induces rapid and sustained Akt phosphorylation by beta-arrestin1-dependent and -independent mechanisms, and only the sustained Akt phosphorylation is essential for G1 phase progression. *The Journal of biological chemistry* 277:18640-18648.
- Goldsmith, H.L., and V.T. Turitto. 1986. Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and haemostasis* 55:415-435.
- Goncalves, I., S.C. Hughan, S.M. Schoenwaelder, C.L. Yap, Y. Yuan, and S.P. Jackson. 2003. Integrin alpha IIb beta 3-dependent calcium signals regulate platelet-fibrinogen interactions under flow. Involvement of phospholipase C gamma 2. *The Journal of biological chemistry* 278:34812-34822.
- Goncalves, I., W.S. Nesbitt, Y. Yuan, and S.P. Jackson. 2005. Importance of temporal flow gradients and integrin alphaIIbbeta3 mechanotransduction for shear activation of platelets. *The Journal of biological chemistry* 280:15430-15437.
- Goschnick, M.W., L.M. Lau, J.L. Wee, Y.S. Liu, P.M. Hogarth, L.M. Robb, M.J. Hickey, M.D. Wright, and D.E. Jackson. 2006. Impaired "outside-in" integrin alphaIIbbeta3 signaling and thrombus stability in TSSC6-deficient mice. *Blood* 108:1911-1918.
- Goto, S., H. Ogawa, M. Takeuchi, M.D. Flather, and D.L. Bhatt. 2010a. Double-blind, placebo-controlled Phase II studies of the protease-activated receptor 1 antagonist E5555 (atopaxar) in Japanese patients with acute coronary syndrome or high-risk coronary artery disease. *Eur Heart J* 31:2601-2613.
- Goto, S., T. Yamaguchi, Y. Ikeda, K. Kato, H. Yamaguchi, and P. Jensen. 2010b. Safety and exploratory efficacy of the novel thrombin receptor (PAR-1) antagonist SCH530348 for non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *J Atheroscler Thromb* 17:156-164.

- Gratacap, M.P., J. Guillermet-Guibert, V. Martin, G. Chicanne, H. Tronchere, F. Gaits-Iacovoni, and B. Payrastre. 2011. Regulation and roles of PI3Kbeta, a major actor in platelet signaling and functions. *Adv Enzyme Regul* 51:106-116.
- Grüner, S., M. Prostredna, B. Aktas, A. Moers, V. Schulte, T. Krieg, S. Offermanns, B. Eckes, and B. Nieswandt. 2004. Anti-glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis in mice with reduced alpha2beta1 levels or concomitant aspirin therapy. *Circulation* 110:2946-2951.
- Grüner, S., M. Prostredna, M. Koch, Y. Miura, V. Schulte, S.M. Jung, M. Moroi, and B. Nieswandt. 2005. Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood* 105:1492-1499.
- Guidetti, G., A. Bertoni, M. Viola, E. Tira, C. Balduini, and M. Torti. 2002. The small proteoglycan decorin supports adhesion and activation of human platelets. *Blood* 100:1707-1714.
- Guidetti, G.F., P. Lova, B. Bernardi, F. Campus, G. Baldanzi, A. Graziani, C. Balduini, and M. Torti. 2008. The Gi-coupled P2Y12 receptor regulates diacylglycerol-mediated signaling in human platelets. *The Journal of biological chemistry* 283:28795-28805.
- Guidetti, G.F., and M. Torti. 2012. The Small GTPase Rap1b: A Bidirectional Regulator of Platelet Adhesion Receptors. *J Signal Transduct* 2012:412089.
- Guinebault, C., B. Payrastre, C. Racaud-Sultan, H. Mazarguil, M. Breton, G. Mauco, M. Plantavid, and H. Chap. 1995. Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involves specific interactions of p85 alpha with actin filaments and focal adhesion kinase. *The Journal of cell biology* 129:831-842.
- Hallmann, R., N. Horn, M. Selg, O. Wendler, F. Pausch, and L.M. Sorokin. 2005. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 85:979-1000.
- Hamilton, J.R., I. Cornelissen, and S.R. Coughlin. 2004. Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2:1429-1435.
- Hantgan, R.R., G. Hindriks, R.G. Taylor, J.J. Sixma, and P.G. de Groot. 1990. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood* 76:345-353.
- Hardy, A.R., P.B. Conley, J. Luo, J.L. Benovic, A.W. Poole, and S.J. Mundell. 2005. P2Y1 and P2Y12 receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms. *Blood* 105:3552-3560.
- Harrington, R.A., F. Van de Werf, P.W. Armstrong, P. Aylward, B. Park, E. Veltri, K.W. Mahaffey, D.J. Moliterno, J. Strony, L. Wallentin, H.D. White, and R. Diaz. 2009. The Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome (TRA*CER) trial: study design and rationale. *Am Heart J* 158:327-334.e4.
- Hartwig, J.H., and M. DeSisto. 1991. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *The Journal of cell biology* 112:407-425.
- Haute Autorité de Santé. 2011. Ensemble, améliorons la prise en charge de l'infarctus du myocarde. *Saint-Denis 02 avril 2009* http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_765385/infarctus-du-myocarde
- Haute Autorité de Santé. 2012. Recommandations de bonne pratique ANSM/HAS - Bon usage des agents antiplaquettaires. *Saint-Denis 26 juin 2012* <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Recommandations-ANSM-HAS-Bon-usage-des-agents-antiplaquettaires-Point-d-information>

- He, L., L.K. Pappan, D.G. Grenache, Z. Li, D.M. Tollefsen, S.A. Santoro, and M.M. Zutter. 2003. The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood* 102:3652-3657.
- Hechler, B., and C. Gachet. 2011a. Comparison of two murine models of thrombosis induced by atherosclerotic plaque injury. *Thrombosis and haemostasis* 105 Suppl 1:S3-12.
- Hechler, B., and C. Gachet. 2011b. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal* 7:293-303.
- Hechler, B., N. Lenain, P. Marchese, C. Vial, V. Heim, M. Freund, J.P. Cazenave, M. Cattaneo, Z.M. Ruggeri, R. Evans, and C. Gachet. 2003. A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *The Journal of experimental medicine* 198:661-667.
- Hechler, B., S. Magnenat, M.L. Zighetti, M.U. Kassack, H. Ullmann, J.P. Cazenave, R. Evans, M. Cattaneo, and C. Gachet. 2005. Inhibition of platelet functions and thrombosis through selective or nonselective inhibition of the platelet P2 receptors with increasing doses of NF449 [4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis-(carbonylimino)))tetrakis -benzene-1,3-disulfonic acid octasodium salt]. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 314:232-243.
- Hechler, B., C. Nonne, A. Eckly, S. Magnenat, J.Y. Rinckel, C.V. Denis, M. Freund, J.P. Cazenave, F. Lanza, and C. Gachet. 2010. Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb Haemost* 8:173-184.
- Hechler, B., C. Nonne, E.J. Roh, M. Cattaneo, J.P. Cazenave, F. Lanza, K.A. Jacobson, and C. Gachet. 2006. MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 316:556-563.
- Heemskerk, J.W., M.J. Kuijpers, I.C. Munnix, and P.R. Siljander. 2005. Platelet collagen receptors and coagulation. A characteristic platelet response as possible target for antithrombotic treatment. *Trends Cardiovasc Med* 15:86-92.
- Henrita van Zanten, G., E.U. Saelman, K.M. Schut-Hese, Y.P. Wu, P.J. Sloatweg, H.K. Nieuwenhuis, P.G. de Groot, and J.J. Sixma. 1996. Platelet adhesion to collagen type IV under flow conditions. *Blood* 88:3862-3871.
- Hindriks, G., M.J. Ijsseldijk, A. Sonnenberg, J.J. Sixma, and P.G. de Groot. 1992. Platelet adhesion to laminin: role of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions, shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *Blood* 79:928-935.
- Hoffmann, C., N. Ziegler, S. Reiner, C. Krasel, and M.J. Lohse. 2008. Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *The Journal of biological chemistry* 283:30933-30941.
- Hogg, N., and P.A. Bates. 2000. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol* 19:211-222.
- Holtkotter, O., B. Nieswandt, N. Smyth, W. Muller, M. Hafner, V. Schulte, T. Krieg, and B. Eckes. 2002. Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *The Journal of biological chemistry* 277:10789-10794.
- Holz, J.B. 2012. The TITAN trial--assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor Nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfus Apher Sci* 46:343-346.
- Hong, T.T., J. Huang, E. Driscoll, and B.R. Lucchesi. 2006. Preclinical evaluation of S18886 in an experimental model of coronary arterial thrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 48:239-248.

- Hsia, H.C., and J.E. Schwarzbauer. 2005. Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *The Journal of biological chemistry* 280:26641-26644.
- Huber, K., B. Hamad, and P. Kirkpatrick. 2011. Fresh from the pipeline. Ticagrelor. *Nature reviews* 10:255-256.
- Ill, C.R., E. Engvall, and E. Ruoslahti. 1984. Adhesion of platelets to laminin in the absence of activation. *J Cell Biol* 99:2140-2145.
- Inoue, O., K. Suzuki-Inoue, W.L. Dean, J. Frampton, and S.P. Watson. 2003. Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2. *The Journal of cell biology* 160:769-780.
- Inoue, O., K. Suzuki-Inoue, O.J. McCarty, M. Moroi, Z.M. Ruggeri, T.J. Kunicki, Y. Ozaki, and S.P. Watson. 2006. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood* 107:1405-1412.
- Inoue, O., K. Suzuki-Inoue, and Y. Ozaki. 2008. Redundant mechanism of platelet adhesion to laminin and collagen under flow: involvement of von Willebrand factor and glycoprotein Ib-IX-V. *The Journal of biological chemistry* 283:16279-16282.
- INSEE. 2011. Principales causes de décès en 2009. Paris http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?ref_id=natfps06205
- Jackson, S.F., and S.M. Schoenwaelder. 2006. Type I phosphoinositide 3-kinases: potential antithrombotic targets? *Cell Mol Life Sci* 63:1085-1090.
- Jackson, S.P. 2011. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nature medicine* 17:1423-1436.
- Jackson, S.P., and S.M. Schoenwaelder. 2003. Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nature reviews* 2:775-789.
- Jackson, S.P., S.M. Schoenwaelder, I. Goncalves, W.S. Nesbitt, C.L. Yap, C.E. Wright, V. Kenche, K.E. Anderson, S.M. Dopheide, Y. Yuan, S.A. Sturgeon, H. Prabakaran, P.E. Thompson, G.D. Smith, P.R. Shepherd, N. Daniele, S. Kulkarni, B. Abbott, D. Saylik, C. Jones, L. Lu, S. Giuliano, S.C. Hughan, J.A. Angus, A.D. Robertson, and H.H. Salem. 2005. PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nature medicine* 11:507-514.
- Jackson, S.P., C.L. Yap, and K.E. Anderson. 2004. Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of platelet function. *Biochem Soc Trans* 32:387-392.
- Jain, S., S. Russell, and J. Ware. 2009. Platelet glycoprotein VI facilitates experimental lung metastasis in syngenic mouse models. *J Thromb Haemost* 7:1713-1717.
- Jain, S., M. Zuka, J. Liu, S. Russell, J. Dent, J.A. Guerrero, J. Forsyth, B. Maruszak, T.K. Gartner, B. Felding-Habermann, and J. Ware. 2007. Platelet glycoprotein Ib alpha supports experimental lung metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:9024-9028.
- Jandrot-Perrus, M., S. Busfield, A.H. Lagrue, X. Xiong, N. Debili, T. Chickering, J.P. Le Couedic, A. Goodearl, B. Dussault, C. Fraser, W. Vainchenker, and J.L. Villeval. 2000. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 96:1798-1807.
- Jawien, J., P. Nastalek, and R. Korbut. 2004. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55:503-517.
- Jedsadayamata, A., C.C. Chen, M.L. Kireeva, L.F. Lau, and S.C. Lam. 1999. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *The Journal of biological chemistry* 274:24321-24327.
- Jilma-Stohlawetz, P., J.C. Gilbert, M.E. Gorczyca, P. Knobl, and B. Jilma. 2011a. A dose ranging phase I/II trial of the von Willebrand factor inhibiting aptamer ARC1779 in

- patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thrombosis and haemostasis* 106:539-547.
- Jilma-Stohlawetz, P., M.E. Gorczyca, B. Jilma, J. Siller-Matula, J.C. Gilbert, and P. Knobl. 2011b. Inhibition of von Willebrand factor by ARC1779 in patients with acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thrombosis and haemostasis* 105:545-552.
- Jobin, F. 1995a. L'hémostase. éd. Maloine, 496 p., Paris.
- Jobin, F. 1995b. La thrombose. éd. Maloine, 321 p., Paris.
- Johnston-Cox, H.A., D. Yang, and K. Ravid. 2011. Physiological implications of adenosine receptor-mediated platelet aggregation. *J Cell Physiol* 226:46-51.
- Jones, F.S., and P.L. Jones. 2000. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 218:235-259.
- Joshi, P., C.Y. Chung, I. Aukhil, and H.P. Erickson. 1993. Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin. *J Cell Sci* 106 (Pt 1):389-400.
- Jurk, K., K.J. Clemetson, P.G. de Groot, M.F. Brodde, M. Steiner, N. Savion, D. Varon, J.J. Sixma, H. Van Aken, and B.E. Kehrel. 2003. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *Faseb J* 17:1490-1492.
- Kageyama, S., H. Yamamoto, M. Nagano, H. Arisaka, T. Kayahara, and R. Yoshimoto. 1997. Anti-thrombotic effects and bleeding risk of AJvW-2, a monoclonal antibody against human von Willebrand factor. *Br J Pharmacol* 122:165-171.
- Kalia, N., J.M. Auger, B. Atkinson, and S.P. Watson. 2008. Critical role of FcR gamma-chain, LAT, PLCgamma2 and thrombin in arteriolar thrombus formation upon mild, laser-induced endothelial injury in vivo. *Microcirculation* 15:325-335.
- Kalluri, R. 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3:422-433.
- Kasirer-Friede, A., M.L. Kahn, and S.J. Shattil. 2007. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunol Rev* 218:247-264.
- Kato, K., T. Kanaji, S. Russell, T.J. Kunicki, K. Furihata, S. Kanaji, P. Marchese, A. Reininger, Z.M. Ruggeri, and J. Ware. 2003. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* 102:1701-1707.
- Katsuda, S., Y. Okada, T. Minamoto, Y. Oda, Y. Matsui, and I. Nakanishi. 1992. Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 12:494-502.
- Keeney, S., and A.M. Cumming. 2001. The molecular biology of von Willebrand disease. *Clin Lab Haematol* 23:209-230.
- Kehrel, B., L. Balleisen, R. Kokott, R. Mesters, W. Stenzinger, K.J. Clemetson, and J. van de Loo. 1988. Deficiency of intact thrombospondin and membrane glycoprotein Ia in platelets with defective collagen-induced aggregation and spontaneous loss of disorder. *Blood* 71:1074-1078.
- Kelleher, C.M., S.E. McLean, and R.P. Mecham. 2004. Vascular extracellular matrix and aortic development. *Curr Top Dev Biol* 62:153-188.
- Kenji, K., U. Hironori, Y. Hideya, I. Michinori, H. Yasuhiko, and K. Nobuoki. 2004. Tenascin-C is associated with coronary plaque instability in patients with acute coronary syndromes. *Circ J* 68:198-203.
- Kleinschnitz, C., M. Pozgajova, M. Pham, M. Bendszus, B. Nieswandt, and G. Stoll. 2007. Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and

- Iib/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation* 115:2323-2330.
- Kogushi, M., T. Matsuoka, T. Kawata, H. Kuramochi, S. Kawaguchi, K. Murakami, H. Hiyoshi, S. Suzuki, T. Kawahara, A. Kajiwara, and I. Hishinuma. 2011. The novel and orally active thrombin receptor antagonist E5555 (Atopaxar) inhibits arterial thrombosis without affecting bleeding time in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 657:131-137.
- Konopatskaya, O., K. Gilio, M.T. Harper, Y. Zhao, J.M. Cosemans, Z.A. Karim, S.W. Whiteheart, J.D. Molkenin, P. Verkade, S.P. Watson, J.W. Heemskerk, and A.W. Poole. 2009. PKCalpha regulates platelet granule secretion and thrombus formation in mice. *J Clin Invest* 119:399-407.
- Konstantinides, S., K. Schafer, T. Thinnes, and D.J. Loskutoff. 2001. Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation* 103:576-583.
- Konstantinides, S., J. Ware, P. Marchese, F. Almus-Jacobs, D.J. Loskutoff, and Z.M. Ruggeri. 2006. Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Ibalpha and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* 4:2014-2021.
- Koshiishi, I., M. Shizari, and C.B. Underhill. 1994. CD44 can mediate the adhesion of platelets to hyaluronan. *Blood* 84:390-396.
- Kosoglou, T., L. Reyderman, R.G. Tiessen, A.A. van Vliet, R.R. Fales, R. Keller, B. Yang, and D.L. Cutler. 2012. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the novel PAR-1 antagonist vorapaxar (formerly SCH 530348) in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 68:249-258.
- Kreis, T., and R. Vale. 1999. Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins - 2nd edition. éd. Oxford University Press, 563 p., New York.
- Kritzik, M., B. Savage, D.J. Nugent, S. Santoso, Z.M. Ruggeri, and T.J. Kunicki. 1998. Nucleotide polymorphisms in the alpha2 gene define multiple alleles that are associated with differences in platelet alpha2 beta1 density. *Blood* 92:2382-2388.
- Kroll, M.H., J.D. Hellums, L.V. McIntire, A.I. Schafer, and J.L. Moake. 1996. Platelets and shear stress. *Blood* 88:1525-1541.
- Kühnel, W. 2003. Atlas de poche d'histologie - 3ème édition. éd. Flammarion Médecine-Sciences, 533 p., Paris.
- Kuijpers, M.J., K. Gilio, S. Reitsma, R. Nergiz-Unal, L. Prinzen, S. Heeneman, E. Lutgens, M.A. van Zandvoort, B. Nieswandt, M.G. Egbrink, and J.W. Heemskerk. 2009. Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model. *J Thromb Haemost* 7:152-161.
- Kuijpers, M.J., M. Pozgajova, J.M. Cosemans, I.C. Munnix, B. Eckes, B. Nieswandt, and J.W. Heemskerk. 2007. Role of murine integrin alpha2beta1 in thrombus stabilization and embolization: contribution of thromboxane A2. *Thrombosis and haemostasis* 98:1072-1080.
- Kuijpers, M.J., V. Schulte, W. Bergmeier, T. Lindhout, C. Brakebusch, S. Offermanns, R. Fassler, J.W. Heemskerk, and B. Nieswandt. 2003. Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *FASEB J* 17:685-687.
- Kulkarni, S., S.M. Dopheide, C.L. Yap, C. Ravanat, M. Freund, P. Mangin, K.A. Heel, A. Street, I.S. Harper, F. Lanza, and S.P. Jackson. 2000. A revised model of platelet aggregation. *The Journal of clinical investigation* 105:783-791.

- Kulkarni, S., W.S. Nesbitt, S.M. Dopheide, S.C. Hughan, I.S. Harper, and S.P. Jackson. 2004. Techniques to examine platelet adhesive interactions under flow. *Methods in molecular biology* 272:165-186.
- Kunicki, T.J. 2001. The role of platelet collagen receptor (glycoprotein Ia/IIa; integrin alpha2 beta1) polymorphisms in thrombotic disease. *Curr Opin Hematol* 8:277-285.
- Kurozumi, T., T. Imamura, K. Tanaka, Y. Yae, and S. Koga. 1984. Permeation and deposition of fibrinogen and low-density lipoprotein in the aorta and cerebral artery of rabbits--immuno-electron microscopic study. *Br J Exp Pathol* 65:355-364.
- Kyriakides, T.R., P. Rojnuckarin, M.A. Reidy, K.D. Hankenson, T. Papayannopoulou, K. Kaushansky, and P. Bornstein. 2003. Megakaryocytes require thrombospondin-2 for normal platelet formation and function. *Blood* 101:3915-3923.
- Lagadec, P., O. Dejoux, M. Ticchioni, F. Cottrez, M. Johansen, E.J. Brown, and A. Bernard. 2003. Involvement of a CD47-dependent pathway in platelet adhesion on inflamed vascular endothelium under flow. *Blood* 101:4836-4843.
- Lages, B., C. Malmsten, H.J. Weiss, and B. Samuelsson. 1981. Impaired platelet response to thromboxane-A2 and defective calcium mobilization in a patient with a bleeding disorder. *Blood* 57:545-552.
- Landry, Y., and J.P. Gies. 2006. Pharmacologie - des cibles vers l'indication thérapeutique. éd. Dunod, 596 p., Paris.
- Lanza, F. 2006. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagicparous thrombocytic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis* 1:46.
- Lanza, F., C. Gachet, D. Tovo, and P. Mangin. 2008. Signalisation via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire. *Hématologie* 14:1-12.
- Lanzer, P., and E.J. Topol. 2002. Pan vascular medicine: integrated clinical management - 1st edition. Springer, 1956 p., Berlin.
- Lathia, J.D., J. Gallagher, J.M. Heddleston, J. Wang, C.E. Eyler, J. Macswords, Q. Wu, A. Vasanji, R.E. McLendon, A.B. Hjelmeland, and J.N. Rich. 2010. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6:421-432.
- Law, D.A., F.R. DeGuzman, P. Heiser, K. Ministri-Madrid, N. Killeen, and D.R. Phillips. 1999. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function. *Nature* 401:808-811.
- Lawler, J., M. Sunday, V. Thibert, M. Duquette, E.L. George, H. Rayburn, and R.O. Hynes. 1998. Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *The Journal of clinical investigation* 101:982-992.
- Le Beller, C., and M. Alhenc-Gelas. 2004. Thrombopénies induites par les antagonistes du complexe GPIIb/IIIa plaquettaire administrés par voie injectable (Anti-GPIIb/IIIa-induced thrombocytopenia). *Hématologie* 10:14-23.
- Lee, H., S. Sturgeon, J. Mountford, S. Jackson, and J. Hamilton. 2012. Safety and efficacy of targeting platelet proteinase-activated receptors in combination with existing anti-platelet drugs as antithrombotics in mice. *Br J Pharmacol* 166:2188-2197.
- Lee, J.H., G.T. Oh, S.Y. Park, J.H. Choi, J.G. Park, C.D. Kim, W.S. Lee, B.Y. Rhim, Y.W. Shin, and K.W. Hong. 2005. Cilostazol reduces atherosclerosis by inhibition of superoxide and tumor necrosis factor-alpha formation in low-density lipoprotein receptor-null mice fed high cholesterol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 313:502-509.
- Leger, A.J., L. Covic, and A. Kuliopulos. 2006. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation* 114:1070-1077.
- Lenain, N., M. Freund, C. Leon, J.P. Cazenave, and C. Gachet. 2003. Inhibition of localized thrombosis in P2Y1-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *J Thromb Haemost* 1:1144-1149.

- Leon, C., M. Alex, A. Klocke, E. Morgenstern, C. Moosbauer, A. Eckly, M. Spannagl, C. Gachet, and B. Engelmann. 2004. Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood* 103:594-600.
- Leon, C., M. Freund, C. Ravanat, A. Baurand, J.P. Cazenave, and C. Gachet. 2001. Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation* 103:718-723.
- Leon, C., B. Hechler, M. Freund, A. Eckly, C. Vial, P. Ohlmann, A. Dierich, M. LeMeur, J.P. Cazenave, and C. Gachet. 1999. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *The Journal of clinical investigation* 104:1731-1737.
- Leon, C., C. Ravanat, M. Freund, J.P. Cazenave, and C. Gachet. 2003. Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23:1941-1947.
- Li, D., L. D'Angelo, M. Chavez, and D.S. Woulfe. 2011. Arrestin-2 differentially regulates PAR4 and ADP receptor signaling in platelets. *The Journal of biological chemistry* 286:3805-3814.
- Li, H., S. Lockyer, A. Concepcion, X. Gong, H. Takizawa, M. Guertin, Y. Matsumoto, J. Kambayashi, N.N. Tandon, and Y. Liu. 2007. The Fab fragment of a novel anti-GPVI monoclonal antibody, OM4, reduces in vivo thrombosis without bleeding risk in rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27:1199-1205.
- Libby, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874.
- Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473:317-325.
- Lin, F.T., Y. Daaka, and R.J. Lefkowitz. 1998. beta-arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor. *The Journal of biological chemistry* 273:31640-31643.
- Lockyer, S., K. Okuyama, S. Begum, S. Le, B. Sun, T. Watanabe, Y. Matsumoto, M. Yoshitake, J. Kambayashi, and N.N. Tandon. 2006. GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thrombosis research* 118:371-380.
- Lova, P., S. Paganini, E. Hirsch, L. Barberis, M. Wymann, F. Sinigaglia, C. Balduini, and M. Torti. 2003. A selective role for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in the Gi-dependent activation of platelet Rap1B. *The Journal of biological chemistry* 278:131-138.
- Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25:619-647.
- Luttrell, L.M., and R.J. Lefkowitz. 2002. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115:455-465.
- MacKenzie, A.B., M.P. Mahaut-Smith, and S.O. Sage. 1996. Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *The Journal of biological chemistry* 271:2879-2881.
- Mackie, E.J., T. Scott-Burden, A.W. Hahn, F. Kern, J. Bernhardt, S. Regenass, A. Weller, and F.R. Buhler. 1992. Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. *The American journal of pathology* 141:377-388.
- Mackman, N. 1997. Regulation of the tissue factor gene. *Thrombosis and haemostasis* 78:747-754.
- Mackman, N. 2004. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24:1015-1022.

- Mackman, N. 2008. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 451:914-918.
- Mahaut-Smith, M.P., S. Jones, and R.J. Evans. 2011. The P2X1 receptor and platelet function. *Purinergic Signal* 7:341-356.
- Malinin, N.L., E.F. Plow, and T.V. Byzova. 2010. Kindlins in FERM adhesion. *Blood* 115:4011-4017.
- Mangin, P., P. Ohlmann, A. Eckly, J.P. Cazenave, F. Lanza, and C. Gachet. 2004. The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented. *J Thromb Haemost* 2:969-977.
- Mangin, P., C.L. Yap, C. Nonne, S.A. Sturgeon, I. Goncalves, Y. Yuan, S.M. Schoenwaelder, C.E. Wright, F. Lanza, and S.P. Jackson. 2006. Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcRgamma deficiency. *Blood* 107:4346-4353.
- Mangin, P., Y. Yuan, I. Goncalves, A. Eckly, M. Freund, J.P. Cazenave, C. Gachet, S.P. Jackson, and F. Lanza. 2003. Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA. *The Journal of biological chemistry* 278:32880-32891.
- Mangin, P.H., N. Receveur, V. Wurtz, T. David, C. Gachet, and F. Lanza. 2009. Identification of five novel 14-3-3 isoforms interacting with the GPIb-IX complex in platelets. *J Thromb Haemost* 7:1550-1555.
- Mangin, P.H., C. Tang, C. Bourdon, S. Loyau, M. Freund, B. Hechler, C. Gachet, and M. Jandrot-Perrus. 2012. A humanized GPVI mouse model to assess the antithrombotic efficacy of anti-GPVI agents. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 341:156-163.
- Marchand, F. 1904. Ueber Atherosclerosis. *Verhandlungen der Kongresse fuer Innere Medizin* 21 Kongresse.
- Markus, H.S., C. McCollum, C. Imray, M.A. Goulder, J. Gilbert, and A. King. 2011. The von Willebrand inhibitor ARC1779 reduces cerebral embolization after carotid endarterectomy: a randomized trial. *Stroke* 42:2149-2153.
- Martin, V., J. Guillermet-Guibert, G. Chicanne, C. Cabou, M. Jandrot-Perrus, M. Plantavid, B. Vanhaesebroeck, B. Payrastre, and M.P. Gratacap. 2010. Deletion of the p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase in platelets reveals its central role in Akt activation and thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood* 115:2008-2013.
- Mason, K.D., M.R. Carpinelli, J.I. Fletcher, J.E. Collinge, A.A. Hilton, S. Ellis, P.N. Kelly, P.G. Ekert, D. Metcalf, A.W. Roberts, D.C. Huang, and B.T. Kile. 2007. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 128:1173-1186.
- Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt, and M. Gawaz. 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine* 196:887-896.
- Massberg, S., G. Enders, F.C. Matos, L.I. Tomic, R. Leiderer, S. Eisenmenger, K. Messmer, and F. Krombach. 1999. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 94:3829-3838.
- Massberg, S., M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlhofer, U. Heinzmann, and B. Nieswandt. 2003. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *The Journal of experimental medicine* 197:41-49.
- Massberg, S., I. Konrad, A. Bultmann, C. Schulz, G. Munch, M. Peluso, M. Lorenz, S. Schneider, F. Besta, I. Muller, B. Hu, H. Langer, E. Kremmer, M. Rudelius, U. Heinzmann, M. Ungerer, and M. Gawaz. 2004. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J* 18:397-399.

- Matsubara, Y., M. Murata, T. Hayashi, K. Suzuki, Y. Okamura, M. Handa, H. Ishihara, T. Shibano, and Y. Ikeda. 2005. Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms affect the interaction with von Willebrand factor under flow conditions. *British journal of haematology* 128:533-539.
- Matter, C.M., P.K. Schuler, P. Alessi, P. Meier, R. Ricci, D. Zhang, C. Halin, P. Castellani, L. Zardi, C.K. Hofer, M. Montani, D. Neri, and T.F. Luscher. 2004. Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin. *Circ Res* 95:1225-1233.
- Matuskova, J., A.K. Chauhan, B. Cambien, S. Astrof, V.S. Dole, C.L. Piffath, R.O. Hynes, and D.D. Wagner. 2006. Decreased plasma fibronectin leads to delayed thrombus growth in injured arterioles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26:1391-1396.
- Mazzucato, M., M.R. Cozzi, P. Pradella, D. Perissinotto, A. Malmstrom, M. Morgelin, P. Spessotto, A. Colombatti, L. De Marco, and R. Perris. 2002. Vascular PG-M/versican variants promote platelet adhesion at low shear rates and cooperate with collagens to induce aggregation. *FASEB J* 16:1903-1916.
- McCarty, O.J., Y. Zhao, N. Andrew, L.M. Machesky, D. Staunton, J. Frampton, and S.P. Watson. 2004. Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion. *J Thromb Haemost* 2:1823-1833.
- Meller, J., N.L. Malinin, S. Panigrahi, B.A. Kerr, A. Patil, Y. Ma, L. Venkateswaran, I.B. Rogozin, N. Mohandas, M.S. Ehlal, E.A. Podrez, J. Chinen, and T.V. Byzova. 2012. Novel aspects of Kindlin-3 function in humans based on a new case of leukocyte adhesion deficiency III. *J Thromb Haemost* 10:1397-1408.
- Merck. 2012. Data from TRACER study of vorapaxar, Merck's investigational medicine for cardiovascular disease, presented at AHA and published in NEJM. *Research & Development news Orlando 2011 Nov 13* <http://www.mercknewsroom.com/press-release/research-development-news/data-tracer-study-vorapaxar-mercks-investigational-medicine>
- Michelson, A.D. 2010. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nature reviews* 9:154-169.
- Midwood, K.S., T. Hussenet, B. Langlois, and G. Orend. 2011. Advances in tenascin-C biology. *Cell Mol Life Sci* 68:3175-3199.
- Midwood, K.S., and G. Orend. 2009. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 3:287-310.
- Miller, M.W., S. Basra, D.W. Kulp, P.C. Billings, S. Choi, M.P. Beavers, O.J. McCarty, Z. Zou, M.L. Kahn, J.S. Bennett, and W.F. DeGrado. 2009. Small-molecule inhibitors of integrin alpha2beta1 that prevent pathological thrombus formation via an allosteric mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:719-724.
- Miner, J.H., J. Cunningham, and J.R. Sanes. 1998. Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. *J Cell Biol* 143:1713-1723.
- Moake, J.L., N.A. Turner, N.A. Stathopoulos, L.H. Nolasco, and J.D. Hellums. 1986. Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *The Journal of clinical investigation* 78:1456-1461.
- Molino, M., D.F. Bainton, J.A. Hoxie, S.R. Coughlin, and L.F. Brass. 1997. Thrombin receptors on human platelets. Initial localization and subsequent redistribution during platelet activation. *The Journal of biological chemistry* 272:6011-6017.

- Morel, O., S. El Ghannudi, L. Jesel, B. Radulescu, N. Meyer, M.L. Wiesel, S. Caillard, U. Campia, B. Moulin, C. Gachet, and P. Ohlmann. 2011. Cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients undergoing percutaneous coronary intervention is mainly related to impaired P2Y12 inhibition by clopidogrel. *Journal of the American College of Cardiology* 57:399-408.
- Moretti, F.A., A.K. Chauhan, A. Iaconcig, F. Porro, F.E. Baralle, and A.F. Muro. 2007. A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *The Journal of biological chemistry* 282:28057-28062.
- Mori, T., K. Ono, Y. Kariya, T. Ogawa, S. Higashi, and K. Miyazaki. 2010. Laminin-3B11, a novel vascular-type laminin capable of inducing prominent lamellipodial protrusions in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 285:35068-35078.
- Morrow, D.A., B.M. Scirica, K.A. Fox, G. Berman, J. Strony, E. Veltri, M.P. Bonaca, P. Fish, C.H. McCabe, and E. Braunwald. 2009. Evaluation of a novel antiplatelet agent for secondary prevention in patients with a history of atherosclerotic disease: design and rationale for the Thrombin-Receptor Antagonist in Secondary Prevention of Atherothrombotic Ischemic Events (TRA 2 degrees P)-TIMI 50 trial. *Am Heart J* 158:335-341.e3.
- Morton, L.F., A.R. Peachey, L.S. Zijenah, A.H. Goodall, M.J. Humphries, and M.J. Barnes. 1994. Conformation-dependent platelet adhesion to collagen involving integrin alpha 2 beta 1-mediated and other mechanisms: multiple alpha 2 beta 1-recognition sites in collagen type I. *Biochem J* 299 (Pt 3):791-797.
- Moser, M., B. Nieswandt, S. Ussar, M. Pozgajova, and R. Fassler. 2008. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nature medicine* 14:325-330.
- Mouille, V. 2008. La R&D est en transition, pas en crise! *Pharmaceutiques* 159:44-46.
- Moura, R., M. Tjwa, P. Vandervoort, S. Van Kerckhoven, P. Holvoet, and M.F. Hoylaerts. 2008. Thrombospondin-1 deficiency accelerates atherosclerotic plaque maturation in ApoE^{-/-} mice. *Circ Res* 103:1181-1189.
- Muller-Nordhorn, J., S. Binting, S. Roll, and S.N. Willich. 2008. An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe. *Eur Heart J* 29:1316-1326.
- Mulvihill, J.N., H.G. Huisman, J.P. Cazenave, J.A. van Mourik, and W.G. van Aken. 1987. The use of monoclonal antibodies to human platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa to quantitate platelet deposition on artificial surfaces. *Thrombosis and haemostasis* 58:724-731.
- Mundell, S.J., J.F. Barton, M.B. Mayo-Martin, A.R. Hardy, and A.W. Poole. 2008. Rapid resensitization of purinergic receptor function in human platelets. *J Thromb Haemost* 6:1393-1404.
- Mundell, S.J., J. Luo, J.L. Benovic, P.B. Conley, and A.W. Poole. 2006. Distinct clathrin-coated pits sort different G protein-coupled receptor cargo. *Traffic* 7:1420-1431.
- Munnix, I.C., A. Strehl, M.J. Kuijpers, J.M. Auger, P.E. van der Meijden, M.A. van Zandvoort, M.G. oude Egbrink, B. Nieswandt, and J.W. Heemskerk. 2005. The glycoprotein VI-phospholipase Cgamma2 signaling pathway controls thrombus formation induced by collagen and tissue factor in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:2673-2678.
- Murray, R., and G.A. FitzGerald. 1989. Regulation of thromboxane receptor activation in human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:124-128.
- Muzard, J., M. Bouabdelli, M. Zahid, V. Ollivier, J.J. Lacapere, M. Jandrot-Perrus, and P. Billiald. 2009. Design and humanization of a murine scFv that blocks human platelet glycoprotein VI in vitro. *FEBS J* 276:4207-4222.

- Nagy, B., Jr., K. Bhavaraju, T. Getz, Y.S. Bynagari, S. Kim, and S.P. Kunapuli. 2009. Impaired activation of platelets lacking protein kinase C-theta isoform. *Blood* 113:2557-2567.
- Nakamura, T., P. Ruiz-Lozano, V. Lindner, D. Yabe, M. Taniwaki, Y. Furukawa, K. Kobuke, K. Tashiro, Z. Lu, N.L. Andon, R. Schaub, A. Matsumori, S. Sasayama, K.R. Chien, and T. Honjo. 1999. DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries. *The Journal of biological chemistry* 274:22476-22483.
- National Institutes of Health. 2012a. Combination therapy of F16IL2 and doxorubicin in solid tumour patients. ClinicalTrials.gov number NCT01131364. 2010 May 25 <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01131364>
- National Institutes of Health. 2012b. Glioblastoma multiforme (GBM) locoregional agent survival study - anti-tenascin radiolabeled antibody therapy (Glass-Art). ClinicalTrials.gov number NCT00615186. 2008 Feb 1 <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00615186>
- National Institutes of Health. 2012c. Revacept, an inhibitor of platelet adhesion in symptomatic carotid stenosis: a phase II, multicentre, randomised, dose-finding, double-blind and placebo controlled superiority study with parallel groups. ClinicalTrials.gov number NCT01645306. 2012 Jul 16 <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01645306>
- Nesbitt, W.S., P. Mangin, H.H. Salem, and S.P. Jackson. 2006. The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis. *J Mol Med* 84:989-995.
- Nesbitt, W.S., E. Westein, F.J. Tovar-Lopez, E. Tolouei, A. Mitchell, J. Fu, J. Carberry, A. Fouras, and S.P. Jackson. 2009. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation. *Nature medicine* 15:665-673.
- Ni, H., C.V. Denis, S. Subbarao, J.L. Degen, T.N. Sato, R.O. Hynes, and D.D. Wagner. 2000. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *The Journal of clinical investigation* 106:385-392.
- Ni, H., P.S. Yuen, J.M. Papalia, J.E. Trevithick, T. Sakai, R. Fassler, R.O. Hynes, and D.D. Wagner. 2003. Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:2415-2419.
- Nierodzik, M.L., A. Klepfish, and S. Karpatkin. 1995. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. *Thrombosis and haemostasis* 74:282-290.
- Nieswandt, B., C. Brakebusch, W. Bergmeier, V. Schulte, D. Bouvard, R. Mokhtari-Nejad, T. Lindhout, J.W. Heemskerk, H. Zirngibl, and R. Fassler. 2001a. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO journal* 20:2120-2130.
- Nieswandt, B., M. Moser, I. Pleines, D. Varga-Szabo, S. Monkley, D. Critchley, and R. Fassler. 2007. Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 204:3113-3118.
- Nieswandt, B., V. Schulte, W. Bergmeier, R. Mokhtari-Nejad, K. Rackebbrandt, J.P. Cazenave, P. Ohlmann, C. Gachet, and H. Zirngibl. 2001b. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *The Journal of experimental medicine* 193:459-469.

- Nieuwenhuis, H.K., J.W. Akkerman, W.P. Houdijk, and J.J. Sixma. 1985. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 318:470-472.
- Nigatu, A., W. Sime, G. Gorfu, T. Geberhiwot, I. Anduren, S. Ingerpuu, M. Doi, K. Tryggvason, P. Hjemdahl, and M. Patarroyo. 2006. Megakaryocytic cells synthesize and platelets secrete alpha5-laminins, and the endothelial laminin isoform laminin 10 (alpha5beta1gamma1) strongly promotes adhesion but not activation of platelets. *Thromb Haemost* 95:85-93.
- Nonne, C., N. Lenain, B. Hechler, P. Mangin, J.P. Cazenave, C. Gachet, and F. Lanza. 2005. Importance of platelet phospholipase Cgamma2 signaling in arterial thrombosis as a function of lesion severity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:1293-1298.
- Novartis. 2012. Novartis to restructure US business to strengthen competitive position in light of loss of Diovan® patent and announces charge for Rasilez®/Tekturna®. *Media release Basel 2012 Jan 13* <http://www.novartis.com/newsroom/media-releases/en/2012/1577296.shtml>
- Nurden, A., and P. Nurden. 2011. Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function. *J Thromb Haemost* 9 Suppl 1:76-91.
- Nurden, A.T. 2006. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 1:10.
- Nurden, P., C. Poujol, J. Winckler, R. Combrie, N. Pousseau, P.B. Conley, S. Levy-Toledano, A. Habib, and A.T. Nurden. 2003. 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* 101:1400-1408.
- Nylander, S., B. Kull, J.A. Bjorkman, J.C. Ulvinge, N. Oakes, B.M. Emanuelsson, M. Andersson, T. Skarby, T. Inghardt, O. Fjellstrom, and D. Gustafsson. 2012. Human target validation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)beta: effects on platelets and insulin sensitivity, using AZD6482 a novel PI3Kbeta inhibitor. *J Thromb Haemost* 10:2127-2136.
- O'Donoghue, M.L., D.L. Bhatt, S.D. Wiviott, S.G. Goodman, D.J. Fitzgerald, D.J. Angiolillo, S. Goto, G. Montalescot, U. Zeymer, P.E. Aylward, V. Guetta, D. Dudek, R. Ziecina, C.F. Contant, and M.D. Flather. 2011. Safety and tolerability of atopaxar in the treatment of patients with acute coronary syndromes: the lessons from antagonizing the cellular effects of Thrombin-Acute Coronary Syndromes Trial. *Circulation* 123:1843-1853.
- Ohlmann, P., A. Lecchi, A. El-Tayeb, C.E. Muller, M. Cattaneo, and C. Gachet. 2012. The platelet P2Y(12) receptor under normal and pathological conditions. Assessment with the radiolabeled selective antagonist [(3)H]PSB-0413. *Purinergic Signal Epub ahead of print*.
- Okwu, A.K., M.E. Ullian, and P.V. Halushka. 1992. Homologous desensitization of human platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 262:238-245.
- Oliver, M.F., and M.J. Davies. 1998. The atheromatous lipid core. *Eur Heart J* 19:16-18.
- OMS. 2011. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. éd. Mendis, S., Puska, P., Norrving, B. World Health Organization Press, 164 p., Geneva.
- Orend, G., and R. Chiquet-Ehrismann. 2000. Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Experimental cell research* 261:104-110.
- Osende, J.I., D. Shimbo, V. Fuster, M. Dubar, and J.J. Badimon. 2004. Antithrombotic effects of S18886, a novel orally active thromboxane A2 receptor antagonist. *J Thromb Haemost* 2:492-498.

- Oskarsson, T., S. Acharyya, X.H. Zhang, S. Vanharanta, S.F. Tavazoie, P.G. Morris, R.J. Downey, K. Manova-Todorova, E. Brogi, and J. Massague. 2011. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nature medicine* 17:867-874.
- Oury, C., M.J. Kuijpers, E. Toth-Zsomboki, A. Bonnefoy, S. Danloy, I. Vreys, M.A. Feijge, R. De Vos, J. Vermynen, J.W. Heemskerk, and M.F. Hoylaerts. 2003. Overexpression of the platelet P2X1 ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype. *Blood* 101:3969-3976.
- Panetta, C., J.T. Fallon, H. Zhang, F. Ramirez, and M. Taubman. 1998. Identification of Fibrillins as a Major Component of Coronary Atherosclerotic Plaques. *Cardiovascular Pathology* 7:69-74.
- Parsons, T.J., D.L. Haycraft, J.C. Hoak, and H. Sage. 1986. Interaction of platelets and purified collagens in a laminar flow model. *Thrombosis research* 43:435-443.
- Patrono, C., L.A. Garcia Rodriguez, R. Landolfi, and C. Baigent. 2005. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *The New England journal of medicine* 353:2373-2383.
- Paul, B.Z., G. Vilaire, S.P. Kunapuli, and J.S. Bennett. 2003. Concurrent signaling from Galphaq- and Galphai-coupled pathways is essential for agonist-induced alphavbeta3 activation on human platelets. *J Thromb Haemost* 1:814-820.
- Pedretti, M., Z. Rancic, A. Soltermann, B.A. Herzog, C. Schliemann, M. Lachat, D. Neri, and P.A. Kaufmann. 2010. Comparative immunohistochemical staining of atherosclerotic plaques using F16, F8 and L19: Three clinical-grade fully human antibodies. *Atherosclerosis* 208:382-389.
- Perdu, J., P. Boutouyrie, K. Lahlou-Laforet, P. Khau Van Kien, N. Denarie, E. Mousseaux, M. Sapoval, P. Julia, F. Zinzindohoue, P. Touraine, Y. Dumez, D. Trystram, C. Vignal-Clermont, A.P. Gimenez-Roqueplo, X. Jeunemaitre, and J.N. Fiessinger. 2006. Vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Presse Med* 35:1864-1875.
- Petajaniemi, N., M. Korhonen, J. Korttesmaa, K. Tryggvason, K. Sekiguchi, H. Fujiwara, L. Sorokin, L.E. Thornell, Z. Wondimu, D. Assefa, M. Patarroyo, and I. Virtanen. 2002. Localization of laminin alpha4-chain in developing and adult human tissues. *J Histochem Cytochem* 50:1113-1130.
- Phillips, D.R., L. Nannizzi-Alaimo, and K.S. Prasad. 2001. Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIb beta3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. *Thrombosis and haemostasis* 86:246-258.
- Polanowska-Grabowska, R., C.G. Simon, Jr., and A.R. Gear. 1999. Platelet adhesion to collagen type I, collagen type IV, von Willebrand factor, fibronectin, laminin and fibrinogen: rapid kinetics under shear. *Thrombosis and haemostasis* 81:118-123.
- Poot, A., T. Beugeling, J.P. Cazenave, A. Bantjes, and W.G. van Aken. 1988. Platelet deposition in a capillary perfusion model: quantitative and morphological aspects. *Biomaterials* 9:126-132.
- Preissner, K.T., and U. Reuning. 2011. Vitronectin in vascular context: facets of a multitasking matricellular protein. *Semin Thromb Hemost* 37:408-424.
- Prieto, A.L., C. Andersson-Fisone, and K.L. Crossin. 1992. Characterization of multiple adhesive and counteradhesive domains in the extracellular matrix protein cytotactin. *The Journal of cell biology* 119:663-678.
- Ralevic, V., and G. Burnstock. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492.
- Rauch, U., A. Saxena, S. Lorkowski, J. Rauterberg, H. Bjorkbacka, M. Durbeej, and A. Hultgardh-Nilsson. 2011. Laminin isoforms in atherosclerotic arteries from mice and man. *Histol Histopathol* 26:711-724.

- Reddick, R.L., S.H. Zhang, and N. Maeda. 1998. Aortic atherosclerotic plaque injury in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 140:297-305.
- Reed, M.J., L. Iruela-Arispe, E.R. O'Brien, T. Truong, T. LaBell, P. Bornstein, and E.H. Sage. 1995. Expression of thrombospondins by endothelial cells. Injury is correlated with TSP-1. *The American journal of pathology* 147:1068-1080.
- Reheman, A., P. Gross, H. Yang, P. Chen, D. Allen, V. Leytin, J. Freedman, and H. Ni. 2005. Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 3:875-883.
- Reiner, S., N. Ziegler, C. Leon, K. Lorenz, K. von Hayn, C. Gachet, M.J. Lohse, and C. Hoffmann. 2009. beta-Arrestin-2 interaction and internalization of the human P2Y1 receptor are dependent on C-terminal phosphorylation sites. *Molecular pharmacology* 76:1162-1171.
- Riessen, R., M. Fenchel, H. Chen, D.I. Axel, K.R. Karsch, and J. Lawler. 2001. Cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21:47-54.
- Robert, P., M. Canault, C. Farnarier, A. Nurden, C. Grosdidier, V. Barlogis, P. Bongrand, A. Pierres, H. Chambost, and M.C. Alessi. 2011. A novel leukocyte adhesion deficiency III variant: kindlin-3 deficiency results in integrin- and nonintegrin-related defects in different steps of leukocyte adhesion. *J Immunol* 186:5273-5283.
- Romaniuk, M.A., M.V. Tribulatti, V. Cattaneo, M.J. Laponi, F.C. Molinas, O. Campetella, and M. Schattner. 2010. Human platelets express and are activated by galectin-8. *Biochem J* 432:535-547.
- Ross, J.M., L.V. McIntire, J.L. Moake, H.J. Kuo, R.Q. Qian, R.W. Glanville, E. Schwartz, and J.H. Rand. 1998. Fibrillin containing elastic microfibrils support platelet adhesion under dynamic shear conditions. *Thrombosis and haemostasis* 79:155-161.
- Ross, J.M., L.V. McIntire, J.L. Moake, and J.H. Rand. 1995. Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under physiological flow conditions. *Blood* 85:1826-1835.
- Ruggeri, Z.M. 1999. Structure and function of von Willebrand factor. *Thrombosis and haemostasis* 82:576-584.
- Ruggeri, Z.M. 2002. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine* 8:1227-1234.
- Ruggeri, Z.M., J.N. Orje, R. Habermann, A.B. Federici, and A.J. Reininger. 2006. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood* 108:1903-1910.
- Ruiz, F.A., C.R. Lea, E. Oldfield, and R. Docampo. 2004. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *The Journal of biological chemistry* 279:44250-44257.
- Sabbah, L., and J. Lacotte. 2011. Préparation au concours de l'internat - module cardiologie vasculaire. éd. Vernazobres-Grego, coll. Médecine, 424 p., Paris.
- Saelman, E.U., H.K. Nieuwenhuis, K.M. Hese, P.G. de Groot, H.F. Heijnen, E.H. Sage, S. Williams, L. McKeown, H.R. Galnack, and J.J. Sixma. 1994. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood* 83:1244-1250.
- Saga, Y., T. Yagi, Y. Ikawa, T. Sakakura, and S. Aizawa. 1992. Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 6:1821-1831.
- Sakariassen, K.S., P.A. Aarts, P.G. de Groot, W.P. Houdijk, and J.J. Sixma. 1983. A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components. *J Lab Clin Med* 102:522-535.

- Salsmann, A., E. Schaffner-Reckinger, and N. Kieffer. 2006. RGD, the Rho'd to cell spreading. *Eur J Cell Biol* 85:249-254.
- Samama, M., C. Lecrubier, J. Conard, M. Hotchen, J. Breton-Gorius, B. Vargaftig, M. Chignard, M. Lagarde, and M. Dechavanne. 1981. Constitutional thrombocytopathy with subnormal response to thromboxane A2. *British journal of haematology* 48:293-303.
- Sambrano, G.R., E.J. Weiss, Y.W. Zheng, W. Huang, and S.R. Coughlin. 2001. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 413:74-78.
- Sanofi-Aventis. 2011. Communiqué de presse : résultats 2010. Paris 09 février 2011 <http://www.sanofi.fr/l/fr/fr/search.jsp>
- Sarratt, K.L., H. Chen, M.M. Zutter, S.A. Santoro, D.A. Hammer, and M.L. Kahn. 2005. GPVI and alpha2beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood* 106:1268-1277.
- Sasaki, T., R. Giltay, U. Talts, R. Timpl, and J.F. Talts. 2002. Expression and distribution of laminin alpha1 and alpha2 chains in embryonic and adult mouse tissues: an immunochemical approach. *Exp Cell Res* 275:185-199.
- Savage, B., F. Almus-Jacobs, and Z.M. Ruggeri. 1998. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94:657-666.
- Savage, B., M.H. Ginsberg, and Z.M. Ruggeri. 1999. Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow. *Blood* 94:2704-2715.
- Savage, B., and Z.M. Ruggeri. 1991. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. *The Journal of biological chemistry* 266:11227-11233.
- Savage, B., E. Saldivar, and Z.M. Ruggeri. 1996. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84:289-297.
- Savi, P., J.L. Zacharyus, N. Delesque-Touchard, C. Labouret, C. Herve, M.F. Uzabiaga, J.M. Pereillo, J.M. Culouscou, F. Bono, P. Ferrara, and J.M. Herbert. 2006. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:11069-11074.
- Schienk, S., D. Lienard, J. Gerain, M. Baumgartner, F.J. Lejeune, R. Chiquet-Ehrismann, and C. Ruegg. 1995. Rapid increase in plasma tenascin-C concentration after isolated limb perfusion with high-dose tumor necrosis factor (TNF), interferon gamma (IFN gamma) and melphalan for regionally advanced tumors. *International journal of cancer* 63:665-672.
- Schmid, C.L., and L.M. Bohn. 2009. Physiological and pharmacological implications of beta-arrestin regulation. *Pharmacology & therapeutics* 121:285-293.
- Schnapp, L.M., N. Hatch, D.M. Ramos, I.V. Klimanskaya, D. Sheppard, and R. Pytela. 1995. The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *The Journal of biological chemistry* 270:23196-23202.
- Schneider, S.W., S. Nuschele, A. Wixforth, C. Gorzelanny, A. Alexander-Katz, R.R. Netz, and M.F. Schneider. 2007. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:7899-7903.
- Schulz, C., S. Penz, C. Hoffmann, H. Langer, A. Gillitzer, S. Schneider, R. Brandl, S. Seidl, S. Massberg, B. Pichler, E. Kremmer, K. Stellos, T. Schonberger, W. Siess, and M. Gawaz. 2008. Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Res Cardiol* 103:356-367.

- Schwarz, U.R., U. Walter, and M. Eigenthaler. 2001. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol* 62:1153-1161.
- Scirica, B.M., M.P. Bonaca, E. Braunwald, G.M. De Ferrari, D. Isaza, B.S. Lewis, F. Mehrhof, P.A. Merlini, S.A. Murphy, M.S. Sabatine, M. Tendera, F. Van de Werf, R. Wilcox, and D.A. Morrow. 2012. Vorapaxar for secondary prevention of thrombotic events for patients with previous myocardial infarction: a prespecified subgroup analysis of the TRA 2 degrees P-TIMI 50 trial. *Lancet* 380:1317-1324.
- Sécurité Sociale. 2010. Rapports à la Commission des comptes de sécurité sociale - La prise en charge des pathologies cardiovasculaires en Europe. *Paris juin 2010* http://www.securite-sociale.fr/IMG/pdf/ccss201006_fic-10-4.pdf
- Senis, Y.A., M.G. Tomlinson, S. Ellison, A. Mazharian, J. Lim, Y. Zhao, K.N. Kornerup, J.M. Auger, S.G. Thomas, T. Dhanjal, N. Kalia, J.W. Zhu, A. Weiss, and S.P. Watson. 2009. The tyrosine phosphatase CD148 is an essential positive regulator of platelet activation and thrombosis. *Blood* 113:4942-4954.
- Serebruany, V.L., M. Kogushi, D. Dastros-Pitei, M. Flather, and D.L. Bhatt. 2009. The in-vitro effects of E5555, a protease-activated receptor (PAR)-1 antagonist, on platelet biomarkers in healthy volunteers and patients with coronary artery disease. *Thrombosis and haemostasis* 102:111-119.
- Serebruany, V.L., A.I. Malinin, R.M. Eisert, and D.C. Sane. 2004. Risk of bleeding complications with antiplatelet agents: meta-analysis of 338,191 patients enrolled in 50 randomized controlled trials. *American journal of hematology* 75:40-47.
- Shah, P.K. 2003. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *Journal of the American College of Cardiology* 41:15S-22S.
- Shahbazi, S., P.J. Lenting, C. Fribourg, V. Terraube, C.V. Denis, and O.D. Christophe. 2007. Characterization of the interaction between von Willebrand factor and osteoprotegerin. *J Thromb Haemost* 5:1956-1962.
- Sharpe, R.Y., M.J. Dennis, A. Nasim, M.J. McCarthy, R.D. Sayers, N.J. London, and A.R. Naylor. 2010. Dual antiplatelet therapy prior to carotid endarterectomy reduces post-operative embolisation and thromboembolic events: post-operative transcranial Doppler monitoring is now unnecessary. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 40:162-167.
- Shock, D.D., K. He, J.D. Wencel-Drake, and L.V. Parise. 1997. Ras activation in platelets after stimulation of the thrombin receptor, thromboxane A2 receptor or protein kinase C. *Biochem J* 321 (Pt 2):525-530.
- Siedlecki, C.A., B.J. Lestini, K.K. Kottke-Marchant, S.J. Eppell, D.L. Wilson, and R.E. Marchant. 1996. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 88:2939-2950.
- Siegel, J.M., C.P. Markou, D.N. Ku, and S.R. Hanson. 1994. A scaling law for wall shear rate through an arterial stenosis. *J Biomech Eng* 116:446-451.
- Simon-Assmann, P., G. Orend, E. Mammadova-Bach, C. Spenle, and O. Lefebvre. 2011. Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis. *Int J Dev Biol* 55:455-465.
- Singh, P., C. Carraher, and J.E. Schwarzbauer. 2010. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:397-419.
- Sivaraman, B., and R.A. Latour. 2010. The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount of adsorbed fibrinogen. *Biomaterials* 31:832-839.
- Skilbeck, C., S.M. Westwood, P.G. Walker, T. David, and G.B. Nash. 2001. Population of the vessel wall by leukocytes binding to P-selectin in a model of disturbed arterial flow. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21:1294-1300.
- Smith, E.B. 1995. Fibrinogen, fibrin and the arterial wall. *Eur Heart J* 16 Suppl A:11-14; discussion 14-15.

- Sofi, F., R. Marcucci, A.M. Gori, B. Giusti, R. Abbate, and G.F. Gensini. 2010. Clopidogrel non-responsiveness and risk of cardiovascular morbidity. An updated meta-analysis. *Thrombosis and haemostasis* 103:841-848.
- Sonnenberg, A., P.W. Modderman, and F. Hogervorst. 1988. Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature* 336:487-489.
- Sorescu, G.P., M. Sykes, D. Weiss, M.O. Platt, A. Saha, J. Hwang, N. Boyd, Y.C. Boo, J.D. Vega, W.R. Taylor, and H. Jo. 2003. Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response. *The Journal of biological chemistry* 278:31128-31135.
- Sorokin, L.M., F. Pausch, M. Frieser, S. Kroger, E. Ohage, and R. Deutzmann. 1997. Developmental regulation of the laminin alpha5 chain suggests a role in epithelial and endothelial cell maturation. *Dev Biol* 189:285-300.
- Sriramarao, P., M. Mendler, and M.A. Bourdon. 1993. Endothelial cell attachment and spreading on human tenascin is mediated by alpha 2 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Cell Sci* 105 (Pt 4):1001-1012.
- Sroka, I.C., T.A. Anderson, K.M. McDaniel, R.B. Nagle, M.B. Gretzer, and A.E. Cress. 2010. The laminin binding integrin alpha6beta1 in prostate cancer perineural invasion. *J Cell Physiol* 224:283-288.
- Stenina, O.I., S.Y. Desai, I. Krukovets, K. Kight, D. Janigro, E.J. Topol, and E.F. Plow. 2003. Thrombospondin-4 and its variants: expression and differential effects on endothelial cells. *Circulation* 108:1514-1519.
- Stenina, O.I., E.J. Topol, and E.F. Plow. 2007. Thrombospondins, their polymorphisms, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27:1886-1894.
- Stockmann, A., S. Hess, P. Declerck, R. Timpl, and K.T. Preissner. 1993. Multimeric vitronectin. Identification and characterization of conformation-dependent self-association of the adhesive protein. *The Journal of biological chemistry* 268:22874-22882.
- Stoll, G., C. Kleinschnitz, and B. Nieswandt. 2008. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood* 112:3555-3562.
- Strassel, C., C. Nonne, A. Eckly, T. David, C. Leon, M. Freund, J.P. Cazenave, C. Gachet, and F. Lanza. 2007. Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27:241-247.
- Sturgeon, S.A., C. Jones, J.A. Angus, and C.E. Wright. 2008. Advantages of a selective beta-isoform phosphoinositide 3-kinase antagonist, an anti-thrombotic agent devoid of other cardiovascular actions in the rat. *Eur J Pharmacol* 587:209-215.
- Szymanski, M.P., E. Metaxa, H. Meng, and J. Kolega. 2008. Endothelial cell layer subjected to impinging flow mimicking the apex of an arterial bifurcation. *Ann Biomed Eng* 36:1681-1689.
- Tabas, I., K.J. Williams, and J. Boren. 2007. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 116:1832-1844.
- Tablin, F., M.J. Rabier, N.J. Walker, V.M. Velasco, C.L. Field, and R.M. Leven. 1998. Tenascin-C is synthesised and secreted by megakaryocytes, whose adherence to intact tenascin is mediated by the integrin subunit beta(1). *Comp Haematol Int* 8:142-149.
- Takahashi, K., R.L. Mernaugh, D.B. Friedman, R. Weller, N. Tsuboi, H. Yamashita, V. Quaranta, and T. Takahashi. 2012. Thrombospondin-1 acts as a ligand for CD148 tyrosine phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:1985-1990.

- Takizawa, H., S. Nishimura, N. Takayama, A. Oda, H. Nishikii, Y. Morita, S. Kakinuma, S. Yamazaki, S. Okamura, N. Tamura, S. Goto, A. Sawaguchi, I. Manabe, K. Takatsu, H. Nakauchi, S. Takaki, and K. Eto. 2010. Lnk regulates integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo. *The Journal of clinical investigation* 120:179-190.
- Tandon, N.N., E.A. Holland, U. Kralisz, H.K. Kleinman, F.A. Robey, and G.A. Jamieson. 1991. Interaction of human platelets with laminin and identification of the 67 kDa laminin receptor on platelets. *Biochem J* 274 (Pt 2):535-542.
- Thiagarajan, P., and K. Kelly. 1988. Interaction of thrombin-stimulated platelets with vitronectin (S-protein of complement) substrate: inhibition by a monoclonal antibody to glycoprotein IIb-IIIa complex. *Thrombosis and haemostasis* 60:514-517.
- Thomas, D.W., R.B. Mannon, P.J. Mannon, A. Latour, J.A. Oliver, M. Hoffman, O. Smithies, B.H. Koller, and T.M. Coffman. 1998. Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2. *The Journal of clinical investigation* 102:1994-2001.
- Thyboll, J., J. Kortessmaa, R. Cao, R. Soininen, L. Wang, A. Iivanainen, L. Sorokin, M. Risling, Y. Cao, and K. Tryggvason. 2002. Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol Cell Biol* 22:1194-1202.
- Timpl, R., H. Rohde, P.G. Robey, S.I. Rennard, J.M. Foidart, and G.R. Martin. 1979. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254:9933-9937.
- Ting, H.J., and F.T. Khasawneh. 2010. Platelet function and isoprostane biology. Should isoprostanes be the newest member of the orphan-ligand family? *J Biomed Sci* 17:24.
- To, W.S., and K.S. Midwood. 2011. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4:21.
- Toussaint, J.F., M.P. Jacob, L. Lagrost, and J. Chapman. 2003. L'athérosclérose - physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques. éd. Masson, 776 p., Paris.
- Tovar-Lopez, F.J., G. Rosengarten, E. Westein, K. Khoshmanesh, S.P. Jackson, A. Mitchell, and W.S. Nesbitt. 2010. A microfluidics device to monitor platelet aggregation dynamics in response to strain rate micro-gradients in flowing blood. *Lab on a chip* 10:291-302.
- Trachiotis, G.D. 2010. Early antiplatelet therapy in coronary artery bypass grafting: a calculated benefit. *Innovations* 5:317-325.
- Tricoci, P., Z. Huang, C. Held, D.J. Moliterno, P.W. Armstrong, F. Van de Werf, H.D. White, P.E. Aylward, L. Wallentin, E. Chen, Y. Lokhnygina, J. Pei, S. Leonardi, T.L. Rorick, A.M. Kilian, L.H. Jennings, G. Ambrosio, C. Bode, A. Cequier, J.H. Cornel, R. Diaz, A. Erkan, K. Huber, M.P. Hudson, L. Jiang, J.W. Jukema, B.S. Lewis, A.M. Lincoff, G. Montalescot, J.C. Nicolau, H. Ogawa, M. Pfisterer, J.C. Prieto, W. Ruzyllo, P.R. Sinnaeve, R.F. Storey, M. Valgimigli, D.J. Whellan, P. Widimsky, J. Strony, R.A. Harrington, and K.W. Mahaffey. 2012. Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine* 366:20-33.
- Trikha, M., Z. Zhou, J. Timar, E. Raso, M. Kennel, E. Emmell, and M.T. Nakada. 2002. Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and alpha v beta 3 integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res* 62:2824-2833.
- Turitto, V.T., and H.J. Weiss. 1980. Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science* 207:541-543.
- Ulrichs, H., K. Silence, A. Schoolmeester, P. de Jaegere, S. Rossenu, J. Roodt, S. Priem, M. Lauwereys, P. Casteels, F. Van Bockstaele, K. Verschueren, P. Stanssens, J. Baumeister, and J.B. Holz. 2011. Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. *Blood* 118:757-765.

- Ungerer, M., K. Rosport, A. Bultmann, R. Piechatzek, K. Uhland, P. Schlieper, M. Gawaz, and G. Munch. 2011. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation* 123:1891-1899.
- Valiyaveetil, M., W. Feng, G. Mahabaleshwar, D.R. Phillips, T. Byzova, and E. Podrez. 2007. Phosphorylation of platelet alphaIIb beta3 is crucial for arterial thrombosis in vivo and microparticle generation. *Abstracts from American Heart Association Scientific Sessions Orlando 2007 Nov 4-7. Circulation* 116(16):II_75: Abstract Number 450.
- van Aken, B.E., D. Seiffert, T. Thinnes, and D.J. Loskutoff. 1997. Localization of vitronectin in the normal and atherosclerotic human vessel wall. *Histochem Cell Biol* 107:313-320.
- van Zanten, G.H., S. de Graaf, P.J. Slootweg, H.F. Heijnen, T.M. Connolly, P.G. de Groot, and J.J. Sixma. 1994. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *The Journal of clinical investigation* 93:615-632.
- Vandendries, E.R., J.R. Hamilton, S.R. Coughlin, B. Furie, and B.C. Furie. 2007. Par4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:288-292.
- Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt. 2008. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28:403-412.
- Verbeuren, T.J. 2006. Terutroban and endothelial TP receptors in atherogenesis. *Med Sci* 22:437-443.
- Verro, P., P.B. Gorelick, and D. Nguyen. 2008. Aspirin plus dipyridamole versus aspirin for prevention of vascular events after stroke or TIA: a meta-analysis. *Stroke* 39:1358-1363.
- VIDAL. 2012. Le dictionnaire - 88ème édition. éd. Vidal, 3024 p., Issy-les-Moulineaux.
- Vilahur, G., L. Casani, and L. Badimon. 2007. A thromboxane A2/prostaglandin H2 receptor antagonist (S18886) shows high antithrombotic efficacy in an experimental model of stent-induced thrombosis. *Thrombosis and haemostasis* 98:662-669.
- Virtanen, I., D. Gullberg, J. Rissanen, E. Kivilaakso, T. Kiviluoto, L.A. Laitinen, V.P. Lehto, and P. Ekblom. 2000. Laminin alpha1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp Cell Res* 257:298-309.
- Visiongain. 2012. Antithrombotic/anticoagulant drugs: world market 2012-2022. éd. Visiongain, 120 p., London.
- von Lukowicz, T., M. Silacci, M.T. Wyss, E. Trachsel, C. Lohmann, A. Buck, T.F. Luscher, D. Neri, and C.M. Matter. 2007. Human antibody against C domain of tenascin-C visualizes murine atherosclerotic plaques ex vivo. *J Nucl Med* 48:582-587.
- Wadanoli, M., D. Sako, G.D. Shaw, R.G. Schaub, Q. Wang, B. Tchernychev, J. Xu, T.J. Porter, and Q. Huang. 2007. The von Willebrand factor antagonist (GPG-290) prevents coronary thrombosis without prolongation of bleeding time. *Thrombosis and haemostasis* 98:397-405.
- Wagner, A., J.B. Ruidavets, M. Montaye, A. Bingham, J. Ferrieres, P. Amouyel, P. Ducimetière, and D. Arveiler. 2011. Evolution de la maladie coronaire en France de 2000 à 2007. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire du 8 novembre* 40-41:415-419.
- Wagner, C.L., M.A. Mascelli, D.S. Neblock, H.F. Weisman, B.S. Coller, and R.E. Jordan. 1996. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88:907-914.

- Wallner, K., C. Li, P.K. Shah, M.C. Fishbein, J.S. Forrester, S. Kaul, and B.G. Sharifi. 1999. Tenascin-C is expressed in macrophage-rich human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation* 99:1284-1289.
- Wallner, K., C. Li, P.K. Shah, K.J. Wu, S.M. Schwartz, and B.G. Sharifi. 2004. EGF-Like domain of tenascin-C is proapoptotic for cultured smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24:1416-1421.
- Wang, A., F. Liu, N. Dong, Z. Ma, J. Zhang, J. Su, Y. Zhao, and C. Ruan. 2010. Thrombospondin-1 and ADAMTS13 competitively bind to VWF A2 and A3 domains in vitro. *Thrombosis research* 126:e260-265.
- Wang, L., L. Song, P.K. Shah, and B.G. Sharifi. 2007. Tenascin-C gene deletion induces plaque hemorrhage and markedly accelerates atherosclerosis in ApoE-null mice: potential role of mast cells and eotaxin. *Abstracts from the American Heart Association Scientific Sessions Orlando 2007 Nov 4-7. Circulation* 116:II_34: Abstract Number 269.
- Wang, L., W. Wang, P.K. Shah, L. Song, M. Yang, and B.G. Sharifi. 2012. Deletion of tenascin-C gene exacerbates atherosclerosis and induces intraplaque hemorrhage in Apo-E-deficient mice. *Cardiovasc Pathol* 21:398-413.
- Watson, S.P., J.M. Auger, O.J. McCarty, and A.C. Pearce. 2005. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 3:1752-1762.
- Weber, P., D.R. Zimmermann, K.H. Winterhalter, and L. Vaughan. 1995. Tenascin-C binds heparin by its fibronectin type III domain five. *The Journal of biological chemistry* 270:4619-4623.
- Weiss, E.J., J.R. Hamilton, K.E. Lease, and S.R. Coughlin. 2002. Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood* 100:3240-3244.
- Welsh, R.C., S.V. Rao, U. Zeymer, V.P. Thompson, K. Huber, J. Kochman, M.W. McClure, D.D. Gretler, D.L. Bhatt, C.M. Gibson, D.J. Angiolillo, P.A. Gurbel, L.G. Berdan, G. Paynter, S. Leonardi, M. Madan, W.J. French, and R.A. Harrington. 2012. A Randomized, Double-Blind, Active-Controlled Phase 2 Trial to Evaluate a Novel Selective and Reversible Intravenous and Oral P2Y12 Inhibitor Elinogrel Versus Clopidogrel in Patients Undergoing Nonurgent Percutaneous Coronary Intervention: The INNOVATE-PCI Trial. *Circ Cardiovasc Interv* 5:336-346.
- Wewer, U.M., L.M. Shaw, R. Albrechtsen, and A.M. Mercurio. 1997. The integrin alpha 6 beta 1 promotes the survival of metastatic human breast carcinoma cells in mice. *Am J Pathol* 151:1191-1198.
- Wiviott, S.D., E. Braunwald, C.H. McCabe, I. Horvath, M. Keltai, J.P. Herrman, F. Van de Werf, W.E. Downey, B.M. Scirica, S.A. Murphy, and E.M. Antman. 2008. Intensive oral antiplatelet therapy for reduction of ischaemic events including stent thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with percutaneous coronary intervention and stenting in the TRITON-TIMI 38 trial: a subanalysis of a randomised trial. *Lancet* 371:1353-1363.
- Wiviott, S.D., E. Braunwald, C.H. McCabe, G. Montalescot, W. Ruzyllo, S. Gottlieb, F.J. Neumann, D. Ardissino, S. De Servi, S.A. Murphy, J. Riesmeyer, G. Weerakkody, C.M. Gibson, and E.M. Antman. 2007. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine* 357:2001-2015.
- Wiviott, S.D., M.D. Flather, M.L. O'Donoghue, S. Goto, D.J. Fitzgerald, F. Cura, P. Aylward, V. Guetta, D. Dudek, C.F. Contant, D.J. Angiolillo, and D.L. Bhatt. 2011. Randomized trial of atopaxar in the treatment of patients with coronary artery disease: the lessons from antagonizing the cellular effect of Thrombin-Coronary Artery Disease Trial. *Circulation* 123:1854-1863.

- Wondimu, Z., G. Gorfu, T. Kawataki, S. Smirnov, P. Yurchenco, K. Tryggvason, and M. Patarroyo. 2006. Characterization of commercial laminin preparations from human placenta in comparison to recombinant laminins 2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), 8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$), 10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$). *Matrix Biol* 25:89-93.
- Woulfe, D., H. Jiang, A. Morgans, R. Monks, M. Birnbaum, and L.F. Brass. 2004. Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2. *The Journal of clinical investigation* 113:441-450.
- Woulfe, D., H. Jiang, R. Mortensen, J. Yang, and L.F. Brass. 2002. Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets. *The Journal of biological chemistry* 277:23382-23390.
- Woulfe, D.S. 2010. Akt signaling in platelets and thrombosis. *Expert Rev Hematol* 3:81-91.
- Wu, D., M. Meiring, H.F. Kotze, H. Deckmyn, and N. Cauwenberghs. 2002. Inhibition of platelet glycoprotein Ib, glycoprotein IIb/IIIa, or both by monoclonal antibodies prevents arterial thrombosis in baboons. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22:323-328.
- Wu, J.H., K. Peppel, C.D. Nelson, F.T. Lin, T.A. Kohout, W.E. Miller, S.T. Exum, and N.J. Freedman. 2003. The adaptor protein beta-arrestin2 enhances endocytosis of the low density lipoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry* 278:44238-44245.
- Wu, K.K., G.C. Le Breton, H.H. Tai, and Y.C. Chen. 1981. Abnormal platelet response to thromboxane A2. *The Journal of clinical investigation* 67:1801-1804.
- Xiao, T., J. Takagi, B.S. Collier, J.H. Wang, and T.A. Springer. 2004. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 432:59-67.
- Yang, J.T., H. Rayburn, and R.O. Hynes. 1993. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development* 119:1093-1105.
- Yao, S.K., J. McNatt, K. Cui, H.V. Anderson, J.P. Maffrand, L.M. Buja, and J.T. Willerson. 1993. Combined ADP and thromboxane A2 antagonism prevents cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries in nonhuman primates. *Circulation* 88:2888-2893.
- Yao, S.K., J.C. Ober, J. McNatt, C.R. Benedict, M. Rosolowsky, H.V. Anderson, K. Cui, J.P. Maffrand, W.B. Campbell, L.M. Buja, and et al. 1992. ADP plays an important role in mediating platelet aggregation and cyclic flow variations in vivo in stenosed and endothelium-injured canine coronary arteries. *Circ Res* 70:39-48.
- Yeung, J., and M. Holinstat. 2012. Newer agents in antiplatelet therapy: a review. *J Blood Med* 3:33-42.
- Yokosaki, Y., H. Monis, J. Chen, and D. Sheppard. 1996. Differential effects of the integrins alpha9beta1, alpha5beta3, and alpha5beta6 on cell proliferative responses to tenascin. Roles of the beta subunit extracellular and cytoplasmic domains. *The Journal of biological chemistry* 271:24144-24150.
- Yokosaki, Y., E.L. Palmer, A.L. Prieto, K.L. Crossin, M.A. Bourdon, R. Pytela, and D. Sheppard. 1994. The integrin alpha 9 beta 1 mediates cell attachment to a non-RGD site in the third fibronectin type III repeat of tenascin. *The Journal of biological chemistry* 269:26691-26696.
- Yokoyama, K., H.P. Erickson, Y. Ikeda, and Y. Takada. 2000. Identification of amino acid sequences in fibrinogen gamma -chain and tenascin C C-terminal domains critical for binding to integrin alpha vbeta 3. *The Journal of biological chemistry* 275:16891-16898.
- Yoshikawa, T., K. Mitani, K. Kotosai, M. Nozako, G. Miyakoda, and Y. Yabuuchi. 2008. Antiatherogenic effects of cilostazol and probucol alone, and in combination in low

- density lipoprotein receptor-deficient mice fed with a high fat diet. *Horm Metab Res* 40:473-478.
- Yousuf, O., and D.L. Bhatt. 2011. The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 8:547-559.
- Yu, I.S., S.R. Lin, C.C. Huang, H.Y. Tseng, P.H. Huang, G.Y. Shi, H.L. Wu, C.L. Tang, P.H. Chu, L.H. Wang, K.K. Wu, and S.W. Lin. 2004. TXAS-deleted mice exhibit normal thrombopoiesis, defective hemostasis, and resistance to arachidonate-induced death. *Blood* 104:135-142.
- Zagzag, D., D.R. Friedlander, J. Dosik, S. Chikramane, W. Chan, M.A. Greco, J.C. Allen, K. Dorovini-Zis, and M. Grumet. 1996. Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. *Cancer Res* 56:182-189.
- Zahid, M., P. Mangin, S. Loyau, B. Hechler, P. Billiald, C. Gachet, and M. Jandrot-Perrus. 2012. The future of GPVI as an antithrombotic target. *J Thromb Haemost Epub ahead of print*.
- Zaidi, T.N., L.V. McIntire, D.H. Farrell, and P. Thiagarajan. 1996. Adhesion of platelets to surface-bound fibrinogen under flow. *Blood* 88:2967-2972.
- Zhang, G., B. Xiang, S. Ye, M. Chrzanowska-Wodnicka, A.J. Morris, T.K. Gartner, S.W. Whiteheart, G.C. White, 2nd, S.S. Smyth, and Z. Li. 2011. Distinct roles for Rap1b protein in platelet secretion and integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling. *The Journal of biological chemistry* 286:39466-39477.
- Zhang, X., K. Halvorsen, C.Z. Zhang, W.P. Wong, and T.A. Springer. 2009. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science* 324:1330-1334.
- Zisch, A.H., L. D'Alessandri, B. Ranscht, R. Falchetto, K.H. Winterhalter, and L. Vaughan. 1992. Neuronal cell adhesion molecule contactin/F11 binds to tenascin via its immunoglobulin-like domains. *The Journal of cell biology* 119:203-213.

Etude des mécanismes d'adhérence et d'activation des plaquettes sanguines appliquée à l'identification de nouvelles cibles anti-thrombotiques plus sûres

L'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes sanguines sont essentielles à l'hémostase mais peuvent également conduire à la thrombose artérielle sur plaque d'athérosclérose, aujourd'hui première cause de mortalité dans le monde. Les anti-thrombotiques actuels, dirigés contre l'activation et l'agrégation plaquettaires, ont une efficacité reconnue mais ont pour inconvénient d'augmenter le risque de saignement. L'objectif de cette thèse a été d'explorer de nouvelles stratégies réduisant la thrombose tout en préservant l'hémostase. L'utilisation de souris modifiées génétiquement a mis en évidence que l'intégrine $\alpha_6\beta_1$, impliquée dans l'adhérence des plaquettes aux laminines, joue un rôle critique en thrombose expérimentale mais pas en hémostase. De plus, nous avons montré dans un système de perfusion de sang qu'une protéine préférentiellement exprimée dans les plaques d'athérosclérose, la ténascine-C, permet l'adhérence et l'activation des plaquettes. En revanche, la β -arrestine-1, une protéine de signalisation, ne contribue que modestement aux fonctions plaquettaires et à la thrombose. En conclusion, ce travail a permis de dégager deux nouvelles pistes anti-thrombotiques potentiellement capables de préserver l'hémostase, basées sur le ciblage de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ ou de l'interaction plaquette/ténascine-C.

Mots clés : plaquettes, hémostase, thrombose artérielle, intégrine $\alpha_6\beta_1$, ténascine-C, β -arrestine

Study of blood platelet adhesion and activation mechanisms to identify safer antithrombotic targets

Following vascular injury, blood platelet adhesion, activation and aggregation are essential for hemostasis but can also lead to arterial thrombosis, which is a leading cause of death worldwide. Current antithrombotic drugs impede platelet activation and aggregation, thereby considerably reducing cardiovascular mortality, but their use is linked to an increased bleeding risk. This thesis aimed to explore more selective strategies causing minimal perturbation of hemostasis. The use of genetically-modified mice has revealed an unsuspected important contribution of integrin $\alpha_6\beta_1$, which mediates platelet adhesion to laminins, to experimental arterial thrombosis but not hemostasis. In addition, we showed that tenascin-C, an extracellular matrix protein overexpressed in atherosclerotic plaques, can support platelet adhesion and activation under flow. In contrast, the signaling protein β -arrestin-1 does not play a major role in platelet function, hemostasis and thrombosis. In conclusion, this work provides two interesting candidates, namely integrin $\alpha_6\beta_1$ and tenascin-C, to put into practice the concept of targeting thrombosis while minimally impairing hemostasis.

Keywords : platelets, hemostasis, arterial thrombosis, integrin $\alpha_6\beta_1$, tenascin-C, β -arrestin