HAL
open science

Etude du rôle des étapes initiales d'adhérence des plaquettes sanguines et du flux pulsatile dans l'agrégation plaquettaire

Éric Maurer

To cite this version:

Éric Maurer. Etude du rôle des étapes initiales d'adhérence des plaquettes sanguines et du flux pulsatile dans l'agrégation plaquettaire. Hématologie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ009 . tel-01296486

HAL Id: tel-01296486

https://theses.hal.science/tel-01296486v1

Submitted on 1 Apr 2016

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

Eric MAURER

Présentée et soutenue le 31 mars 2014

Etude du rôle des étapes initiales d'adhérence des plaquettes sanguines et du flux pulsatile dans l'agrégation plaquettaire

Directeur de thèse :

Monsieur François LANZA	DR1 INSERM, Université de Strasbourg

Rapporteurs externes :

Monsieur Christophe LAMAZE	DR2 INSERM, Institut Curie Paris
Monsieur Harry HEIJNEN	Professeur Associé, Université d'Utrecht

Examinateur :

Madame Monique DONTENWILL	DR2 CNRS, Université de Strasbourg
Madame Marie-Pierre GRATACAP	CR1 INSERM, Université de Toulouse III
Monsieur Christian GACHET	DR1 INSERM, 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 remercie sincèrement le Professeur Christian Gachet, qui en m'accueillant au sein de son laboratoire, m'a permis de travailler dans un environnement pluridisciplinaire très enrichissant. Merci pour sa confiance et les connaissances que j'ai acquises durant cette période de travail, ainsi que pour son regard toujours pertinent et constructif sur mes résultats.

A l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale et à la région Alsace, qui ont financé mon travail, je leur en suis reconnaissant.

Un grand merci aux membres de mon jury, Mesdames Dontenwill et Gratcap et Messieurs Heijnen et Lamaze de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse.

Je voudrais remercier tout particulièrement les docteurs François Lanza et Pierre Mangin, de m'avoir intégré si rapidement dans leur équipe. A votre contact j'ai pu découvrir la rigueur scientifique et la poursuite du travail bien fait. Grâce à vous ces quatre années de thèse ont été une expérience très positive et enrichissante. Pierre, que dire, déjà merci, pour ta confiance, ton soutien quotidien et tes encouragements constants. J'ai énormément appris à tes côtés. De plus, je tiens à te remercier pour la liberté que tu me laissais, jamais je ne me suis senti bridé dans mon travail et cela m'a vraiment permis de m'épanouir.

Mes remerciements s'adressent également à Catherine Bourdon et Nicolas Receveur pour tout le temps qu'ils ont consacré à me transmettre leurs connaissances avec beaucoup de professionnalisme. Merci pour votre aide, votre patience et votre bonne humeur. Merci pour votre persévérance et votre sens du travail bien fait. J'ai une pensée particulière pour Nico et nos journées « pulsatiles ». Et Catherine tu imposes le respect.

Merci à mes collègues thésards, Mathieu, Fabien et Thibault. Merci pour nos nombreux échanges, votre passion de la recherche et votre sens du travail d'équipe. Une pensée particulière pour Thibault et nos soirées passées à analyser nos données. Merci pour votre aide, votre patience et votre bonne humeur (Fabien merci pour les tomates).

J'ai bien sûr une grosse pensée, pour Véro et pour Sylvie, qui a été une deuxième maman, je vous remercie pour tout.

A tous les membres actuels du bureau des étudiants et ceux qui ont eu à partager mon deuxième bureau durant la rédaction, Léa, Salima, Emmanuelle, Alicia, Elmina et Tim.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de l'Unité 949, dont j'ai beaucoup apprécié la sympathie et la bonne humeur, qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse. Merci à tous ceux qui m'ont apporté leur aide, Anita, Béatrice, Blandine les nombreuses Catherine, Dominique, Fabienne, Josiane, Marie-Jeanne, Patricia (tu veux un mouchoir?),Valérie (je passerai encore te prendre un stylo),Simone, Stéphanie, Virginie, Manuella, Nathalie, Senay, Monique, Jean-Yves, Alain, Benjamin, Pascal, Philippe... Il est difficile pour moi, de vous exprimer ce que chacun d'entre vous m'a apporté durant ces années, mais sachez que vous avez tous contribué à ce travail. Merci également pour vos sourires et vos encouragements.

Durant cette thèse, j'ai eu la chance de participer à plusieurs collaborations. Merci d'abord à Majdi et à monsieur Griffiths, pour leurs aides en microfluidie. Je tiens également à remercier les différentes personnes qui m'ont aidé pour la PIV, en particulier Yannick et Eric, qui m'ont rapidement intégré et facilité notre travail.

J'ai également une pensée, pour les nombreuses personnes que j'ai pu cotoyer au cours de ces années, Ghina, Cécile, Samly, Amandine, Chao Jun.

Merci à ma famille, à mes parents, à ma sœur, à Alain et aux petites, pour votre amour, votre soutien, votre écoute et merci de m'avoir épauler dans les moments difficile.

Pour finir, merci à toi Anne, de partager au quotidien, mes angoisses, mes stress, mon silence parfois et ma surdité. Je te remercie pour ton soutien quotidien, et j'en ai vraiment eu besoin. J'aborde avec impatience et un peu d'angoisse la suite de notre aventure. A tout à l'heure, je rentrerai pour 7h10…

RESUME

Etude du rôle des étapes initiales d'adhérence des plaquettes sanguines et du flux pulsatile dans l'agrégation plaquettaire

Suite à une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent, s'activent et agrègent pour former un clou hémostatique qui stoppe le saignement. Dans un contexte pathologique, l'agrégation plaquettaire mène à la formation d'un thrombus qui peut obstruer une artère malade et entrainer des pathologies ischémiques graves. Les agents antiplaquettaires actuels, qui ciblent l'activation et l'agrégation des plaquettes, ont une efficacité reconnue, mais ont pour limites, la récurrence d'événements ischémiques et le risque hémorragique. L'objectif central de ma thèse a été d'explorer l'importance des étapes initiales d'adhérence des plaquettes aux protéines sous-endothéliales et du rôle du flux sanguin dans l'agrégation des plaquettes. J'ai pu montrer qu'un anticorps dirigé contre la GPIbβ, RAM.1, réduit la signalisation du complexe GPIb-V-IX et la formation de thrombi sans affecter l'hémostase. J'ai également mis en évidence que la fibronectine cellulaire fibrillaire est une surface thrombogène qui assure l'adhérence, l'activation, l'agrégation et l'activité pro-coagulante des plaquettes. Enfin, mes travaux indiquent que la pulsatilité du flux sanguin possède un rôle inverse sur la croissance des thrombi en conditions physiologique et pathologique. En conclusion, ce travail met en lumière l'importance des étapes initiales d'adhérence des plaquettes et de la pulsatilité du flux sanguin dans l'agrégation plaquettaire.

Mots clés : plaquettes, hémostase, thrombose artérielle, GPIbβ, fibronectine, flux pulsatile.

RESUME EN ANGLAIS

Role of the initial steps of platelet adhesion and importance of pulsatile flow in platelet aggregation

Following vascular injury, blood platelets adhere, become activated and aggregate to form a hemostatic plug which stops the bleeding. In a pathological context, platelet aggregation can also lead to the formation of an occlusive thrombus, responsible for life-threatening ischemic events. Current antiplatelet drugs targeting platelet activation and aggregation, have a recognized efficacy, but also present some limitations including the recurrence of ischemic events and the risk of bleeding. The aim of my thesis was to explore the importance of the initial step of platelet adhesion to subendothelial proteins and the role of pulsatile blood flow in platelet aggregation. I provided evidence that RAM.1 an antibody directed against GPIbβ, reduces GPIb signaling and thrombus formation without affecting hemostasis. My work also showed that fibrillar cellular fibronectin is a thrombogenic surface which supports efficient adhesion, activation, aggregation and procoagulant activity of platelets. Finally, I observed that the pulsatility of the blood flow has an inverse role in the growth of thrombi in physiological and pathological settings. In conclusion, this work highlights the importance of initial stages of platelet adhesion and of the blood flow pulsatility in platelet aggregation.

Keywords: platelets, hemostasis, arterial thrombosis, GPIbβ, fibronectin, pulsatile flow.

TABLE DES MATIERES

RESUME 5
RESUME EN ANGLAIS 7
TABLE DES MATIERES 8
LISTE DES ILLUSTRATIONS 12
ABREVIATIONS 14
INTRODUCTION GENERALE 17
1. Généralités sur l'hémostase 19
2. Les mécanismes moléculaires de l'hémostase 19
3. Généralités sur la thrombose artérielle 20
4. Buts de la thèse 21
4.1. Contexte et raisonnement 21
4.2. Principaux résultats 23
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 27
I. Généralités sur les plaquettes sanguines 29
II. Les récepteurs plaquettaires 33
II.1. Les récepteurs d'adhérence et d'agrégation 33
II.1.1. Le complexe GPIb-V-IX 33
II.1.1.1. La structure du complexe GPIb-V-IX 33
II.1.1.2. Les ligands du complexe GPIb-V-IX 34
II.1.1.3. Les partenaires intracellulaires du complexe GPIb-V-IX 36
II.1.1.4. La signalisation du complexe GPIb-V-IX 37
II.1.1.5. Rôle du complexe GPIb-V-IX en hémostase et en thrombose 38
II.2. La glycoprotéine VI 39
II.3. Les intégrines 42
II.3.1. Généralités 42
II.3.2. Intégrines plaquettaires 42
II.3.3. Mécanismes d'activation des intégrines plaquettaires 43
II.3.4. Les intégrines de la famille β_1 44
II.3.4.1. L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ 44
II.3.4.2. L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ 45

II.3.4.3. L'intégrine $\alpha_6\beta_1$ 45
II.3.5. Les intégrines de la famille β_3 46
II.3.5.1. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ 46
II.3.5.2. L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ 48
II.4. Les récepteurs des agonistes solubles 48
II.4.1. Les récepteurs des nucléotides 49
II.4.1.1. Le récepteur $P2Y_1$ 49
II.4.1.2. Le récepteur $P2Y_{12}$ 49
II.4.1.3. Le récepteur $P2X_1$ **50**
II.4.2. Les récepteurs TP (Thromboxane/prostaglandine) **52**
II.4.3. Les récepteurs PAR **55**
III. Le système cardio-vasculaire **58**
III.1. Le cœur **58**
III.1.1. Anatomie du cœur **58**
III.1.2. Le cycle cardiaque **58**
III.2. Le système circulatoire 62
III.2.1. Structure des vaisseaux sanguins 62
III.2.2. Les capillaires et les veines 64
III.2.3. Les artères 64
III.2.4. Les cellules de la paroi artérielle 65
III.2.4.1. Les cellules endothéliales 65
A) Propriétés anti-thrombotiques de l'endothélium quiescent 66
B) Propriétés pro-thrombotiques des cellules endothéliales activées 67
III.2.4.2. Les cellules musculaires lisses et les fibroblastes 69
III.3. La matrice extracellulaire 70
III.3.1. Les glycoprotéines 70
III.3.1.1. Les collagènes **71**
III.3.1.2. La fibronectine **73**
III.3.1.3. Le facteur Willebrand **78**
III.3.1.4. Le fibrinogène 81
III.3.1.5. Les Laminines 83
III.3.1.6. Les fibres élastiques 85
III.3.2. Les protéoglycanes 87

IV. La thrombose artérielle 88
IV.1. La physiopathologie 88
IV.2. Les traitements et préventions de la thrombose artérielle 90
IV.2.1. Approches chirurgicales 90
IV.2.2. Approches médicamenteuses 92
IV.2.2.1. Les antiplaquettaires 92
IV.2.2.1.1. L'aspirine 92
IV.2.2.1.2. Les antagonistes du récepteur $P2Y_{12}$ 93
IV.2.2.1.3. Les inhibiteurs des Phosphodiestérases 95
IV.2.2.1.4. Les antagonistes d'$\alpha_{IIb}\beta_3$ 95
V. Flux sanguin et fonctions plaquettaires 98
V.1. Notions de rhéologie 98
V.1.1. La rhéologie du sang 99
V.1.1.1. Le sang, un fluide rhéofluidifiant 99
V.1.1.2. Le sang est considéré comme un fluide newtonien au niveau de la paroi artérielle 101
V.1.1.3. Impact de la géométrie vasculaire sur la rhéologie sanguine 102
V.2. Rôle du flux sanguin sur les fonctions plaquettaires 104
V.2.1. Rôle du flux sanguin sur l'adhérence plaquettaire 104
V.2.2. Rôle du flux sanguin sur la signalisation et l'activation plaquettaire 105
V.2.3. Rôle du flux sanguin sur l'agrégation plaquettaire 106
RESULTATS EXPERIMENTAUX 108
1. Le ciblage de la GPIbβ inhibe l'activation induite par le complexe GPIb-V-IX, ainsi que la thrombose artérielle 109
2. Rôle de la fibronectine cellulaire, présente dans le sous-endothélium sous une forme fibrillaire, dans l'adhérence et l'activation des plaquettes 114
3. Etude de l'effet de flux sanguins complexes sur l'agrégation plaquettaire 119
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 123
BIBLIOGRAPHIE 134

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Rôle des plaquettes dans l'hémostase 18
Figure 2 : Ultrastructure de la plaquette 28
Figure 3 : Modifications morphologiques de la plaquette au cours de son activation 31
Figure 4 : Représentation schématique de la structure du complexe GPIb-V-IX et de ses principaux ligands 32
Figure 5 : Représentation schématique des partenaires intracellulaires du complexe GPIb-V-IX. 37
Figure 6 : Schématisation de la signalisation déclenchée par la GPVI. 40
Figure 7 : Schématisation des trois conformations adoptées par une intégrine 43
Figure 8 : Schématisation de la signalisation déclenchée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. 47
Figure 9 : Schématisation de la signalisation plaquettaire déclenchée par les récepteurs P2. . 51
Figure 10 : Schématisation de la signalisation déclenchée par les récepteurs TP. 53
Figure 11 : Schématisation de l'activation des récepteurs PAR. 54
Figure 12 : Schématisation de la signalisation déclenchée par les récepteurs PAR. 56
Figure 13 : Représentation schématique du cœur humain 59
Figure 14 : Représentation schématique du cycle cardiaque. 61
Figure 15 : Le système circulatoire 63
Figure 16 : Structure schématique d'une artère saine 63
Figure 17 : Propriétés anti-thombotiques de l'endothélium quiescent. 67
Figure 18 : Propriétés pro-thrombotiques de l'endothélium activé. 68
Figure 19 : Schématisation et micrographie électronique de l'organisation supramoléculaire de différents types de collagènes 72
Figure 20 : Composition d'un dimère de FNc et FNp 74
Figure 21 : Dynamique d'assemblage des fibres de FN 76
Figure 22 : Schéma des domaines structuraux et fonctionnels du FW et d'un multimère de FW. 79
Figure 23 : Schématisation de la molécule de fibrinogène 82
Figure 24 : Représentation schématique d'une molécule de laminine 84
Figure 25 : Représentation des différentes couches de la paroi artérielle 86
Figure 26: Représentation schématique d'un protéoglycane. 87
Figure 27 : Représentation schématique d'une artère sténosée 89
Figure 28 : Les principales approches chirurgicales de revascularisation. 91
Figure 29 : Les différents agents antiplaquettaires utilisés en clinique. 96
Figure 30 : Modélisation de l'écoulement d'un fluide newtonien dans un cylindre. 97
Figure 31 : Schématisation du comportement des globules rouges. 100
Figure 32 : Schématisation du processus de margination des plaquettes 101
Figure 33 : Représentation schématique de la rhéologie sanguine au niveau d'un vaisseau sténosé. 103
Figure 34 : Formation de fibres de fibronectine cellulaire *in vitro* 116

Tableau 1 : Taux et contraintes de cisaillement moyens mesurés à la paroi de différents vaisseaux humains. 102

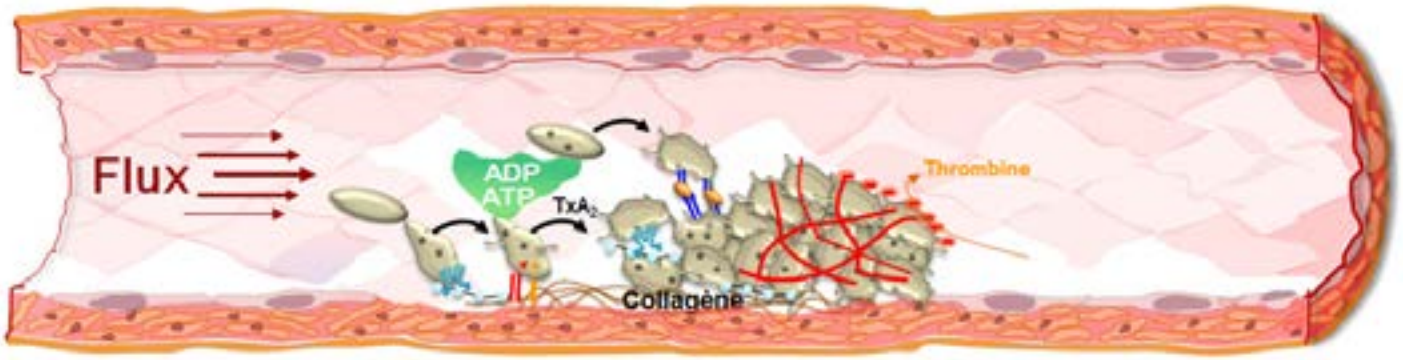
ABREVIATIONS

AA	Acide arachidonique
Ac	Adénylate cyclase
ADAMTS13	A disintegrin and metalloproteinase with TSP type 1 repeat-13
ADP	Adénosine 5’-diphosphate
AMP	Adénosine 5’-monophosphate
AMPc	Adénosine 3’,5’-monophosphate cyclique
ApoE	Apolipoprotéine E
AT	Antithrombine
ATC	Antithrombotic Trialists' Collaboration
ATP	Adénosine 5’-triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
CalDAG-GEFI	Ca^{2+}- and DAG-regulated GEF I
CAT	Calibrated automated thrombin
CE	Cellule endothéliale
CHO	Chinese Hamster Ovary
CML	Cellule musculaire lisse
COX	Cyclo-oxygénase
DAG	Diacylglycérol
ED	Extradomaine
ERL	Elément riche en leucine
Fab	Antigen-binding fragment
FAK	Focal adhesion kinase
FeCl3	Chlorure de fer
FG	Fibrinogène
FN	Fibronectine
FNc	Fibronectine cellulaire
FNcF	Fibronectine cellulaire fibrillaire
FNp	Fibronectine plasmatique
FNpF	Fibronectine plasmatique fibrillaire
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FT	Facteur tissulaire
FW	Facteur Willebrand
FXI	Facteur XI de la coagulation
FXII	Facteur XII de la coagulation
Gads	Grb2 adaptor downstream of Shc
GAG	Glycosaminoglycane
GB	Globule blanc
GCs	Guanylate cyclase soluble
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GMP	Guanosine 3’,5’-monophosphate
GMPc	Guanosine 3’,5’-monophosphate cyclique

GP	Glycoprotéine
GPL	Glycérophospholipide
GPO	Glycine-Proline-Pyrrolysine
GR	Globule rouge
IP	Prostacyclin receptor
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activatory motif
LAT	Linker for activation of T cells
LEE	Limitante élastique externe
LEI	Limitante élastique interne
LM	Laminine
MEC	Matrice extracellulaire
MLC	Myosin light chain
MLCP	Myosin light chain phosphatase
MT	Microtubule
NO	Monoxyde d'azote
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAF	Platelet-activating factor
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAR	Protease-activated receptor
PDE	Phosphodiestérase des nucléotides cycliques
PF4	Platelet factor 4
PG	Protéoglycane
PGH_2	Prostaglandine H_2
PGI_2	Prostacycline
PI-3K	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
PSGL-1	P-selectin GP ligand-1
RAM	Rat Anti Mouse
RGD	Arginine-glycine-aspartate
ROCK	Rho-associated protein kinase
SBS	Syndrome Bernard Soulier
SCA	Syndrome coronarien aigu
SCO	Système canaliculaire ouvert
SLP-76	Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
Syk	Spleen tyrosine kinase
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TGFβ	Transforming growth fact□r b
TLR4	Toll like receptor 4
TM	Thrombomoduline

TP	Thromboxane/prostaglandin receptor
t-PA	Tissue plasminogen activator
TS	Thromboxane synthétase
TSP-1	Thrombospondine-1
TxA2	Thromboxane A_2
u-PA	Urokinase plasminogen activator
VD	Ventricule droit
VG	Ventricule gauche
γRFc	Chaîne γ des récepteurs Fc

INTRODUCTION GENERALE



Capture **Adhérence stable** **Agrégation** **Coagulation**

Activation **Sécrétion**

Cellule endothéliale

Cellule musculaire lisse

Collagène

Facteur Willebrand

Fibrinogène

Fibrine

Complexe GPIb-V-IX

Intégrine $\alpha_2\beta_1$

GPVI

Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Granule plaquettaire

Filopode

Phospholipides pro-coagulants

Figure 1 : Rôle des plaquettes dans l'hémostase

ADP, adénosine 5'-diphosphate; ATP, adénosine 5'-triphosphate; CML, cellule musculaire lisse; FW, facteur Willebrand; GP, glycoprotéine; TxA_2, thromboxane A_2.

1. Généralités sur l'hémostase

L'hémostase regroupe l'ensemble des processus physiologiques qui arrêtent le saignement suite à une lésion vasculaire **(Versteeg, Heemskerk et al. 2013)**. L'hémostase se compose de trois étapes intriquées et interdépendantes, qui se nomment l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse. Ces trois étapes nécessitent une contribution adéquate de trois éléments, qui ont été rassemblés en une triade par le médecin allemand Rudolf Virchow : i) la paroi vasculaire, ii) les éléments du sang, en particulier les plaquettes et certaines protéines plasmatiques, et iii) les forces hémodynamiques. L'hémostase primaire comprend une vasoconstriction, qui en ralentissant le débit sanguin réduit l'hémorragie, et conduit à la formation d'un clou plaquettaire obturant la brèche vasculaire. La coagulation résulte d'une cascade enzymatique qui mène à la génération de thrombine puis à la formation d'un réseau de fibrine insoluble permettant de consolider le clou plaquettaire. Enfin, la fibrinolyse résorbe le clou fibrino-plaquettaire, rétablissant une circulation sanguine normale **(Furie and Furie 2008, Versteeg, Heemskerk et al. 2013)**.

2. Les mécanismes moléculaires de l'hémostase

Suite à une lésion vasculaire, des protéines du sous-endothélium sont exposées au sang circulant. En présence de flux élevés, rencontrés au niveau des artérioles et de la microcirculation, l'étape initiale de capture des plaquettes est assurée par l'interaction du complexe glycoprotéique (GP) Ib-V-IX plaquettaire avec le facteur Willebrand (FW) sous-endothélial **(Lanza, Gachet et al. 2008)**. L'adhérence stable est permise par des intégrines, notamment $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$, dont les principaux ligands sont respectivement, le collagène, la fibronectine, la laminine, la vitronectine et le fibrinogène (Figure 1) **(Savage, Almus-Jacobs et al. 1998, Ruggeri 2002)**. Cette étape permet l'interaction de la GPVI avec le collagène, qui initie une activation plaquettaire soutenue, entrainant un changement de forme des plaquettes, qui passent d'une forme discoïde à une morphologie sphérique avec émission de filopodes **(Jackson 2011)**. Elle est également responsable de la sécrétion du contenu des granules, notamment de l'adénosine 5'-diphosphate (ADP) et de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP), et de l'augmentation de l'affinité des intégrines pour leurs ligands. Enfin, les plaquettes activées synthétisent et relarguent du thromboxane A2 (TxA_2). Les agonistes

solubles, principalement l'ADP et le TxA_2, constituent des boucles d'amplification qui augmentent l'affinité de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ pour le fibrinogène, permettant l'agrégation des plaquettes **(Ruggeri 2002, Jackson 2011)**. Ce clou plaquettaire est consolidé lors du processus de coagulation. Ce dernier est initié par le facteur tissulaire, qui est exposé au site de lésion, et est renforcé par l'exposition de phospholipides anioniques, tels que les phosphatidylsérines à la surface des plaquettes activées **(Heemskerk, Vuist et al. 1997)**. La coagulation est une cascade de réaction enzymatique aboutissant à la génération de la thrombine, qui clive le fibrinogène soluble afin de former un réseau fibrillaire de fibrine stabilisant l'agrégat plaquettaire. La thrombine est également un puissant agoniste plaquettaire, qui déclenche notamment la rétraction du caillot fibrino-plaquettaire **(Lanza, Gachet et al. 2008)**. Dans les heures qui suivent et parallèlement au processus de cicatrisation de la paroi, les plaquettes sont phagocytées et la fibrine est dissoute sous l'action de la plasmine, rétablissant une circulation sanguine normale **(Furie and Furie 2008, Versteeg, Heemskerk et al. 2013)**. La formation d'un agrégat permet de limiter les pertes sanguines lors de l'hémostase, mais peut conduire dans une situation pathologique, à l'occlusion d'un vaisseau, lors d'une thrombose artérielle.

3. Généralités sur la thrombose artérielle

La thrombose artérielle est un processus survenant généralement dans des vaisseaux malades présentant un épaississement de la paroi vasculaire suite à la formation de plaques athéromateuses. La croissance des lésions athéromateuses entraîne un rétrécissement progressif de la lumière du vaisseau qui impacte les conditions hémorhéologiques locales et affecte ainsi les fonctions adhésives et activatrices des plaquettes **(Nesbitt, Mangin et al. 2006)**. L'érosion ou la rupture d'une plaque d'athérosclérose expose une surface thrombogène, entrainant l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes qui peuvent former des thrombi occlusifs, empêchant l'irrigation des tissus situés en aval et entrainant leur nécrose. Le thrombus peut également emboliser, relâchant des fragments qui peuvent bloquer des vaisseaux de plus petits calibres **(Jobin 1995)**. Ces phénomènes sont responsables de pathologies ischémiques graves comme les syndromes coronariens aigus (infarctus du myocarde), les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et l'ischémie des membres inférieurs **(Jackson 2011)**.

4. Buts de la thèse

4.1. Contexte et raisonnement

La thrombose représente la première cause de mortalité dans le monde en 2011 **(OMS, 2011)**. Elle met en jeu les éléments de la triade énoncée par Rudolf Virchow, à savoir la paroi vasculaire, le flux sanguin et les éléments figurés du sang dont la plaquette sanguine. Cette dernière est un acteur majeur de la thrombose artérielle et représente de ce fait, une cible thérapeutique majeure. Les agents antiplaquettaires développés à ce jour, permettent un traitement efficace des thromboses en phase aiguë, et limitent de manière significative le risque de récidives **(Michelson 2010, Yousuf and Bhatt 2011)**. Les limites majeures des traitements antiplaquettaires sont la récurrence d'événements vasculaires ischémiques et le risque hémorragique, dont l'importance est particulièrement élevée chez les patients souffrant d'AVC. Les agents antiplaquettaires ciblent soit les boucles amplificatrices de l'activation des plaquettes ($P2Y_{12}$, synthèse du TxA_2), soit directement l'agrégation plaquettaire ($\alpha_{IIb}\beta_3$) en empêchant la liaison du fibrinogène aux plaquettes activées **(Michelson 2010, Yousuf and Bhatt 2011)**. Dans cette optique, l'objectif central de ma thèse a été d'étudier les étapes initiales d'adhérence et d'activation des plaquettes pour évaluer la pertinence de leur ciblage dans le cadre d'une stratégie anti-thrombotique. Je me suis intéressé : i) au ciblage de la GPIbβ du complexe GPIb-V-IX, ii) aux propriétés adhésives et activatrices de la fibronectine cellulaire fibrillaire, présente dans la paroi artérielle saine et malade et enfin iii) au rôle de flux sanguins complexes sur la formation d'un thrombus, qu'ils soient pulsatiles ou altérés par une sténose.

i) Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au complexe GPIb-V-IX, un récepteur assurant l'étape initiale de recrutement des plaquettes au niveau d'une lésion vasculaire. Le ciblage de la GPIbα est reconnu pour être une stratégie anti-thrombotique. Des essais clinique de phase II, suggèrent cependant que cette approche pourrait entrainer un risque de saignement important **(Markus, McCollum et al. 2011)**. Une étude réalisée au laboratoire avait montré que l'utilisation de RAM.1, un anticorps monoclonal de rat ciblant la partie extracellulaire de la GPIbβ de souris, inhibe l'adhérence plaquettaire au FW en condition de flux et réduit la phosphorylation d'une sérine en position 166 du domaine intracellulaire de la GPIbβ **(Perrault, Moog et al. 2001, Perrault, Mangin et al. 2003)**. Un

de mes travaux de thèse a consisté à évaluer l'impact de RAM.1 d'une part sur la signalisation et l'activité pro-coagulante du complexe GPIb-V-IX et d'autre part sur la formation de thromboses *in vitro* et *in vivo* **(Maurer, Tang et al. 2013)**.

ii) Dans un second temps, nous avons porté notre intérêt sur l'étape d'adhérence stable des plaquettes avec une attention particulière sur l'interaction plaquette/fibronectine (FN). Au niveau vasculaire, la FN est retrouvée sous deux formes : i) la FN plasmatique (FNp) synthétisée par les hépatocytes et qui est retrouvée soit sous une forme dimérique circulante, soit sous une forme fibrillaire dans la paroi vasculaire; ii) la FN cellulaire (FNc) exprimée notamment par les cellules de la paroi vasculaire et présente dans le sous-endothélium sous une forme fibrillaire **(To and Midwood 2011)**. Il a été rapporté que cette dernière est surexprimée lors de différents processus pathologiques, dont l'athérosclérose, suggérant qu'elle pourrait participer à la thrombose artérielle **(Kakolyris, Karakitsos et al. 1995, To and Midwood 2011)**. Alors que la FNp a été décrite pour assurer l'adhérence et l'activation des plaquettes et participer à la croissance du thrombus **(Beumer, MJ et al. 1994)**, le rôle de la forme fibrillaire des fibronectines plasmatique et cellulaire n'a pas encore été évalué. La seconde partie de ma thèse a visé à étudier la capacité des fibronectines fibrillaires présentes dans le sous-endothélium, en particulier la forme cellulaire fibrillaire, à moduler diverses réponses plaquettaires en condition de flux.

iii) Dans une troisième partie, nous nous sommes intéressés au rôle de flux sanguins complexes sur la formation d'un thrombus. L'importance du flux en thrombose a été proposée au milieu du XIXème siècle par Rudolf Virchow. Cependant les mécanismes par lesquels le flux et les forces qu'il exerce influencent la formation d'un thrombus restent mal compris. Le flux sanguin, en raison de l'activité cardiaque, est de nature pulsatile. A ce jour l'importance de la pulsatilité dans l'agrégation des plaquettes reste mal connue. D'autre part, il a été proposé que les flux perturbés que l'on retrouve dans un vaisseau sténosé épaissi par une plaque d'athérosclérose augmentent la formation d'un thrombus, par un processus qui reste mal compris. L'objectif de ce travail a été d'évaluer *in vitro*, l'effet de la pulsatilité sur la formation de thrombi en condition de flux physiologique et pathologique. Pour cela, j'ai utilisé une pompe programmable permettant de reproduire la pulsatilité que l'on retrouve dans une coronaire ou dans une carotide. J'ai également développé une chambre microfluidique

originale contenant des rétrécissements permettant de reproduire des flux perturbés que l'on retrouve au niveau d'un vaisseau sténosé.

4.2. Principaux résultats

i. Le ciblage de la sous-unité GPIbβ du complexe GPIb-V-IX inhibe l'activation et l'activité pro-coagulante des plaquettes ainsi que la thrombose artérielle.

Le complexe GPIb-V-IX régule l'adhérence, l'activation et l'activité pro-coagulante des plaquettes **(Lanza, Gachet et al. 2008)**. Nous avions rapporté que RAM.1, un anticorps monoclonal de rat dirigé contre le domaine extracellulaire de la GPIbβ de souris, diminue l'adhérence des plaquettes et de cellules CHO transfectées avec le complexe GPIb-IX humain au FW, en condition de flux **(Perrault, Moog et al. 2001, Perrault, Mangin et al. 2003)**. Dans cette étude, nous avons poursuivi l'évaluation des effets de RAM.1, sur les fonctions plaquettaires médiées par le complexe GPIb-V-IX, et dans la formation d'un thrombus *in vitro* et *in vivo*, en vue d'évaluer l'importance de la GPIbβ sur les fonctions plaquettaires et comme cible anti-thrombotique. Nos résultats montrent que RAM.1 diminue l'émission de filopodes de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) Ib-IX et de plaquettes adhérentes au FW, suggérant que cet anticorps inhibe la signalisation du complexe GPIb-V-IX. RAM.1 diminue également la mobilisation des stocks internes de calcium de plaquettes adhérentes au FW, confirmant que le ciblage de la GPIbβ réduit la signalisation en aval du complexe. Par ailleurs, RAM.1 réduit la génération de thrombine mais n'affecte pas l'exposition de phosphatidylsérine. De plus, RAM.1 inhibe la formation de thrombi après perfusion de sang anticoagulé sur une surface recouverte de collagène. Cet effet a été confirmé *in vivo* : l'injection de fragments F(ab)'2 de RAM.1 diminue la formation d'un thrombus provoqué après lésion d'artérioles mésentériques par un faisceau laser et de l'aorte abdominale par une lésion mécanique. En revanche, les F(ab)'2 RAM.1 ne prolongent pas le temps de saignement à la queue des souris, et n'augmente pas le volume de sang perdu. Ces résultats indiquent que le ciblage d'une autre sous-unité du complexe GPIb-V-IX que GPIbα peut conduire à un effet anti-thrombotique. Une telle approche pourrait présenter l'avantage d'être plus sûre, puisqu'elle permettrait de réduire la formation de thrombi sans affecter l'hémostase.

ii. Rôle de la fibronectine fibrillaire sous-endothéliale sur les fonctions des plaquettes.

La capacité des FN cellulaires et plasmatiques, que l'on retrouve dans la paroi vasculaire dans une conformation fibrillaire, à réguler les fonctions des plaquettes et à participer à la thrombose artérielle reste mal comprise. Dans cette étude, nous avons évalué la capacité des FN pariétales, en particulier la forme cellulaire fibrillaire, à moduler diverses réponses plaquettaires en condition de flux. L'une des difficultés techniques de ce travail a été de former de la FN fibrillaire, qui est commercialisée sous forme dimérique. J'ai réussi à former un réseau fibrillaire d'une manière originale, en étirant mécaniquement des dimères de FN plasmatique et cellulaire immobilisés grâce à une pompe à aspiration. La perfusion de sang total anticoagulé sur les FN cellulaires et plasmatiques, sous forme dimérique, permet une adhérence très faible des plaquettes. En revanche, avec les formes fibrillaires de ces glycoprotéines, nous avons observé l'adhérence de nombreuses plaquettes suivie de la formation d'agrégats. La forme cellulaire est beaucoup plus réactive et permet la formation d'agrégats de plus grands volumes. La suite de l'étude s'est focalisée sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adhérence, l'activation et l'agrégation sur la fibronectine cellulaire fibrillaire. Les étapes initiales d'adhérence et d'activation mises en évidence par l'extension de filopodes et une augmentation des concentrations de calcium intracellulaire, dépendent des intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$, mais pas du complexe GPIb-IX ni de la GPVI. La croissance du thrombus est médiée par ces mêmes intégrines, par le complexe GPIb-IX, la GPVI et le Toll like receptor 4 (TLR4). Lors de la formation de thrombi, un nombre important de plaquettes deviennent pro-coagulantes, aboutissant à la génération de fibrine. En conclusion, ce travail indique que la FN cellulaire fibrillaire est une surface thrombogène qui soutient efficacement l'adhérence, l'activation, l'agrégation et l'activité pro-coagulante des plaquettes par le jeu d'une série de récepteurs, comprenant les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$, la GPVI, le complexe GPIb-IX et le TLR4.

iii. Etude de l’effet de flux sanguins complexes sur l’agrégation plaquettaire.

Le rôle de la composante pulsatile de la circulation sanguine artérielle sur l'agrégation plaquettaire est mal apprécié. Nous avons déterminé l'effet de la pulsatilité : i) dans des conditions mimant les conditions d’un vaisseau sain, en utilisant des microcapillaires droits et ii) dans des conditions de flux pathologiques à l’aide d’une chambre microfluidique présentant une sténose de 90 %. Les variations de débit rencontrées dans l'artère coronaire gauche et dans la carotide commune ont été mimées avec une pompe. La perfusion de sang anticoagulé sur du collagène en conditions pulsatiles diminue le volume des agrégats en comparaison de ceux formés en régime de flux constant. De manière intéressante, la pulsatilité n'affecte pas le recrutement des plaquettes, mais favorise leur détachement pendant les phases d'accélération. Dans des conditions de sténose et en comparaison à une région droite, l'adhérence et l'agrégation plaquettaires sont plus importantes dans la région pré-sténotique et au niveau de la gorge de la sténose, et maximales dans la zone post-sténotique, où la croissance du thrombus conduit à l'occlusion de la chambre. De façon inattendue, un flux pulsatile, ne diminue pas, mais augmente le volume des thrombi de 36% dans cette région et raccourcit le temps d’occlusion. La thrombose augmentée dans la région post-sténotique est particulièrement sensible à l'aspirine et aux antagonistes du $P2Y_{12}$, indiquant le rôle important des agonistes solubles, l’ADP et le TxA_2. L’association d’un antagoniste du récepteur $P2Y_1$ avec l’aspirine inhibe plus efficacement la formation de thrombi au niveau post-sténotique qu’une combinaison aspirine avec un antagoniste de $P2Y_{12}$. En conclusion, ces résultats suggèrent que la pulsatilité du flux sanguin influe de manière inverse sur la croissance des thrombi selon les conditions rhéologiques présentées par un vaisseau sain ou malade. De plus, cette étude souligne l’importance des agonistes solubles dans l’agrégation plaquettaire au niveau de la région post-sténotique et indique que l’association d’un antagoniste de $P2Y_1$ avec l’aspirine pourrait présenter une approche anti-thrombotique efficace.

Conclusion et perspectives

En conclusion, mes travaux de thèse soulignent l'importance des étapes initiales d'adhérence des plaquettes lors de la formation d'un agrégat plaquettaire. Ce travail a montré qu'un ciblage de la GPIbβ, une sous-unité du complexe GPIb-V-IX, permettrait de diminuer la thrombose sans affecter l'hémostase et pourrait donc constituer une stratégie anti-thrombotique potentiellement plus sûre. En parallèle, mes travaux ont a notamment mis en lumière la thrombogénicité de la FN fibrillaire sous-endothéliale, qui assure l'adhérence, l'activation, l'agrégation et l'activité pro-coagulante des plaquettes. Enfin, mes travaux ont montré que la pulsatilité du flux sanguin régule la croissance du thrombus et pourrait être délétère au niveau d'une artère malade, en augmentant la thrombose dans une région post-sténotique, menant ainsi à l'occlusion vasculaire. Ce travail ouvre des perspectives d'exploration de nouvelles approches pharmacologiques. J'ai pu montrer que l'aspirine associée à un antagoniste du récepteur $P2Y_1$ inhibe plus efficacement la formation d'un thrombus au niveau d'une région post-sténotique que son association avec un antagoniste du $P2Y_{12}$, qui constitue le traitement de référence utilisé actuellement en clinique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

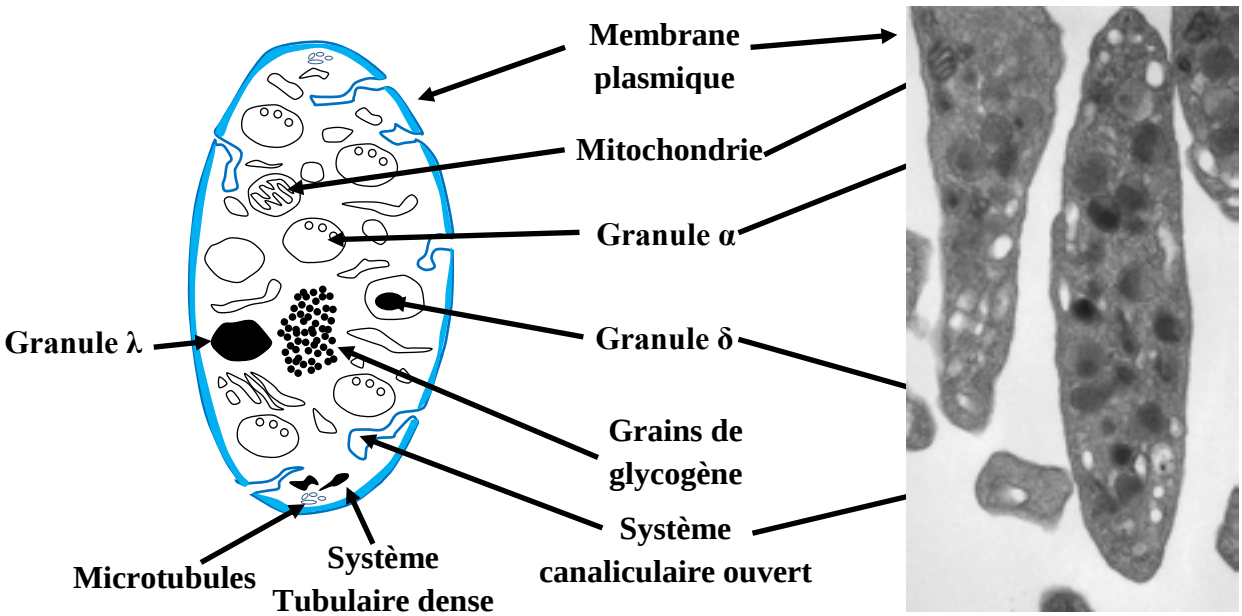


Figure 2 : Ultrastructure de la plaquette

Schématisation (A) et image de microscopie électronique à transmission d'une plaquette au repos en coupe longitudinale (Anita Eckly, INSERM UMR_S949, Strasbourg)

I. Généralités sur les plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines sont des fragments cellulaires anucléés (Figure 2), dont la première description remonte à 1842 **(Addison 1842)**. Elles sont issues de la fragmentation des mégacaryocytes au niveau des sinusoïdes de la moelle osseuse (**Patel et al., 2005)**. Les plaquettes non activées possèdent une forme discoïde et un diamètre moyen de 2 µm pour un volume variant de 7 à 12 μm^3. Les deux tiers des plaquettes circulent dans le sang à une numération comprise entre 150.000 et 400.000 plaquettes par µL. Le dernier tiers est séquestré dans la rate. Leur durée de vie moyenne est de 8 à 10 jours, par la suite elles sont phagocytées au niveau de la rate et du foie (**Boneu and Cazenave, 1997**). L'étude morphologique des plaquettes par microscopie électronique permet de distinguer 3 types de composants majeurs : la membrane plasmique, les organites et le cytosquelette intracellulaire **(Thon and Italiano 2012)**.

a) La membrane plasmique :

La membrane plasmique est constituée d'une bicouche phospholipidique contenant du cholestérol, des glycolipides, des protéoglycanes, ainsi que des glycoprotéines (GP). Elle présente des invaginations ouvertes sur l'extérieur formant le système canaliculaire ouvert (SCO), qui augmente la surface de contact avec l'environnement et représente une réserve de membrane mobilisable lors du changement de forme plaquettaire.

b) Les organites :

Les plaquettes contiennent dans leur cytoplasme des mitochondries, le système tubulaire dense et trois types de granules de stockage α, δ et λ, dont le contenu est sécrété lors de l'activation. Le système tubulaire dense est un réseau analogue au réticulum endoplasmique qui séquestre le calcium ainsi que les enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines. Les granules α (40 copies par plaquette) contiennent notamment des glycoprotéines adhésives (ex : fibronectine, facteur Willebrand, fibrinogène), des facteurs de croissance (ex : Platelet Derived Growth Factor) et des chimiokines (ex : PF4) ainsi que des

facteurs de coagulation (facteurs V, XI) **(Harrison and Cramer 1993)**. Les granules δ ou denses sont appelés ainsi car ils sont denses aux électrons et apparaissent noir en microscopie électronique. Ils sont estimés au nombre de 6 à 8 par plaquette humaine, et contiennent du calcium, des nucléotides comme l'ADP et l'ATP, des pyrophosphates, de la sérotonine et de l'histamine **(McNicol and Israels 1999)**. Les granules λ sont analogues aux lysosomes et contiennent des hydrolases acides (ex : cathepsines) ainsi que des protéases (collagénases). Des patients possédant un déficit qualitatif ou quantitatif en granules denses (maladie du pool vide) ou en granules α (syndrome des plaquettes grises), présentent des syndromes hémorragiques généralement modérés **(McNicol, Israels et al. 1994, Deppermann, Cherpokova et al. 2013).**

c) Le cytosquelette :

Le cytosquelette de la plaquette se compose de microtubules (MT), de filaments contractiles d'actomyosine et de spectrine. Les MT forment un réseau circonférentiel sous la membrane plasmique, nommé la « bande marginale », qui maintient la forme discoïde des plaquettes au repos. Les filaments d'actomyosine constituent un réseau sous-membranaire adjacent aux MT et un réseau cytosolique. Lors de l'activation plaquettaire, le remaniement du cytosquelette est à l'origine du changement de forme des plaquettes, de la redistribution et de la sécrétion du contenu des granules. Les modifications morphologiques varient en fonction du mode et de l'intensité de stimulation. Des plaquettes en suspension stimulées par un agoniste faible tel que l'ADP deviennent sphériques, se contractent et émettent des filopodes de manière réversible (Figure 3A). En réponse aux agonistes forts, tels que le collagène et la thrombine, les plaquettes changent de forme, s'agrègent et sécrètent le contenu de leurs granules. Lorsque les plaquettes adhèrent sur une surface telle que le fibrinogène ou la fibronectine, elles deviennent sphériques, se contractent, émettent des filopodes, puis des lamellipodes et s'étalent (Figure 3B).

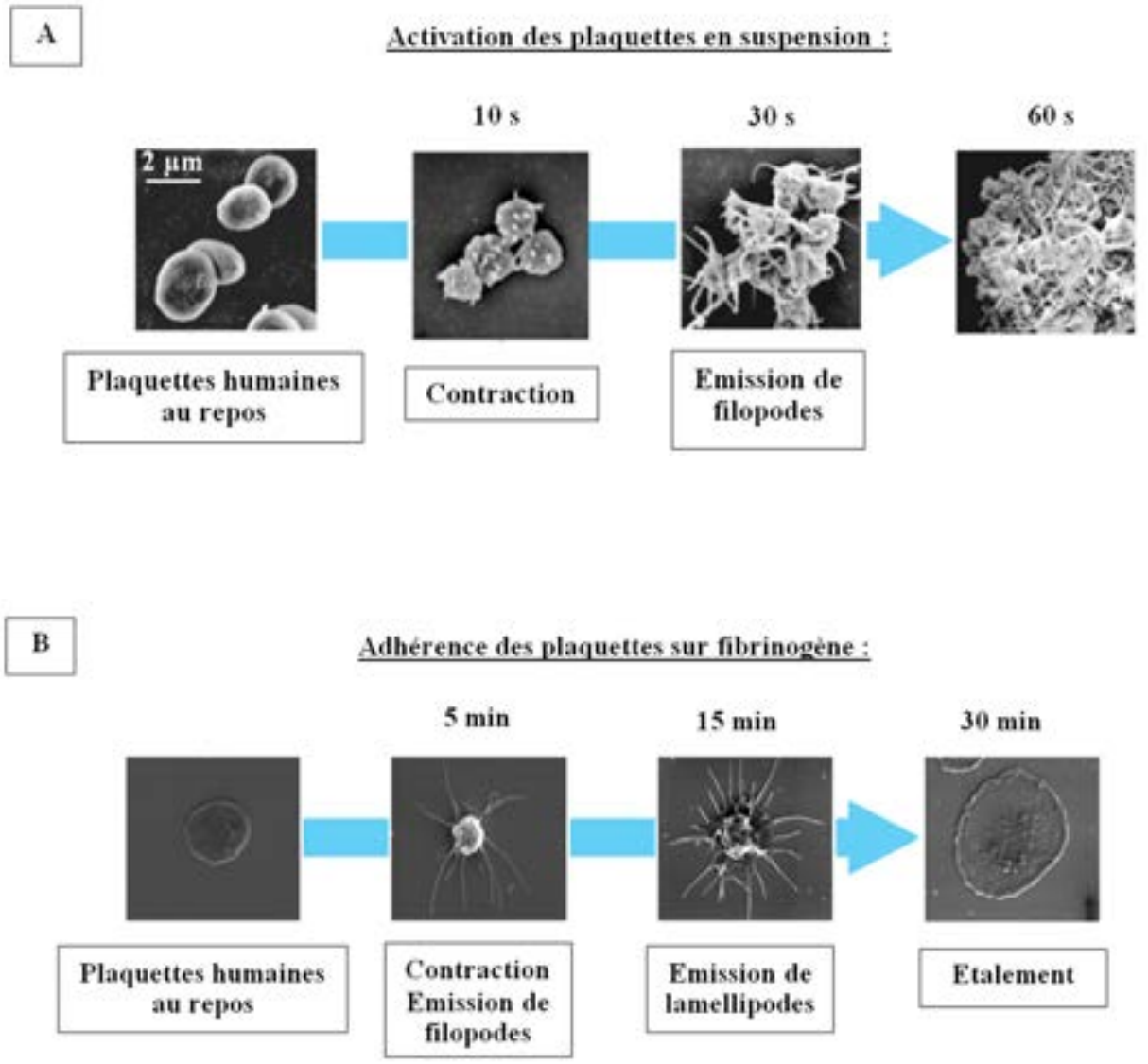


Figure 3 : Modifications morphologiques de la plaquette au cours de son activation en réponse à un agoniste soluble (ADP, 5 µM) (A), ou après adhérence sur du fibrinogène immobilisé (B) (Anita Eckly, INSERM UMR_S949, Strasbourg).

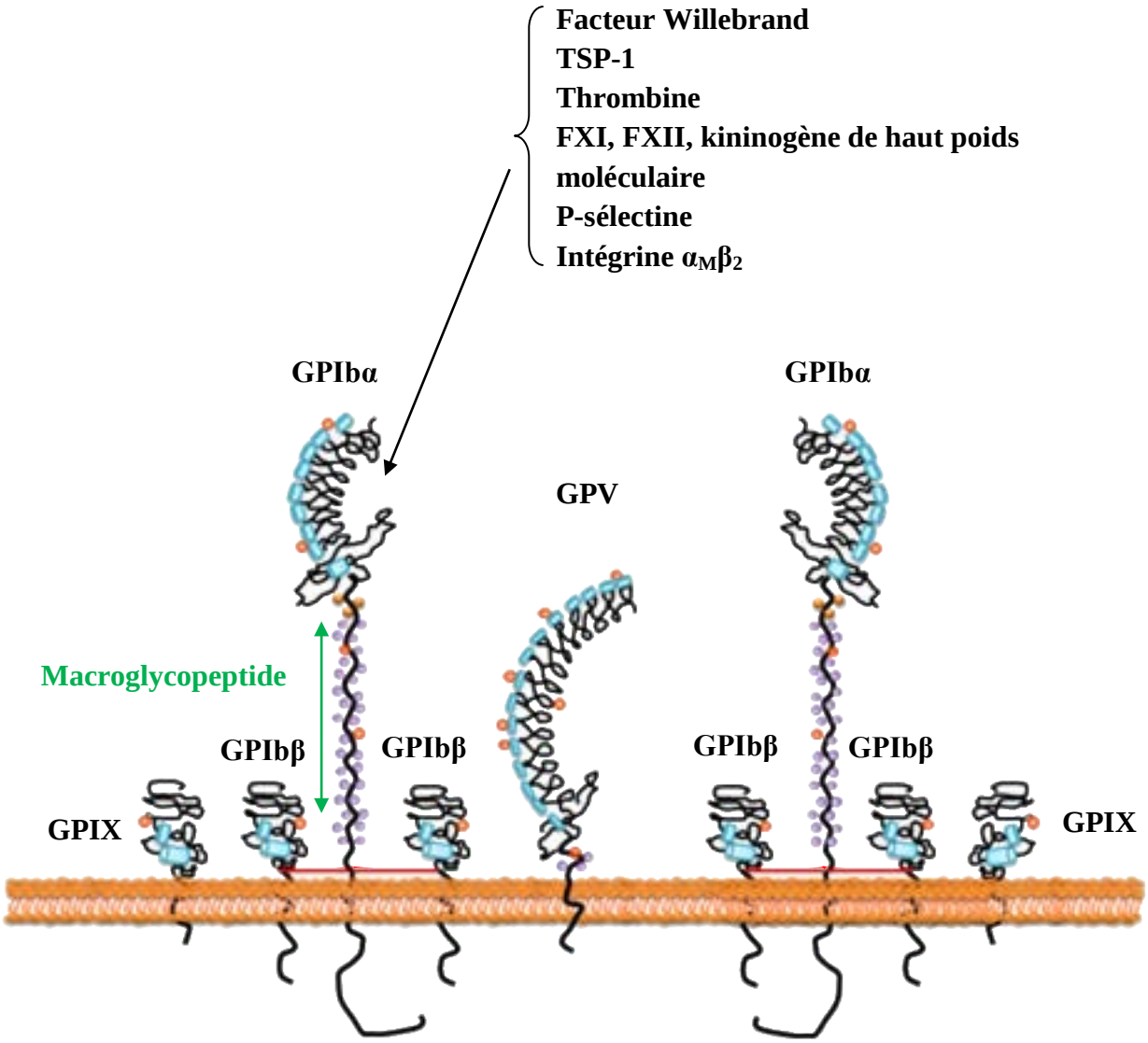


Figure 4 : Représentation schématique de la structure du complexe GPIb-V-IX et de ses principaux ligands. Adapté de (Lanza, Gachet *et al*., 2008).

Tyrosine sulfatée
O-glycosylation
Domaine riche en leucine
N-glycosylation
Pont disulfure

II. Les récepteurs plaquettaires

Les récepteurs de surface régulent les propriétés hémostatiques des plaquettes. On peut distinguer les récepteurs d'adhérence, qui permettent aux plaquettes de s'attacher aux protéines sous-endothéliales et d'agréger entre elles, et les récepteurs aux agonistes solubles qui assurent et amplifient l'activation plaquettaire.

II.1. Les récepteurs d'adhérence et d'agrégation

L'adhérence et l'agrégation plaquettaire sont assurées par des glycoprotéines (GP), telles que le complexe GPIb-V-IX, la GPVI, ainsi que les intégrines de la famille β_1 et β_3. La liaison de ligands protéiques à ces récepteurs déclenche des cascades de signalisation intracellulaire qui entrainent l'activation plaquettaire **(Ruggeri 2002)**.

II.1.1. Le complexe GPIb-V-IX

II.1.1.1. La structure du complexe GPIb-V-IX

Le complexe GPIb-V-IX est le principal récepteur du facteur Willebrand (FW). Il appartient à la famille des protéines riches en leucine, qui assurent des interactions protéines-protéines et sont impliquées dans des fonctions d'adhérence et de signalisation cellulaire **(Kobe and Kajava 2001)**. Il est constitué de quatre GP transmembranaires (Figure 4) : la GPIbα (135 kDa), la GPIbβ (26 kDa), la GPIX (20 kDa) et la GPV (82 kDa), qui s'associent respectivement avec une stoechiométrie de 2 :4 :2 :1 **(Lanza, Gachet et al. 2008)**. La GPIbα lie deux GPIbβ par des ponts disulfures pour former la GPIb, qui interagit de manière non covalente avec la GPIX et la GPV **(Luo, Mo et al. 2007)**. A la surface des plaquettes, on dénombre en moyenne 25.000 copies du complexe GPIb-IX pour 12.000 copies de GPV **(Berndt, Shen et al. 2001, Luo and Li 2008)**.

La partie extracellulaire de la GPIbα est composée d'un domaine N-terminal de 45 kDa contenant huit éléments riches en leucine (ERL), suivi d'une courte région chargée négativement présentant des tyrosines sulfatées, puis d'un domaine fortement O-glycosylé nommé le macroglycopeptide (**Lanza, Gachet et al. 2008**). A la suite du domaine extracellulaire, on trouve un domaine transmembranaire suivi d'une région intracellulaire de 96 acides aminés **(Li and Emsley 2013)**.

La GPIbβ contient un ERL au niveau de son domaine extracellulaire. Son domaine intracellulaire est composé de 34 acides aminés dont une sérine en position 166 (S166) qui est phosphorylée par la PKA **(Andrews, Harris et al. 1998)**.

La GPIX présente une structure très proche de celle de la GPIbβ, avec un ERL et un domaine intracellulaire qui n'est composé que de 8 acides aminés (**Li and Emsley 2013)**.

La GPV comprend 15 ERL ainsi qu'un domaine cytoplasmique de 16 acides aminés (**Lanza, Gachet et al. 2008**). La partie extracellulaire contient un site de clivage à la thrombine et libère un fragment soluble de 69 kDa dans la circulation qui représente un marqueur d'activation plaquettaire.

II.1.1.2. Les ligands du complexe GPIb-V-IX

Le complexe GPIb-V-IX interagit avec différents ligands dont le FW, la Thrombospondine-1, la P-sélectine, l'intégrine $\alpha_M\beta_2$, la thrombine, les facteurs de coagulations XI, XII et le kininogène de haut poids moléculaire qui se fixent tous au niveau du domaine N-terminal de la GPIbα.

Le **FW** est le principal ligand du complexe GPIb-V-IX (voir page 83). Pour interagir, la GPIbα et le FW subissent des modifications de leur structure imposées par les contraintes de cisaillement du flux sanguin. La liaison du FW à la GPIbα assure non seulement l'adhérence des plaquettes au sous-endothélium lésé, mais participe également à la croissance du thrombus **(Savage, Saldivar et al. 1996, Kulkarni, Dopheide et al. 2000)**. En condition statique, cette interaction nécessite l'utilisation d'inducteurs comme la ristocétine, un antibiotique isolé de l'actinomycète Nocardia lurida, ou la botrocétine, une protéine extraite du venin de serpent Bothrops jararaca **(Howard and Firkin 1971, Brinkhous, Barnes et al. 1981, Nakayama, Matsushita et al. 2002)**.

La thrombine est une enzyme clé de la coagulation qui clive le fibrinogène en fibrine. Elle est également un puissant agoniste plaquettaire via sa liaison aux récepteurs de la famille

PAR (Protease-Activated Receptor) **(Coughlin 2000)**. La GPIbα constitue un site de haute affinité pour la thrombine **(Jamieson 1997)**. La liaison GPIbα/thrombine participerait à l'activation des plaquettes par un mécanisme mal défini. Il a été proposé que cette interaction augmente la concentration locale de thrombine, la protège de ses inhibiteurs, module son affinité pour les PAR ou déclenche directement une signalisation propre indépendante de son activité catalytique, qui aboutirait à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ **(De Cristofaro, De Candia et al. 2000, De Candia, Hall et al. 2001, Soslau, Class et al. 2001)**. L'importance de l'interaction entre la GPIbα et la thrombine a été démontrée *in vivo*, chez une souris transgénique qui exprime une GPIbα humaine mutée, incapable de lier la thrombine et qui présente une diminution de la stabilité des thrombi formés après une lésion de l'artère carotide au $FeCl_3$ **(Guerrero, Shafirstein et al. 2008)**.

La Thrombospondine-1 (TSP-1) est une protéine adhésive, présente dans le sous-endothélium, dans les granules α des plaquettes et dans le plasma **(Bonnefoy, Daenens et al. 2006)**. Son interaction avec la GPIbα permet une adhérence efficace des plaquettes en condition de flux élevé **(Jurk, Clemetson et al. 2003)**.

La P-sélectine, qui est présente dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et dans les granules α des plaquettes, a été décrite pour lier la GPIbα, ce qui permettrait le recrutement de plaquettes sur un endothélium activé **(Romo, Dong et al. 1999)**.

L'intégrine $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1) est un récepteur leucocytaire, qui possède une région similaire au domaine A1 du FW, permettant sa reconnaissance par la GPIbα, et donc une interaction entre les plaquettes et les leucocytes **(Zago, Simon et al. 2008)**. Elle a également été décrite pour permettre l'élimination des plaquettes « réfrigérées » après une transfusion **(Clemetson and Clemetson 2008)**.

Les facteurs de coagulations XI, XII et le kininogène de haut poids moléculaire, qui contribuent à la voie intrinsèque de la coagulation ont été décrits pour lier la partie N-terminale de la GPIbα, suggérant que cette dernière participerait au processus de coagulation **(Joseph, Nakazawa et al. 1999, Bradford, Pixley et al. 2000, Baglia, Badellino et al. 2002)**. Cependant, une étude récente a remis en cause cette hypothèse en montrant que la fonction pro-coagulante du complexe est indépendante du domaine N-terminal de GPIbα **(Ravanat, Strassel et al. 2010)**.

II.1.1.3. Les partenaires intracellulaires du complexe GPIb-V-IX

Le complexe GPIb-V-IX interagit avec plusieurs partenaires au niveau de son domaine intracytoplasmique dont la filamine A, les protéines de la famille 14-3-3, la PI-3Kinase et la calmoduline (Figure 5).

La **filamine A**, est une phosphoprotéine dimérique, qui fait le lien entre le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique en liant la GPIbα au niveau des résidus Phe^{568} et Trp^{570} **(Cranmer, Pikovski et al. 2005)**. Cette interaction assure l'ancrage du complexe dans la membrane plasmique et contribuerait à la stabilité membranaire des plaquettes en conditions de flux élevé (5.000 - 40.000 s^{-1}) **(Cranmer, Ashworth et al. 2011)**. Des mutations du gène codant la filamine A entrainent une thrombopénie et la présence de plaquettes géantes, suggérant que cette phosphoprotéine participe au maintien de la forme normale des plaquettes **(Nurden, Debili et al. 2011)**.

Les **14-3-3** sont des protéines adaptatrices d'environ 30 kDa qui régulent de nombreuses voies de signalisation **(Darling, Yingling et al. 2005, Aitken 2006)**. Dans la plaquette, six isotypes interagissent avec les domaines 580-590 et 605-610 de la GPIbα et avec un motif contenant la Ser166 de la GPIbβ **(Mangin, David et al. 2004, Du 2007, Mangin, Receveur et al. 2009)**. L'interaction entre la GPIb et les 14-3-3 participerait à la signalisation du complexe menant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Mangin, David et al. 2004; Du 2007**).

La **Phosphatidylinositide-3 kinase,** est une lipide kinase qui a été décrite pour interagir avec la GPIbα, mais elle ne semble pas jouer un rôle majeur dans la signalisation du complexe **(Wu, Asazuma et al. 2003, Mu, Andrews et al. 2008)**.

La **calmoduline** est une calciprotéine, qui se lie aux domaines intracellulaires de la GPIbβ et de la GPV. Elle intervient dans le changement de forme des plaquettes, en participant à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine **(Hathaway and Adelstein 1979)**.

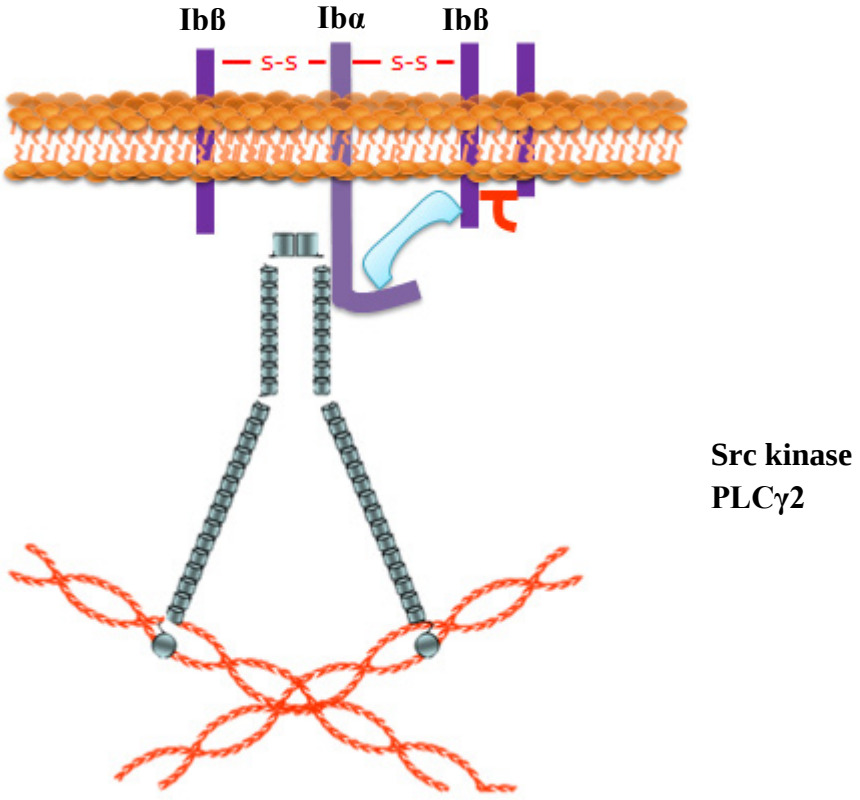


Figure 5 : Représentation schématique des partenaires intracellulaires du complexe GPIb-V-IX.

II.1.1.4. La signalisation du complexe GPIb-V-IX

La liaison du FW à la GPIbα mobilise une ou plusieurs Src-kinases, qui mènent à l'activation de la phospholipase-Cγ2 (PLCγ2) et à la mobilisation des stocks internes de Ca^{2+}. Ceci se traduit par un changement de forme des plaquettes avec émission de filopodes **(Yuan, Kulkarni et al. 1999, Mangin, Yuan et al. 2003)**. Cette activation précoce se poursuit par la mobilisation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui adopte une conformation active capable d'interagir avec le fibrinogène (FG) ou le FW et d'entrainer l'étalement des plaquettes **(Kasirer-Friede, Cozzi et al. 2004)**. La signalisation menant à $\alpha_{IIb}\beta_3$ nécessite l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intraplaquettaire et fait intervenir des membres de la famille des protéines 14-3-3 **(Gu, Xi et al. 1999)**. A ce jour, l'importance de la signalisation du complexe GPIb-V-IX en hémostase et en thrombose n'est pas connue.

II.1.1.5. Rôle du complexe GPIb-V-IX en hémostase et en thrombose

L'importance physiologique du complexe GPIb-V-IX est attestée par une maladie hémorragique sévère et rare, le syndrome de Bernard-Soulier (SBS), qui résulte d'une absence d'expression ou d'anomalies fonctionnelles des sous-unités GPIbα, GPIbβ ou GPIX **(Lanza 2006)**. Ces patients présentent une tendance au saignement, des plaquettes géantes, une thrombopénie et une diminution de la consommation de la prothrombine.

Le rôle du complexe en thrombose artérielle a été mis en évidence dans plusieurs études basées sur des modèles expérimentaux *in vitro* et i*n vivo* utilisant des inhibiteurs, des anticorps bloquants ou des souris génétiquement modifiées. Le ciblage de la GPIbα à l'aide d'un Fab de l'anticorps 6B4 a inhibé efficacement la thrombose chez le singe **(Wu, Meiring et al. 2002)**. Des études basées sur des souris transgéniques exprimant un complexe GPIb-V-IX dont le domaine extracellulaire de la GPIbα a été remplacé par celui du récepteur à l'interleukine-4, montrent également une réduction importante de la thrombose après une lésion des artères mésentériques ou de la carotide au $FeCl_3$ **(Bergmeier, Piffath et al. 2006, Konstantinides, Ware et al. 2006**). L'importance du complexe en thrombose artérielle a également été montré en antagonisant le domaine A1 du FW (voir page 83), à l'aide d'agents pharmacologiques, dont l'aptamère ARC-1779 et le fragment d'anticorps à une seule région variable, l'ALX-0081. Ces deux agents ont en effet été décrits pour diminuer la thombose artérielle chez le singe **(Diener, Daniel Lagasse et al. 2009, Ulrichts, Silence et al. 2011)**. Dans un essai clinique de phase II, l'ARC-1779 a réduit la fréquence des emboles cérébraux après endartériectomie carotidienne, mais deux tiers des patients souffraient de complications hémorragiques **(Markus, McCollum et al. 2011)**. L'ALX-0081 fait actuellement l'objet d'une étude clinique de phase II **(Gresele and Momi 2012)**.

II.2. La glycoprotéine VI

La GPVI a été identifiée chez un patient souffrant d'une thrombocytopénie autoimmune, qui présente un anticorps capable d'inhiber l'agrégation de plaquettes au collagène **(Sugiyama, Okuma et al. 1987)**. Elle appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig) et possède une masse moléculaire de 62 kDa. Elle s'exprime uniquement dans la lignée mégacaryocyto-plaquettaire à raison de 3.000 à 5.000 copies par plaquette **(Clemetson, Polgar et al. 1999, Best, Senis et al. 2003)**. Sa région extracellulaire contient deux domaines de type Ig capables d'interagir avec le collagène via la reconnaissance de motifs GPO (Glycine-Proline-Pyrrolysine) (Figure 6). Le domaine transmembranaire s'associe à la chaîne γ des récepteurs Fc (γRFc), qui est nécessaire à l'expression et à la signalisation de la GPVI **(Nieswandt, Bergmeier et al. 2000)**. Il est suivi par une région intracytoplasmique qui comporte des sites de liaisons pour les tyrosines kinases de la famille Src, Fyn et Lyn **(Nuyttens, Thijs et al. 2011)**.

La GPVI constitue le principal récepteur d'activation des plaquettes au collagène. Elle est activée par les collagènes fibrillaires de type I et III, mais pas par les formes solubles de collagène. La liaison du collagène à la GPVI s'accompagne du regroupement des complexes GPVI/γRFC, entrainant la phosphorylation des motifs ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activatory motif) des γRFc par les Src kinases, Fyn et Lyn **(Ezumi, Shindoh et al. 1998, Quek, Pasquet et al. 2000)**. Ceci permet le recrutement et l'autophosphorylation de la tyrosine kinase Syk (Spleen tyrosine kinase) qui mène à la formation d'un « signalosome », composé de nombreuses protéines dont les LAT (Linker for Activation of T-Cells), les Gads (Grb2 related adaptor protein downstream of Shc) et la SLP-76 (Src homology domain containing leucocyte protein of 76 kDa) **(Gross, Melford et al. 1999)**. Ce complexe ainsi que la PI-3kinase active la PLCγ2 **(Gross, Melford et al. 1999, Watson, Auger et al. 2005)**, qui génère de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG), menant respectivement à la mobilisation des stocks internes de Ca^{2+} et à l'activation de la PKC. La signalisation de la GPVI entraine la sécrétion du contenu des granules, la génération de TxA_2 et l'activation des intégrines, responsable de l'adhérence stable, de l'étalement et de l'agrégation des plaquettes **(Kato, Kanaji et al. 2003, Surin, Barthwal et al. 2008)**. La GPVI permet également l'adhérence des plaquettes sur une surface de collagène en conditions statique et de flux **(Nieswandt, Brakebusch et al. 2001, Sarratt, Chen et al. 2004, Sarratt, Chen et al. 2005)**. Une adhérence au collagène a également été observée pour des lignées de basophiles transfectées par la GPVI **(Sarratt, Chen et al. 2004)**.

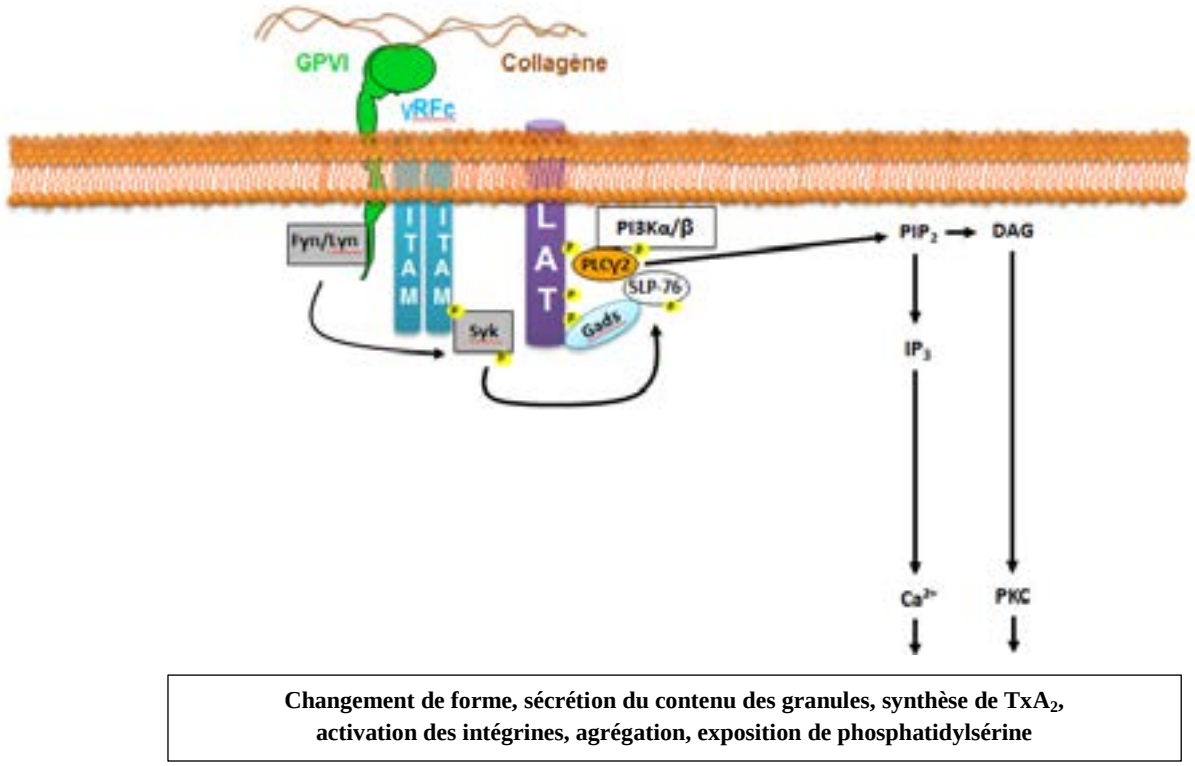


Figure 6 : Schématisation de la signalisation déclenchée par la GPVI.

DAG, diacylglycérol ; Gads : Grb2 adaptor downstream of Shc ; γRFc : chaîne γ des récepteurs Fc ; IP_3 : inositol 1,4,5-trisphosphate ; ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activatory motif ; LAT : Linker for activation of T cells ; PKC : Protéine kinase C ; PLCγ2 : Phospholipase C γ2 ; PIP_2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; SLP-76 : Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa ; Syk : spleen tyrosine kinase **(**adapté de **Watson et al., 2005)**.

La GPVI est considérée comme une cible anti-thrombotique particulièrement prometteuse **(Zahid, Mangin et al. 2012)**. L'absence ou l'inhibition de la GPVI diminue la formation d'agrégats plaquettaires après perfusion de sang anticoagulé sur collagène ou sur du matériel de plaque d'athérosclérose **(Nieswandt, Brakebusch et al. 2001, Kato, Kanaji et al. 2003,**

Penz, Reininger et al. 2005, Mangin, Tang et al. 2012). Ce résultat a été confirmé *in vivo* dans la souris, dans différents modèles de thrombose artérielle après lésion d'un vaisseau sain ou présentant des plaques athéromateuses (souris ApoE$^{-/-}$) **(Massberg, Gawaz et al. 2003, Munnix, Strehl et al. 2005, Dubois, Panicot-Dubois et al. 2006, Kalia, Auger et al. 2008, Kuijpers, Gilio et al. 2009, Hechler, Nonne et al. 2010, Bender, Hagedorn et al. 2011, Hechler and Gachet 2011)**. Par ailleurs, l'immunodéplétion de la GPVI plaquettaire par injection d'anticorps JAQ-1 réduit l'étendue des régions infarcies dans un modèle d'ischémie transitoire de l'artère cérébrale moyenne **(Kleinschnitz, Pozgajova et al. 2007)**. L'étude de patients ou de souris déficientes en GPVI a montré un défaut hémostatique modéré, suggérant que le ciblage de la GPVI pouvait présenter un risque hémorragique limité **(Lockyer, Okuyama et al. 2006, Mangin, Yap et al. 2006, Arthur, Dunkley et al. 2007, Kalia, Auger et al. 2008, Dumont, Lasne et al. 2009, Hermans, Wittevrongel et al. 2009)**. Ceci a été récemment confirmé dans une étude clinique de phase I du Revacept, un agent composé de deux domaines extracellulaires de la GPVI fusionnés au fragment Fc d'une IgG, qui n'a pas montré de prolongation du temps de saignement de témoins **(Ungerer, Rosport et al. 2011)**. Depuis juillet 2012, un essai de phase II est en cours. Il a pour objectif d'évaluer le bénéfice de la combinaison aspirine/Revacept ou clopidogrel/Revacept dans la réduction d'emboles cérébraux chez des patients présentant une sténose carotidienne ou un accident ischémique transitoire **(Revacept)**.

II.3. Les intégrines

II.3.1. Généralités

Les intégrines sont des hétérodimères composés de deux sous-unités α et β qui s'associent de manière non covalente. A ce jour, il a été montré que 18 sous-unités α et 8 sous-unités β sont capables de former 24 hétérodimères **(Hynes 2002)**. Les intégrines sont des protéines adhésives impliquées dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire **(Danen and Sonnenberg 2003)**. La capacité des intégrines à lier leurs ligands dépend de leur conformation. Trois états conformationnels ont été décrits : i) un état de faible affinité pour le ligand, avec le récepteur replié sur lui-même; ii) un état d'affinité intermédiaire, dans lequel le récepteur est en conformation étendue avec la tête en position fermée, et iii) un état de forte affinité dans lequel la tête globulaire est en configuration ouverte (Figure 7) **(Askari, Buckley et al. 2009)**. Ces états conformationnels sont régulés par une signalisation intracellulaire appelée « inside-out » déclenchée par des protéines adhésives et/ou des agonistes solubles. L'interaction entre les intégrines et leurs ligands déclenche un rassemblement ou clustering de ces récepteurs et initie une signalisation « outside-in », qui participe notamment au processus de migration et d'étalement cellulaire **(Harburger and Calderwood 2009)**.

II.3.2. Intégrines plaquettaires

Les plaquettes possèdent des intégrines de la famille β_1 ($\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$) et β_3 ($\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_V\beta_3$) qui régulent l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes **(Nieswandt, Varga-Szabo et al. 2009)**.

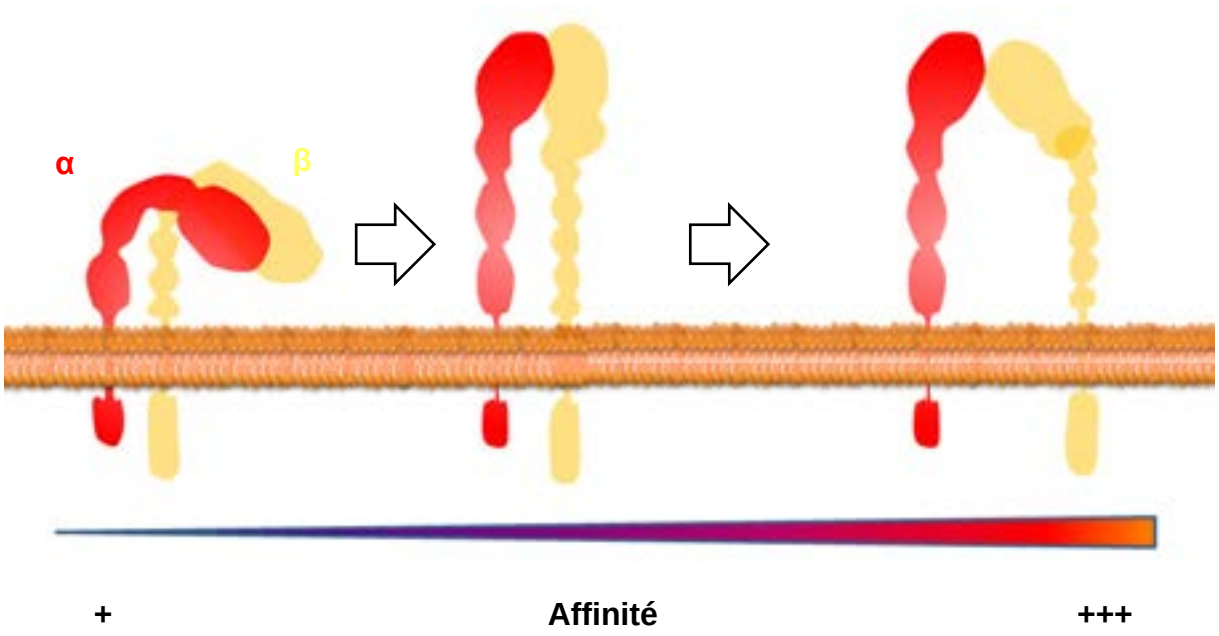


Figure 7 : Schématisation des trois conformations adoptées par une intégrine, adapté de (Chen, Xie et al. 2010).

II.3.3. Mécanismes d'activation des intégrines plaquettaires

La signalisation « inside-out » est déclenchée soit par des récepteurs d'adhérence, soit par des récepteurs des agonistes solubles. Les voies de signalisation impliquées mènent en général à la libération de DAG et à la mobilisation de Ca^{2+}, qui permettent l'activation de CalDAG-GEFI (Ca^{2+} and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor I), une Guanine nucleotide exchange factor (GEF) qui stimule une petite protéine G, la Rap1b **(Stefanini and Bergmeier 2010)**. Cette dernière peut également être activée par une voie indépendante du Ca^{2+} impliquant des PI-3K, notamment en aval de $P2Y_{12}$ et de GPVI **(Woulfe, Jiang et al. 2002, Gilio, Munnix et al. 2009)**. L'activation de Rap1b permet l'association de protéines du cytosquelette comme la taline et la kindline-3 avec les domaines cytoplasmiques des intégrines β_1 et β_3, menant aux changements conformationnels qui sont clefs pour l'augmentation de l'affinité des récepteurs pour leurs ligands **(Guidetti and Torti 2012)**.

II.3.4. Les intégrines de la famille β_1

Les plaquettes expriment trois sous-types d'intégrines β_1, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$, qui lient respectivement le collagène, la fibronectine (FN) et la laminine (LM) **(Bergmeier and Hynes 2012)**.

II.3.4.1. L'intégrine $\alpha_2\beta_1$

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est un récepteur du collagène. Elle est composée d'une chaîne α_2 de 150 kDa et d'une chaîne β_1 de 130 kDa. Cette intégrine est notamment exprimée par les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les ostéoblastes **(Zutter and Edelson 2007)**. L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ participe au processus de migration des fibroblastes et à la différentiation des ostéoblastes **(Reyes and Garcia 2004, Eckes, Zweers et al. 2006)**.

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$, dont le niveau d'expression varie entre 3.000 et 4.600 copies par plaquette **(Burkhart, Vaudel et al. 2012)**, permet l'adhérence plaquettaire au collagène en conditions statique et de flux **(Saelman, Nieuwenhuis et al. 1994)**. L'activation des plaquettes entraine un signal « inside-out » qui augmente l'affinité d'$\alpha_2\beta_1$ pour le collagène **(Varga-Szabo, Pleines et al. 2008)**. La liaison du collagène à $\alpha_2\beta_1$ déclenche une signalisation « outside-in », qui présente des similitudes avec celle de la GPVI et de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ **(Inoue, Suzuki-Inoue et al. 2003)**. Elle met en jeu des Src kinases, Syk, la protéine adaptatrice SLP-76, la PLCγ2 et mène à la libération des stocks internes de Ca^{2+} **(Inoue, Suzuki-Inoue et al. 2003)**. Plus récemment, il a été montré qu'$\alpha_2\beta_1$ stimule également Rap1b via la PI-3K p110β **(Consonni, Cipolla et al. 2012)**.

L'absence ou l'inhibition de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ diminue la formation d'agrégats après perfusion de sang sur collagène avec un effet augmenté en conditions de flux élevé **(Sarratt, Chen et al. 2005)**. Ce résultat a été confirmé *in vivo*, dans différents modèles de thrombose **(He, Pappan et al. 2003, Kuijpers, Pozgajova et al. 2007)**. De manière surprenante, $\alpha_2\beta_1$ interviendrait dans la stabilité du thrombus **(He, Pappan et al. 2003, Kuijpers, Pozgajova et al. 2007)**. Deux patientes possédant un déficit en $\alpha_2\beta_1$ ont montré des syndromes hémorragiques modérés, suggérant un rôle modeste de cette intégrine en hémostase **(Nieuwenhuis, Akkerman et al. 1985; Kehrel, Balleisen et al. 1988)**. Ces résultats ont été confirmés dans deux lignées de souris déficientes pour le gène α_2 dont le temps de saignement est normal **(Holtkotter, Nieswandt et al. 2002, Habart, Cheli et al. 2013).**

II.3.4.2. L'intégrine $\alpha_5\beta_1$

L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est un récepteur de la FN. Elle est exprimée dans de nombreuses cellules dont les fibroblastes, les cellules endothéliales et les lymphocytes, et son expression est particulièrement élevée dans certaines cellules cancéreuses telles que les astrocytomes et les glioblastomes **(Springer 1990, Kim, Bang et al. 2008)**. L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ joue un rôle crucial dans la migration et la différentiation cellulaire, particulièrement au cours de l'embryogénèse, en participant à la mise en place du système vasculaire. Son absence conduit au décès des souris au stade embryonnaire suite à des défauts de mise en place du mésoderme **(Yang, Rayburn et al. 1993)**.

Les plaquettes expriment environ 1.900 copies d'$\alpha_5\beta_1$ **(Burkhart, Vaudel et al. 2012)**. Cette intégrine permet l'adhérence plaquettaire en conditions statique et de flux en reconnaissant la séquence RGD (Arginine-glycine-aspartate) de la FN **(Beumer, MJ et al. 1994, McCarty, Zhao et al. 2004)**. L'interaction $\alpha_5\beta_1$/FN mène à l'activation des plaquettes, qui se traduit par un changement de forme avec émission de filopodes **(McCarty, Zhao et al. 2004)**. L'importance de ce récepteur en hémostase et en thrombose est inconnue, et son évaluation reste conditionnée au développement d'un antagoniste spécifique ou d'une souris qui n'exprime pas ce récepteur dans la lignée mégacaryocyto-plaquettaire.

II.3.4.3. L'intégrine $\alpha_6\beta_1$

L'intégrine $\alpha_6\beta_1$ est un récepteur des LM **(Bergmeier and Hynes 2012)**. Il s'agit d'un récepteur ubiquitaire, qui joue un rôle majeur dans la structuration des épithéliums. Chez la souris, l'absence d'α_6 est létale dans la période néonatale, en raison d'un détachement de l'épiderme et d'un défaut de développement du système nerveux central **(Georges-Labouesse, Mark et al. 1998)**. Des patients exprimant une sous-unité α_6 anormale au niveau des cellules de l'épiderme souffrent d'épidermolyse bulleuse, une maladie rare et douloureuse caractérisée par une fragilité de la peau, menant à l'apparition de bulles ou de vésicules épidermiques **(Elluru, Contreras et al. 2013).**

11.500 copies d'$\alpha_6\beta_1$ sont présentes à la surface des plaquettes **(Burkhart, Vaudel et al. 2012)**. Cette intégrine assure l'adhérence des plaquettes sur des isoformes de LM vasculaires en conditions statique et de flux **(Geberhiwot, Ingerpuu et al. 1999, Nigatu, Sime et al.**

2006, Schaff, Tang et al. 2013). Cette interaction mène à une signalisation « outside-in », qui implique Syk, la PLCγ2, la PI-3K et aboutit au changement de forme des plaquettes avec émission de filopodes **(Chang, Chang et al. 2005, Inoue, Suzuki-Inoue et al. 2006)**. La liaison de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ aux LM permet l'interaction de la GPVI avec cette protéine, responsable de l'étalement des plaquettes **(Inoue, Suzuki-Inoue et al. 2006)**. Des souris déficientes pour $\alpha_6\beta_1$ au niveau plaquettaire ont un temps de saignement inchangé suggérant un rôle modeste de cette intégrine en hémostase. En revanche, ces souris présentent une thrombose diminuée après lésion de l'aorte, de la carotide et des artérioles mésentériques, suggérant un rôle d'$\alpha_6\beta_1$ en thrombose artérielle **(Schaff, Tang et al. 2013)**.

II.3.5. Les intégrines de la famille β_3

II.3.5.1. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est le récepteur plaquettaire du FG. Elle est exclusivement exprimée dans la lignée mégacaryocyto-plaquettaire. On retrouve 50.000 copies de cette intégrine à la surface des plaquettes au repos, et 30.000 copies supplémentaires sur les membranes du SCO et des granules α, qui sont exposées à la membrane plasmique après une activation forte des plaquettes **(Wagner, Mascelli et al. 1996)**.

En condition de flux faible, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ participe au recrutement des plaquettes au site de lésion en liant notamment le FG sous-endothélial et le FW qui s'est adsorbé sur le collagène **(Savage, Saldivar et al. 1996)**. La fonction principale de cette intégrine est de permettre l'agrégation plaquettaire, en liant le FG plasmatique. Ceci nécessite l'activation préalable de l'intégrine par une signalisation « inside-out » **(Varga-Szabo, Pleines et al. 2008)**. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ lie également d'autres protéines adhésives, telles que la fibrine, la FN et la vitronectine, qui possèdent toutes une séquence RGD **(Varga-Szabo, Pleines et al. 2008)**.

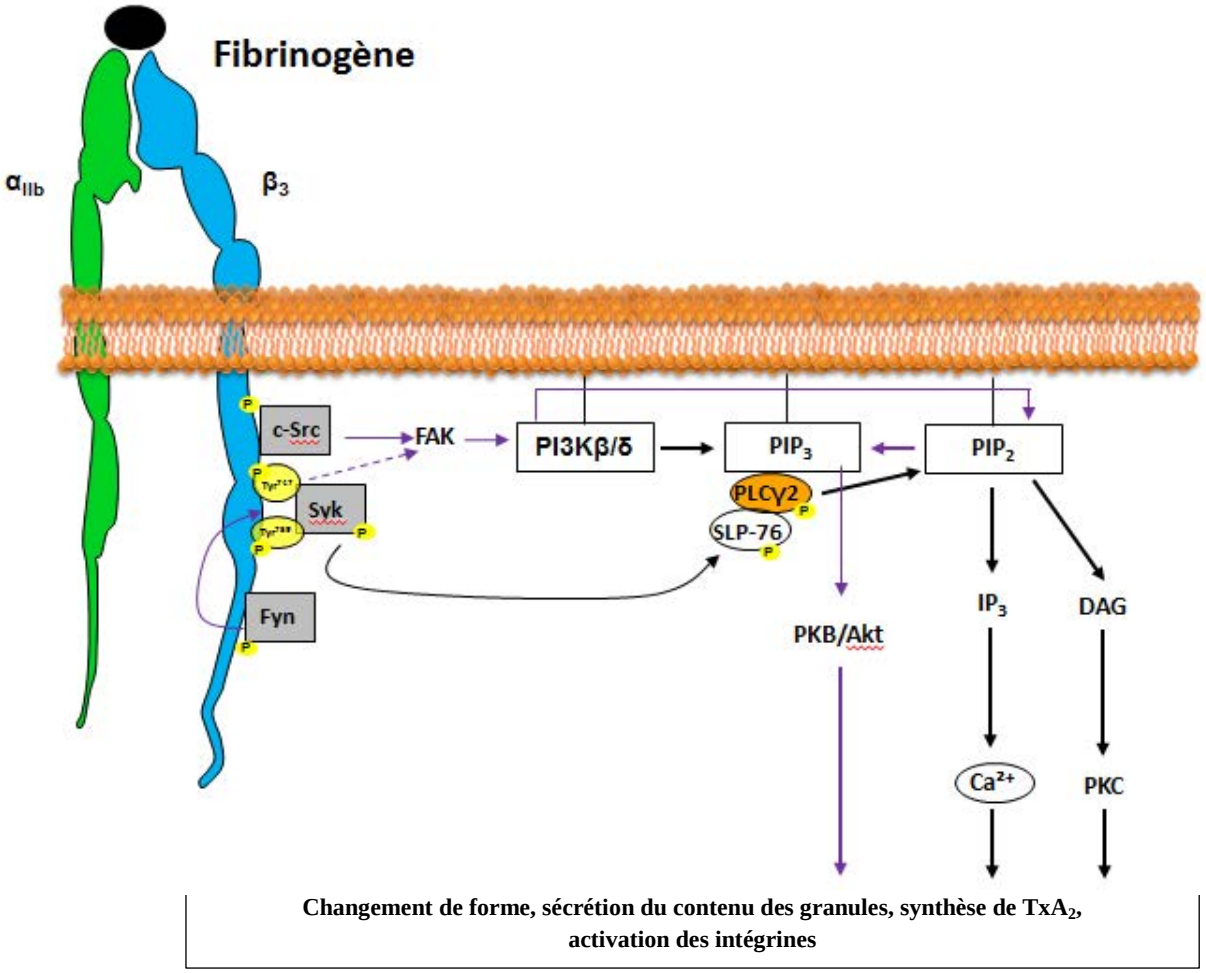


Figure 8 : Schématisation de la signalisation déclenchée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

DAG, diacylglycérol ; FAK, focal adhesion kinase ; IP_3, inositol 1,4,5-trisphosphate ; PIP_2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PIP_3, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate ; SLP-76, Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa ; Syk, spleen tyrosine kinase.

La liaison du FG à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ déclenche une signalisation « outside-in » qui met en jeu des tyrosines kinases de la famille Src (c-Src et Fyn), Syk, FAK, les PI-3K p110 β et δ, la protéine adaptatrice SLP-76, la PLCγ2 et Rap1b. Cette signalisation mène au changement de forme des plaquettes, à la sécrétion du contenu des granules, à la génération de TxA_2 et renforce l'affinité des intégrines pour leurs ligands (Figure 8) **(Watson, Auger et al. 2005, Gratacap, Guillermet-Guibert et al. 2011, Zhang, Xiang et al. 2011)**. Des souris avec une

mutation de deux tyrosines du domaine intracytoplasmique de la β_3, inhibant la signalisation « outside-in », présentent une tendance à re-saigner et un temps d'occlusion artériel augmenté **(Law, DeGuzman et al. 1999, Goschnick, Lau et al. 2006, Valiyaveettil, Feng et al. 2007 , Takizawa, Nishimura et al. 2010)**. Ces résultats soulignent l'importance de la signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en hémostase et en thrombose artérielle.

L'absence ou un défaut de ce récepteur est responsable d'une maladie hémorragique, la thrombasthénie de Glanzmann, caractérisée par une incapacité des plaquettes à agréger **(Nurden 2006, Bledzka, Smyth et al. 2013)**. Le tableau clinique de cette pathologie est variable, allant de simples ecchymoses à des hémorragies sévères. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est la cible de différents médicaments anti-thrombotiques très efficaces, utilisés notamment dans la prise en charge des syndromes coronariens aigus **(Bledzka, Smyth et al. 2013)**.

II.3.5.2. L'intégrine $\alpha_V\beta_3$

L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ reconnaît les sites RGD du FW, du FG, de la FN et de la vitronectine, cette dernière étant son ligand privilégié. Ce récepteur ubiquitaire est présent sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et sur les plaquettes, qui en expriment entre 150 et 500 copies **(Kasirer-Friede, Kahn et al. 2007)**. Il a été montré qu'à l'état activé, $\alpha_V\beta_3$ assure l'adhérence des plaquettes sur une surface de vitronectine **(Paul, Vilaire et al. 2003)** ou de FN **(McCarty, Zhao et al. 2004)**. Son rôle en hémostase et en thrombose reste à découvrir **(Kasirer-Friede, Kahn et al. 2007)**.

II.4. Les récepteurs des agonistes solubles

Les agonistes solubles exercent leurs effets via des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G, qui initient différentes voies de signalisation menant en général à l'activation des intégrines et à la sécrétion du contenu des granules plaquettaires **(Ruggeri 2002, Jackson 2011)**.

II.4.1. Les récepteurs des nucléotides

Les plaquettes expriment trois récepteurs purinergiques de type P2 : $P2Y_1$, $P2Y_{12}$ et $P2X_1$. Le $P2Y_1$ et le $P2Y_{12}$ activent les plaquettes en réponse à l'ADP, alors que le $P2X_1$ est un récepteur canal stimulé par l'ATP **(Hechler and Gachet 2011)**.

II.4.1.1. Le récepteur $P2Y_1$

Le $P2Y_1$ est exprimé dans de nombreux tissus dont le cœur, la paroi des vaisseaux sanguins (cellules endothéliales, cellules musculaire lisse et fibroblastes), le système nerveux, la prostate, les testicules et les ovaires **(Hechler and Gachet 2011)**. Ce récepteur, qui est présent à environ 150 copies par plaquette, est couplé à une protéine G_q responsable de l'activation de la PLCβ et de la mobilisation des stocks internes de Ca^{2+} **(Gachet 2012)**. Il initie la réponse à l'ADP en induisant un changement de forme des plaquettes et une agrégation faible et transitoire (Figure 9) **(Hechler and Gachet 2011)**. Le $P2Y_1$ participe également à l'activation des plaquettes par le collagène et stimule leur activité pro-coagulante **(Leon, Hechler et al. 1999, Leon, Ravanat et al. 2003, Mangin, Ohlmann et al. 2004)**. L'absence de $P2Y_1$ à la surface des plaquettes ou son blocage par des antagonistes comme le MRS2179 et le MRS2500 ne prolonge que modérément le temps de saignement mais protège efficacement les souris contre la thrombose artérielle dans divers modèles *in vivo*. Ces résultats suggèrent que ce récepteur représente une cible anti-thrombotique potentiellement sûre **(Leon, Freund et al. 2001, Hechler, Nonne et al. 2006)**.

II.4.1.2. Le récepteur $P2Y_{12}$

Le récepteur $P2Y_{12}$ est présent au niveau des plaquettes, des CML, des cellules microgliales, de certaines sous populations de cellules dendritiques et des macrophages **(Gachet 2012)**. Les plaquettes possèdent environ 425 exemplaires de ce récepteur, qui est couplé à une protéine de la famille G_{i2} **(Ohlmann, Lecchi et al. 2012)**. La liaison de l'ADP au $P2Y_{12}$ inhibe l'activité de l'adénylate cyclase. Cette enzyme maintient les plaquettes au repos, en produisant de l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) **(Gratacap, Guillermet-Guibert et al. 2011, Hechler and Gachet 2011)**. La protéine G_{i2} active également les isoformes p110 β et γ de la PI-3K, qui mènent à la stimulation des PKC et de

Rap1b, dont la signalisation aboutit à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et à l'exposition de phospholipides pro-coagulants **(Guidetti, Lova et al. 2008, Hechler and Gachet 2011)**. Le récepteur $P2Y_{12}$ joue un rôle critique dans l'amplification de l'agrégation des plaquettes, initiée par $P2Y_1$ et en réponse à de nombreux activateurs tels que le TxA_2, la thrombine et le collagène **(Hechler and Gachet 2011)**.

Des patients ayant un récepteur $P2Y_{12}$ absent ou non fonctionnel souffrent de syndromes hémorragiques, ce qui souligne l'importance de ce récepteur en hémostase **(Cattaneo 2011)**. Le $P2Y_{12}$ est la cible des thiénopyridines antiagrégantes, une classe de médicament couramment utilisée en clinique pour la prévention et le traitement de la thrombose artérielle **(Yousuf and Bhatt 2011)**.

II.4.1.3. Le récepteur $P2X_1$

Le récepteur $P2X_1$ est présent dans de nombreux tissus dont la paroi vasculaire (cellules endothéliales, cellules musculaire lisse et fibroblastes), le système nerveux et l'appareil uro-génital. On en retrouve à la surface des plaquettes à hauteur de 150 copies **(MacKenzie, Mahaut-Smith et al. 1996, Ralevic and Burnstock 1998)**. Le $P2X_1$ est un récepteur canal à l'ATP, dont l'activation se traduit par une ouverture permettant un influx très rapide (10 ms) de Ca^{2+} et de Na^+ du milieu extracellulaire, causant notamment une dépolarisation membranaire (Figure 9) **(Mahaut-Smith, Jones et al. 2011)**. Le $P2X_1$ participe au changement de forme des plaquettes sans entrainer leur agrégation **(Mahaut-Smith, Jones et al. 2011)**. Il a été montré qu'il amplifie l'agrégation déclenchée par d'autres activateurs comme le collagène ou la thrombine. En condition de flux, son rôle apparait particulièrement important à des taux de cisaillement élevés **(Hechler, Lenain et al. 2003, Gachet 2006, Mahaut-Smith, Jones et al. 2011)**. Les souris déficientes en $P2X_1$ ou traitées avec un antagoniste de ce récepteur (NF 449) ne présentent pas de prolongement du temps de saignement, mais sont résistantes à la thrombose artérielle dans plusieurs modèles expérimentaux **(Hechler, Lenain et al. 2003, Hechler, Magnenat et al. 2005, Erhardt, Toomey et al. 2006)**.

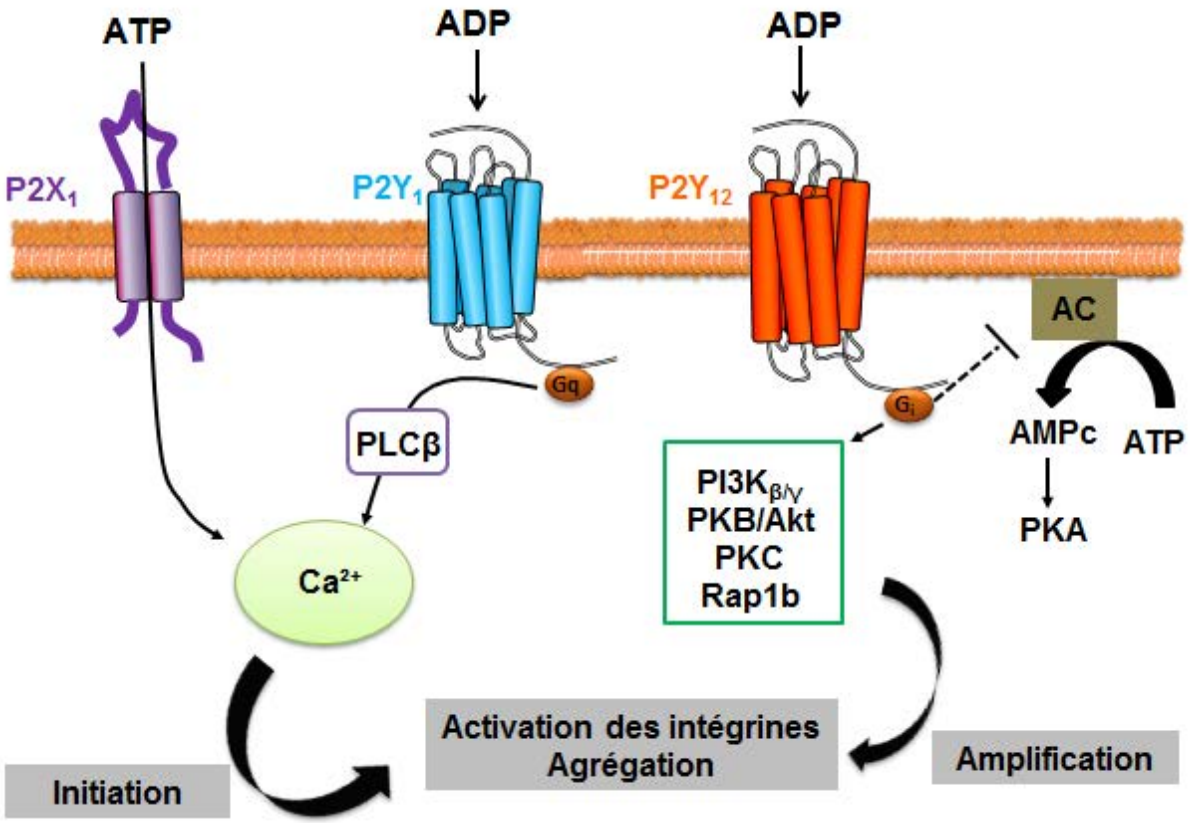


Figure 9 : Schématisation de la signalisation plaquettaire déclenchée par les récepteurs P2.

AC, adénylate cyclase ; AMPc, adénosine 3',5'-monophosphate cyclique ; PKA, protéine kinase A. Adapté de (**Hechler and Gachet 2011).**

II.4.2. Les récepteurs TP (Thromboxane/prostaglandine)

Les récepteurs TP sont exprimés dans de nombreux tissus et organes, incluant la paroi des vaisseaux sanguins, le thymus, le rein et la rate **(Davi, Santilli et al. 2012)**. Ces récepteurs au TxA_2 et aux isoprostanes existent sous deux formes appelées α et β, qui diffèrent par leur distribution et leur signalisation **(Giannarelli, Zafar et al. 2010)**. Dans les plaquettes l'isoforme α est prédominante avec environ 1.500 copies **(Nurden, Poujol et al. 2003)**. Le TPα est couplé aux protéines G_q et G_{12}, qui mènent à la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, à l'activation des PKC, des PI-3K p110β et γ, et de petites protéines G de type Rho et Ras **(Gratacap, Guillermet-Guibert et al. 2011, Davi, Santilli et al. 2012)**. La signalisation des récepteurs TPα aboutit au changement de forme des plaquettes, à la sécrétion du contenu des granules et à l'agrégation irréversible des plaquettes (Figure 10).

Des souris déficientes pour les récepteurs TP présentent une augmentation du temps de saignement **(Thomas, Mannon et al. 1998, Yu, Lin et al. 2004, Cathcart, Tamosiuniene et al. 2008)**. Différentes études ont montré chez la souris, qu'une inhibition des récepteurs TP est plus efficace que l'aspirine pour réduire la thrombose artérielle **(Hong, Huang et al. 2006, Vilahur, Casani et al. 2007, Davi, Santilli et al. 2012)**. Cependant, une étude clinique de phase III, appelé PERFORM, n'a pas montré d'efficacité supérieure du Terutroban, un antagoniste des récepteurs TP, par rapport à l'aspirine en prévention secondaire d'accidents ischémiques **(Bousser, Amarenco et al. 2011)**.

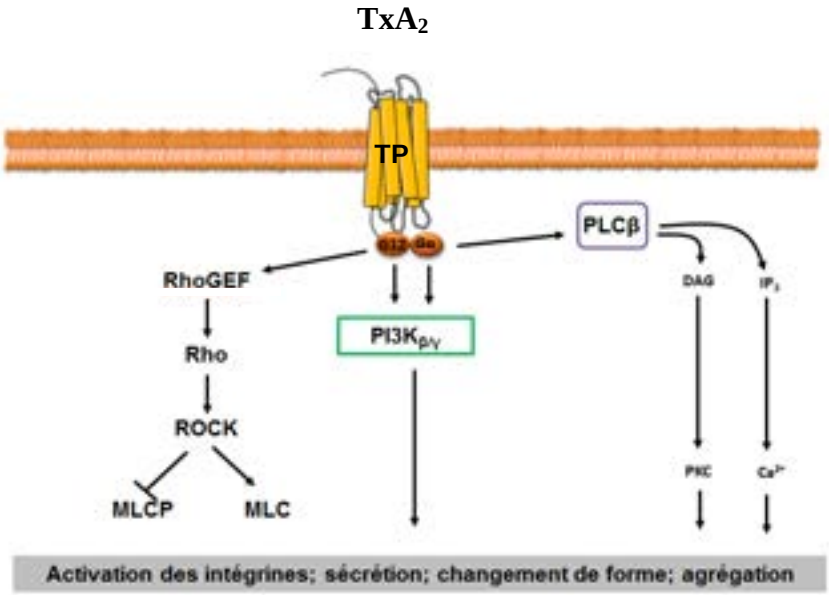


Figure 10 : Schématisation de la signalisation déclenchée par les récepteurs TP.

DAG, diacyl-glycérol ; 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.

A

B

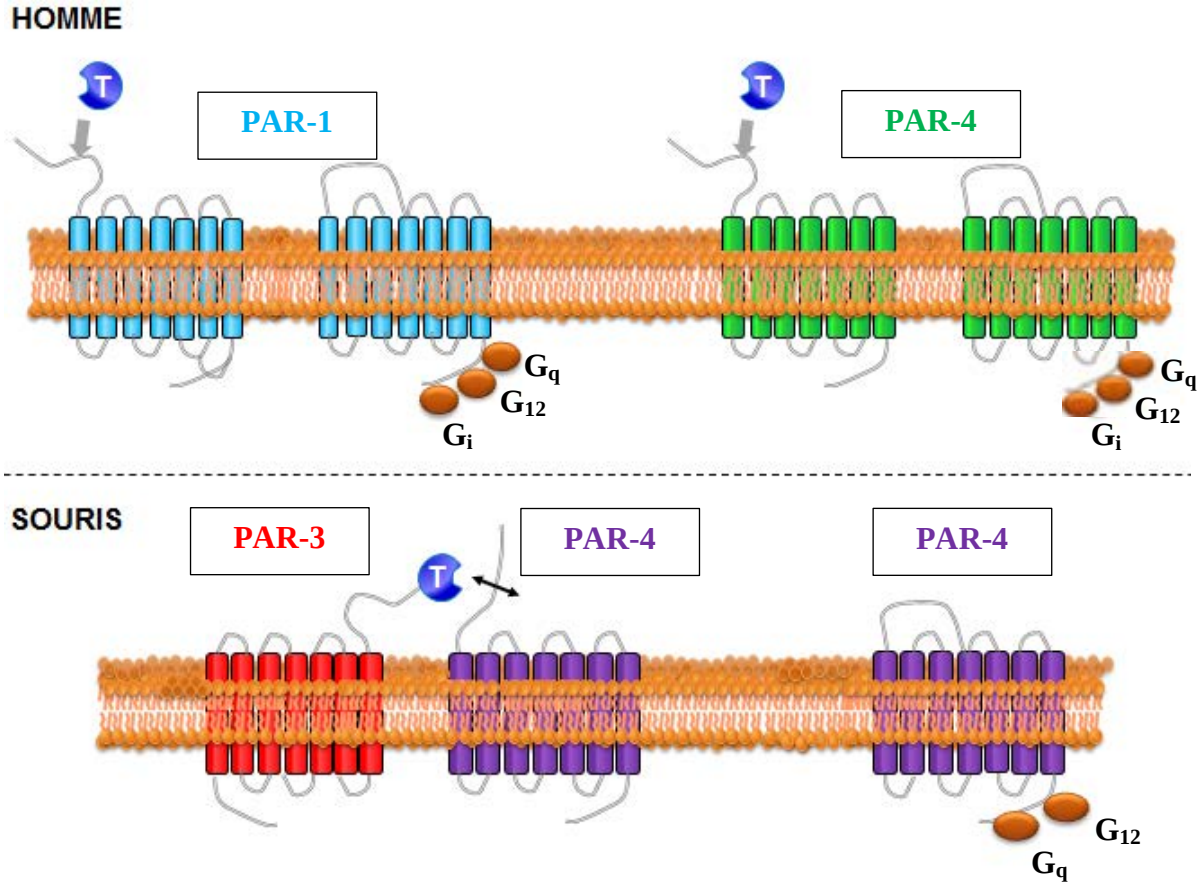


Figure 11 : Schématisation de l'activation des récepteurs PAR.

T : thrombine

II.4.3. Les récepteurs PAR

Les récepteurs PAR (Protease-activated receptor) sont présents sur les cellules endothéliales et les CML, dont ils stimulent la prolifération et l'activité sécrétoire. Les plaquettes humaines possèdent deux sous-types de récepteurs PAR, PAR-1 et -4 (1.500 et 2.000 copies) **(Molino, Bainton et al. 1997, De Candia 2012)**. En se liant aux récepteurs PAR-1 et -4, la thrombine clive l'extrémité N-terminale de ces récepteurs, démasquant un nouveau site, qui se replie et active le récepteur (Figure 11 A) **(De Candia 2012)**. PAR-1 est un récepteur de forte affinité qui induit une activation plaquettaire à de faibles concentrations de thrombine, alors que PAR-4 n'est stimulé qu'à de fortes concentrations **(De Candia 2012)**. PAR-1 et -4 sont couplés à des protéines des familles Gq et G_{12}, qui activent la PLCβ, la PI-3K p110β et des petites protéines G de type Rho et Ras (Figure 12) **(Shock, He et al. 1997, Angiolillo, Capodanno et al. 2010, Gratacap, Guillermet-Guibert et al. 2011)**. PAR-1 est aussi couplé à une protéine Gi, qui inhibe l'adénylate cyclase. La signalisation de ces récepteurs aboutit au changement de forme plaquettaire, à la synthèse de TxA_2, à l'activation des intégrines et à l'exposition de phospholipides pro-coagulants **(De Candia 2012)**.

Les plaquettes murines expriment les sous-types PAR-3 et -4 (Figure 11 B). PAR-3 fonctionne comme un co-récepteur, qui facilite l'activation de PAR-4 en augmentant la concentration locale de thrombine. Les souris déficientes pour le gène de PAR-3 ou -4 présentent un temps de saignement allongé et une thrombose artérielle fortement diminuée dans un modèle de lésion des artères mésentériques au $FeCl_3$ **(Sambrano, Weiss et al. 2001, Weiss, Hamilton et al. 2002)**.

L'inhibition de PAR-1 chez des primates a mis en évidence un rôle critique de ce récepteur en thrombose expérimentale, après lésion électrolytique de la carotide **(Derian, Damiano et al. 2003)**. En revanche, son rôle en hémostase semble modeste, ce qui peut s'expliquer par la présence d'un PAR-4 fonctionnel capable de compenser **(Derian, Damiano et al. 2003).** Différents antagonistes de PAR-1 ont été développé, tels que l'atopaxar et le vorapaxar un dérivé de l'himbacine **(Derian, Damiano et al. 2003, Chintala, Strony et al. 2010, Kogushi, Matsuoka et al. 2011)**. Des études cliniques de phase I ont confirmé que le vorapaxar et l'atopaxar ne prolongent pas le temps de saignement chez l'homme **(Serebruany, Kogushi et al. 2009, Kosoglou, Reyderman et al. 2012)**. Récemment, des essais cliniques de phase III ont montré que la trithérapie clopidogrel/aspirine/vorapaxar n'apporte pas de bénéfice dans le traitement des syndromes coronariens aigus en comparaison

de l'association clopidogrel/aspirine, mais augmente le risque de saignements intracrâniens, qui passe de 0,2% à 1,1% **(Merck 2012, Tricoci, Huang et al. 2012)**.

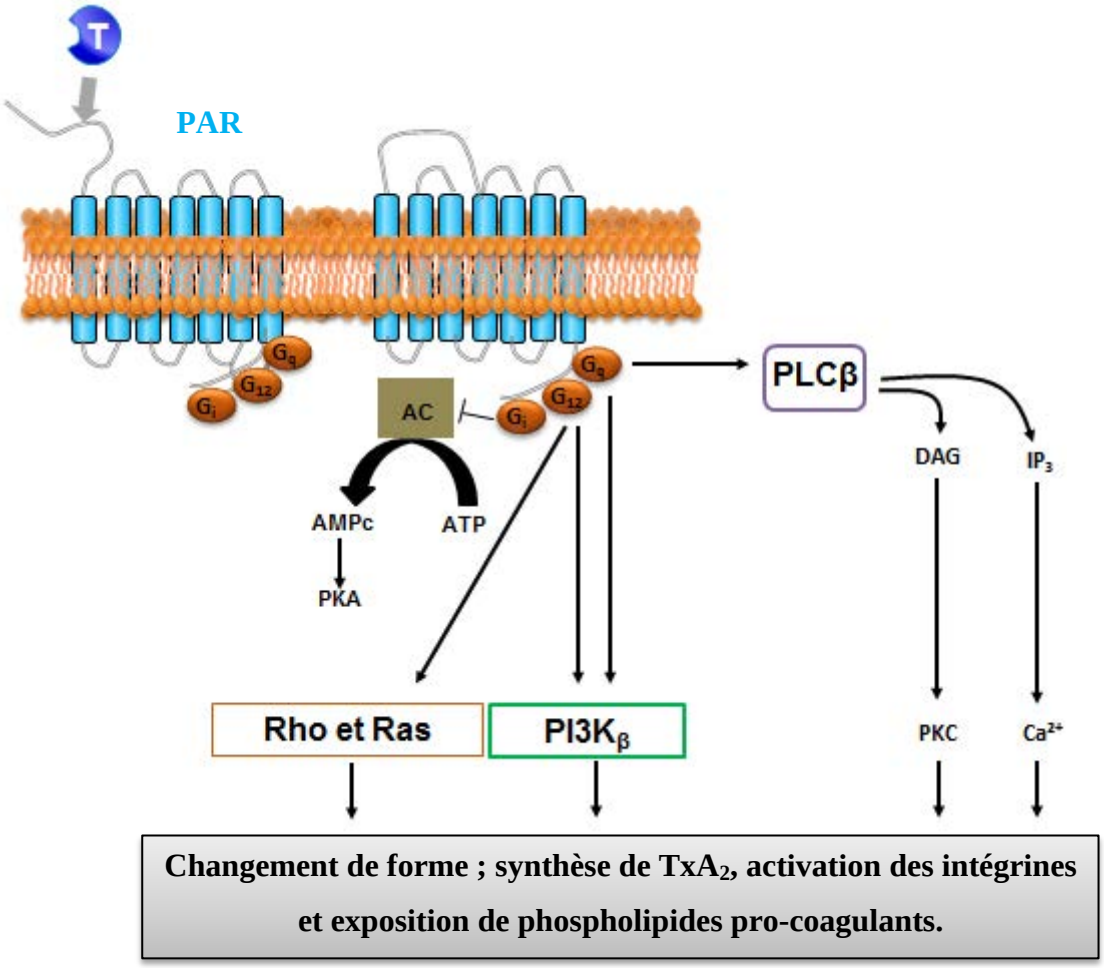


Figure 12 : Schématisation de la signalisation déclenchée par les récepteurs PAR

III. Le système cardio-vasculaire

Le système cardio-vasculaire est composé d'une pompe centrale, le cœur, et d'un réseau de canalisations, constitué par les artères, les capillaires et les veines **(Cussenot 2002)**. Ce système assure la circulation du sang, un processus essentiel aux échanges métaboliques, qui permet l'apport d'oxygène et de nutriments aux tissus ainsi que l'évacuation du dioxyde de carbone (CO_2) et des déchets de dégradation du fonctionnement cellulaire, dont l'urée.

III.1. Le cœur

III.1.1. Anatomie du cœur

Le cœur est un muscle creusé par quatre cavités : l'atrium droit (AD), l'atrium gauche (AG), le ventricule droit (VD) et le ventricule gauche (VG) (Figure 13) (**Cussenot, 2002**). Les deux ventricules sont séparés par le septum interventriculaire et les atriums par le septum interatrial. Les atriums et les ventricules sont cloisonnés par des valves atrioventriculaires : l'AD et le VD par la valve tricuspide, qui est composée de trois valves; l'AG et le VG par la valve mitrale, constituée de deux valves, dont la forme évoque une coiffe d'évêque, la mitre, d'où son nom.

III.1.2. Le cycle cardiaque

Le cycle cardiaque comporte deux périodes, une phase d'aspiration ou de récolte du sang, nommée la diastole et une phase d'éjection appelée la systole (Figure 14). La succession de ces deux phases est à l'origine de la pulsatilité sanguine **(Berne and Levy 2001)**.

La **diastole** est la phase de relâchement du cœur, au cours de laquelle la pression présente au niveau des atriums est supérieure à celle présente dans les ventricules, permettant l'ouverture des valves atrioventriculaires mitrales et tricuspides. Le sang présent dans l'AD provenant des veines caves supérieure et inférieure, et le sang de l'AG apporté par les veines pulmonaires s'écoulent alors respectivement dans le VD et le VG. Cet écoulement correspond au remplissage passif des ventricules, qui apporte 80% du volume de sang dans le ventricule.

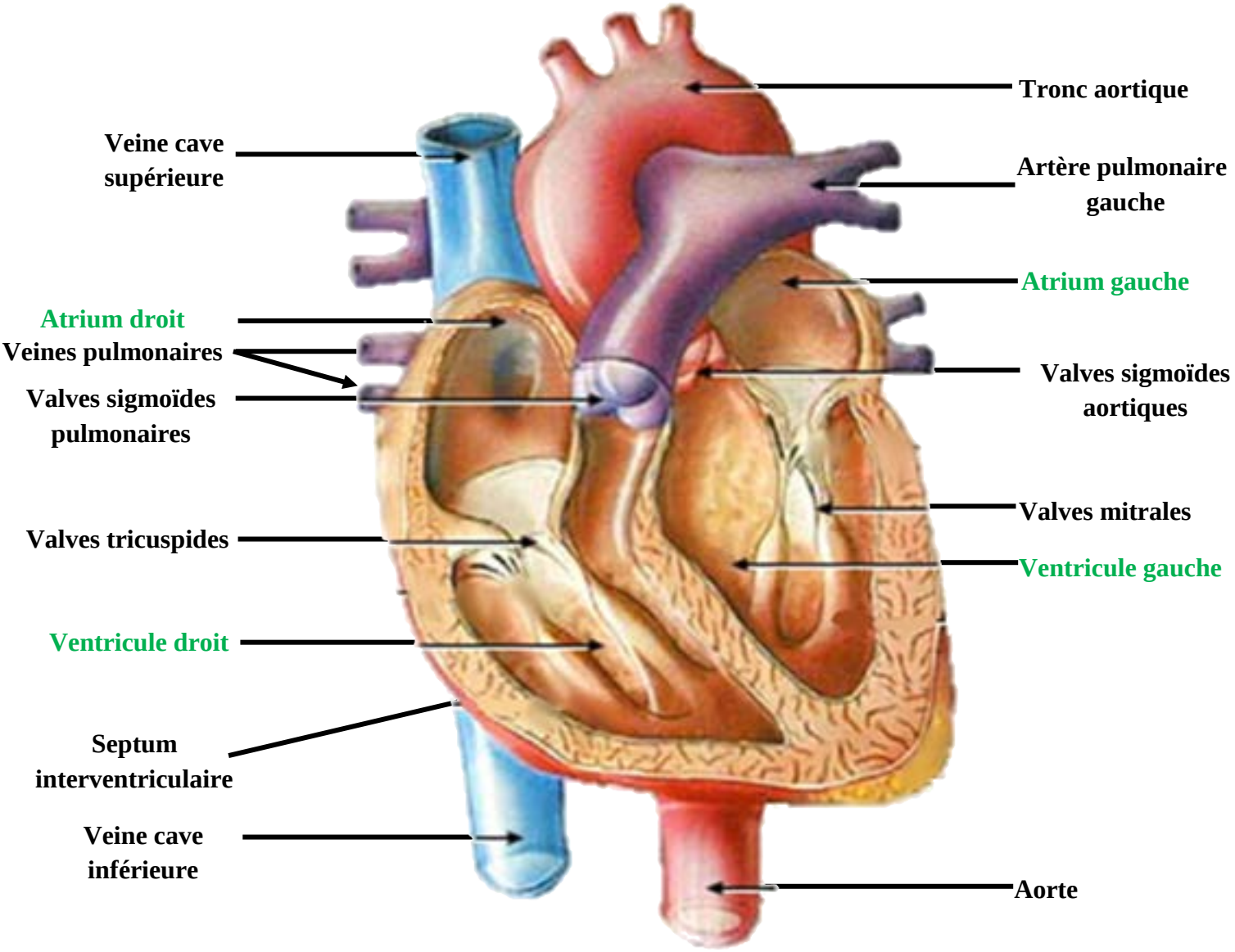
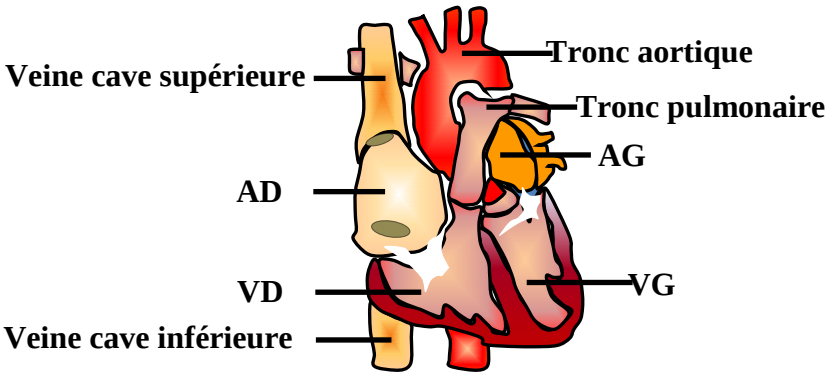
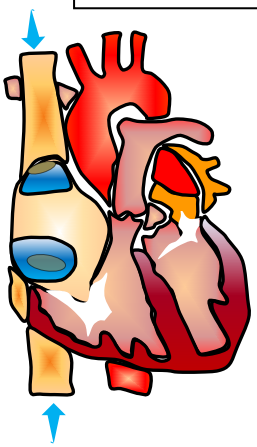


Figure 13 : Représentation schématique du cœur humain, adapté de (Netter 2011). Le septum interatrial n'est pas visible sur cette coupe.

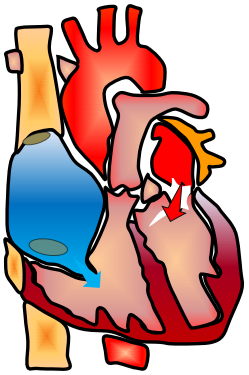
La **systole** est la phase de contraction permettant l'éjection du sang. Il existe une systole auriculaire (atrium) et une systole ventriculaire. La systole auriculaire chasse le sang présent dans les atriums vers les ventricules. Cette phase correspond au remplissage actif des ventricules, elle apporte les 20% restant du volume ventriculaire. La contraction du cœur, augmente la pression présente dans les ventricules ce qui entraine la fermeture des valves auriculo-ventriculaires mitrales et tricuspides, empêchant ainsi un reflux sanguin vers les atriums. Les ventricules continuent de se contracter et dès que la pression à l'intérieur des ventricules dépasse la pression présente au niveau des troncs aortiques et pulmonaires, les valvules sigmoïdes aortiques et pulmonaires s'ouvrent et le sang présent dans les ventricules est expulsé dans l'aorte et les artères pulmonaires **(Berne and Levy 2001)**.



Diastole : remplissage passif

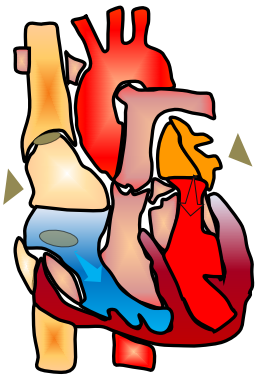


Le sang provenant des veines caves et des veines pulmonaires s'écoule au niveau de l'AG et l'AD.



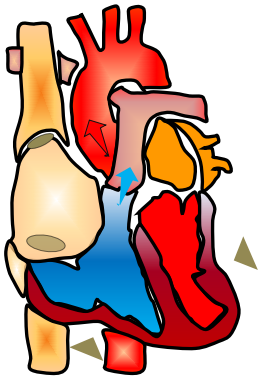
Le sang provenant de l'AG et de l'AD s'écoule respectivement dans le VG et le VD.

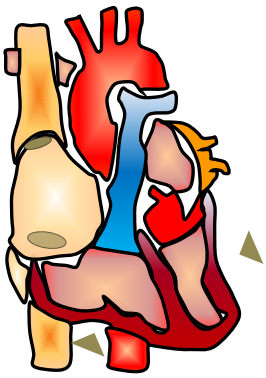
Systole auriculaire : remplissage actif

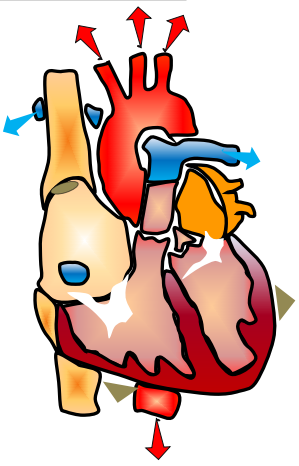


Les AG et AD se contractent, éjectant le sang restant au sein de ces cavités dans les ventricules.

Systole ventriculaire : éjection du sang vers le reste de l'organisme







Les VD et VG se contractent, expulsant du sang vers les troncs aortique et pulmonaire. A la fin de la systole, le cœur se relâche et un nouveau cycle de diastole commence.

Figure 14 : Représentation schématique du cycle cardiaque.

Le symbole ▶ correspond à une contraction.

III.2. Le système circulatoire

Le sang circule au travers de trois catégories de vaisseaux sanguins : les capillaires, les veines et les artères (Figure 15) **(Bou-Gharios, Ponticos et al. 2004)**. Ces trois types de vaisseaux contiennent les mêmes constituants de base mais diffèrent quant à leur organisation structurelle et à la proportion relative de ces différents composants **(Toussaint, Jacob et al. 2003).**

III.2.1. Structure des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois tuniques concentriques morphologiquement distinctes, qui sont dénommées de l'intérieur vers l'extérieur : intima, média et adventice (Figure 16). L'intima, la tunique la plus fine et la plus proche de la lumière du vaisseau, est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) reposant sur un sous-endothélium contenant une membrane basale (voir page 73) **(Wagenseil and Mecham 2009)**. La média comprend des cellules musculaires lisses (CML) entourées par une matrice riche en collagène, en fibres élastiques et en protéoglycanes. L'adventice est la couche la plus externe. Elle est constituée de fibres de collagène et de fibres élastiques associées à des fibroblastes **(Wagenseil and Mecham 2009)**. En plus de ces trois tuniques, les artères possèdent des lames élastiques acellulaires, les limitantes élastiques internes (LEI) et externes (LEE) qui séparent respectivement l'intima de la média et la média de l'adventice **(Eroschenko, 2000)**.

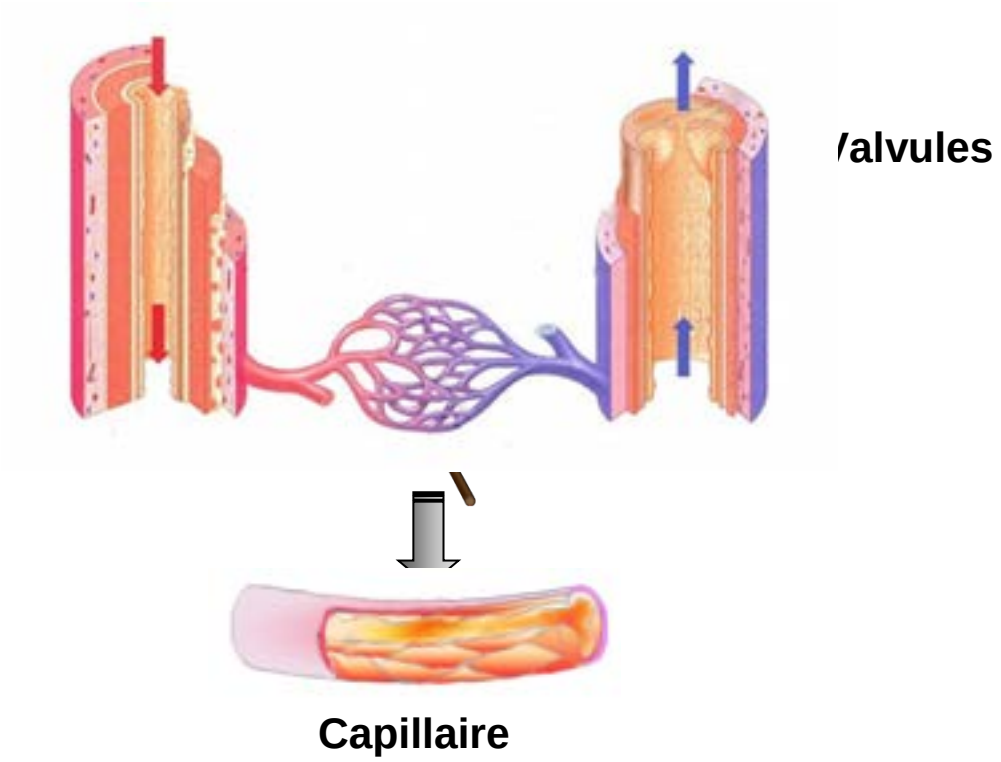


Figure 15 : Le système circulatoire. Il se compose de trois catégories de vaisseaux : les artères, les veines et les capillaires. Adapté de **(Tortora and Derrickson 2007)**.

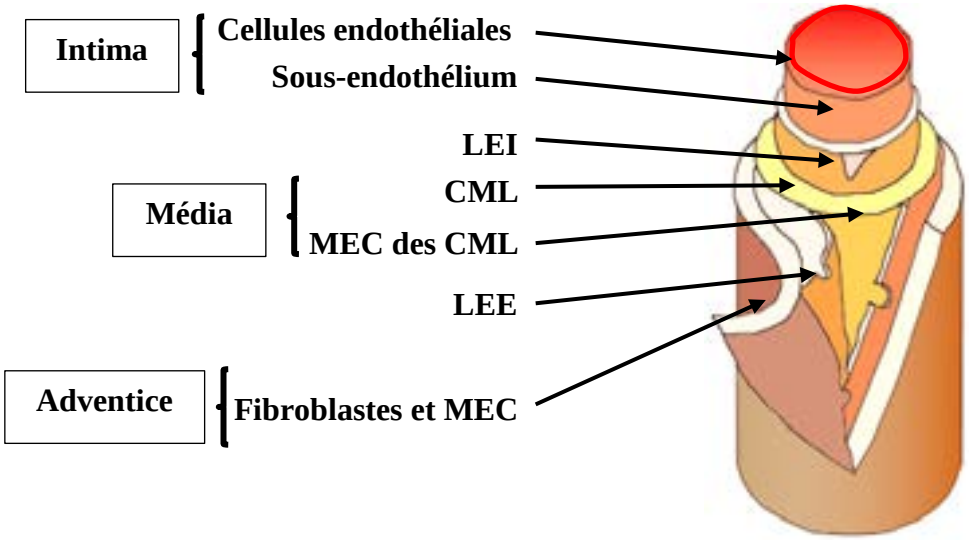


Figure 16 : Structure schématique d'une artère saine. LEI : limitante élastique interne; CML : cellules musculaires lisses; LEE : limitante élastique externe; MEC : matrice extracellulaire. Adapté d'**(Eroschenko 2000)**.

III.2.2. Les capillaires et les veines

Les **capillaires** se composent d'une intima constituée d'une couche de CE reposant uniquement sur une membrane basale. Ce sont les plus petits vaisseaux sanguins du corps avec un diamètre variant de 3 à 30 µm. Les capillaires ont pour fonction essentielle de fournir aux cellules des nutriments et de l'oxygène et en retour de capter les déchets et le CO_2. Il existe trois types de capillaires : les continus, fenêtrés et discontinus **(Yuan and Rigor 2010)**. Les **capillaires continus**, qui sont les plus nombreux, sont constitués de CE jointives reposant sur une membrane basale continue. Ils sont entourés de cellules contractiles, les péricytes, qui contrôlent le débit circulatoire des capillaires. Les **capillaires fenêtrés** possèdent des CE présentant des pores qui reposent sur une membrane basale continue, permettant le passage de macromolécules. Les **capillaires discontinus,** localisés notamment dans la rate, le foie et la moelle osseuse, sont constitués par des CE non jointives et permettent le passage de cellules sanguines.

Les **veines** présentent un diamètre variant de 1 à 5 mm. Elles sont composées des trois tuniques. En comparaison aux artères, la paroi des veines est plus mince et contient moins de CML et de fibres élastiques mais davantage de fibres de collagène. Les veines possèdent également de petites valvules qui empêchent le reflux sanguin, dont l'existence a été décrite pour la première fois par Ludovicus Vassaeus en 1544. Les veines assurent le retour du sang chargé en CO_2 et en déchets de dégradation du fonctionnement cellulaire, vers le cœur.

III.2.3. Les artères

Les **artères** sont classées en artères élastiques, musculaires et artérioles (**Wagenseil et al., 2009**). Les **artères élastiques** sont de gros vaisseaux partant du cœur tels que l'aorte, et ont un diamètre allant de 8 à 25 mm. Ces artères sont riches en fibres élastiques leur conférant la capacité de se dilater pour supporter les changements continuels de pression imposés par l'activité cardiaque (**Wagenseil et al., 2009**). Elles se ramifient en **artères musculaires**, comme les artères fémorales. Les artères musculaires ont un diamètre moyen qui varie entre 2 et 7 mm, et contiennent plus de CML et moins de fibres élastiques que les artères élastiques. Elles sont moins extensibles et interviennent davantage dans la vasoconstriction. Leur capacité à faire varier leur diamètre en se contractant (vasoconstriction) ou en se relâchant

(vasodilatation), permet de réguler la distribution du sang selon les besoins tissulaires. Les artères musculaires se ramifient en **artérioles**, dont le diamètre est inférieur à 300 µm. Les artérioles sont pauvres en fibres élastiques et contiennent une à trois couches de CML. Elles assurent la jonction avec les capillaires et possèdent des propriétés proches de celles des artères musculaires, qui leurs permettent de réguler l'apport sanguin au niveau des capillaires. La vasomotricité des artérioles participe à la régulation de la résistance périphérique, qui correspond aux forces de friction du sang exercées sur la paroi des vaisseaux situés loin du cœur **(Toussaint, Jacob et al. 2003)**.

III.2.4. Les cellules de la paroi artérielle

III.2.4.1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales (CE) sont des cellules aplaties et polarisées qui reposent sur une membrane basale et qui sont au contact du sang circulant au niveau apical. Elles s'assemblent en une monocouche, nommée l'endothélium qui borde la lumière de l'ensemble du système cardiovasculaire. D'un point de vue fonctionnel, les CE ne constituent pas simplement une barrière physique, mais représentent une véritable structure fonctionnelle, modulatrice de nombreux processus homéostatiques **(Aird 2005)**. Les CE forment une barrière de perméabilité sélective, qui régule les échanges entre le sang et les tissus. Elles sont également le siège d'une activité importante de synthèse et de sécrétion, de médiateurs impliqués dans différents processus, dont l'angiogenèse (synthèse d'angiopoiétine-2), l'inflammation (synthèse d'interleukine 1) et la vasomotricité (production de monoxyde d'azote et endothéline-1) **(Miossec, Cavender et al. 1986, Michiels 2003)**. Les CE produisent également des composants retrouvés dans la membrane basale et le sous-endothélium, dont les collagènes, le FW, les laminines et les fibronectines **(Boneu and Cazenave 1997, Bergmeier and Hynes 2012)**. De plus, les CE possèdent des corps de Weibel-Palade, où sont stockés des médiateurs et protéines, qui participent aux différents processus cités dans ce paragraphe **(Aird 2005, Metcalf, Nightingale et al. 2008)**. Dans la suite de ce chapitre nous allons nous focaliser sur le rôle des CE dans les processus d'hémostase et de thrombose.

A) Propriétés anti-thrombotiques de l'endothélium quiescent

Les propriétés anti-thrombotiques de la CE, résultent de la nature de sa membrane plasmique et de sa capacité à libérer des substances, qui vont i) prévenir l'adhérence et l'activation plaquettaire, ii) inhiber la cascade de la coagulation et iii) favoriser la fibrinolyse.

i) Prévention de l'adhérence et de l'activation plaquettaire (Figure 17 A) : Les propriétés anti-thrombotiques des CE résultent en partie de la charge négative de leurs membranes qui prévient l'attachement plaquettaire. De plus, les CE présentent à leur surface des ecto-nucléotidases (CD39 : ecto-ATP/ADPase et CD73 : 5'-ectonucléotidase), qui hydrolysent les agonistes plaquettaires ATP et ADP, générant de l'adénosine qui maintient les plaquettes au repos **(Atkinson, Dwyer et al. 2006)**. Cet effet est renforcé par la libération de deux puissants inhibiteurs plaquettaires, le NO et la PGI_2, formés respectivement à partir de la L-arginine et de l'acide arachidonique.

ii) Inhibition de la cascade de la coagulation (Figure 17 B) : La coagulation est inhibée au niveau de la face luminale des CE par la présence de protéoglycanes à héparane sulfate, qui sont capables de favoriser l'action de l'antithrombine (AT) et du TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), qui inhibent respectivement l'action de la thrombine et de la voie du facteur tissulaire. Les CE expriment également de la thrombomoduline (TM), une protéine transmembranaire qui participe à l'inhibition de la génération de la thrombine.

iii) Favorisation de la fibrinolyse (Figure 17 C). Les CE contribuent à la fibrinolyse en libérant l'activateur du plasminogène de type tissulaire (t-PA) et de type urokinase (u-PA) permettant la transformation du plasminogène en plasmine **(Boneu and Cazenave, 1997)**.

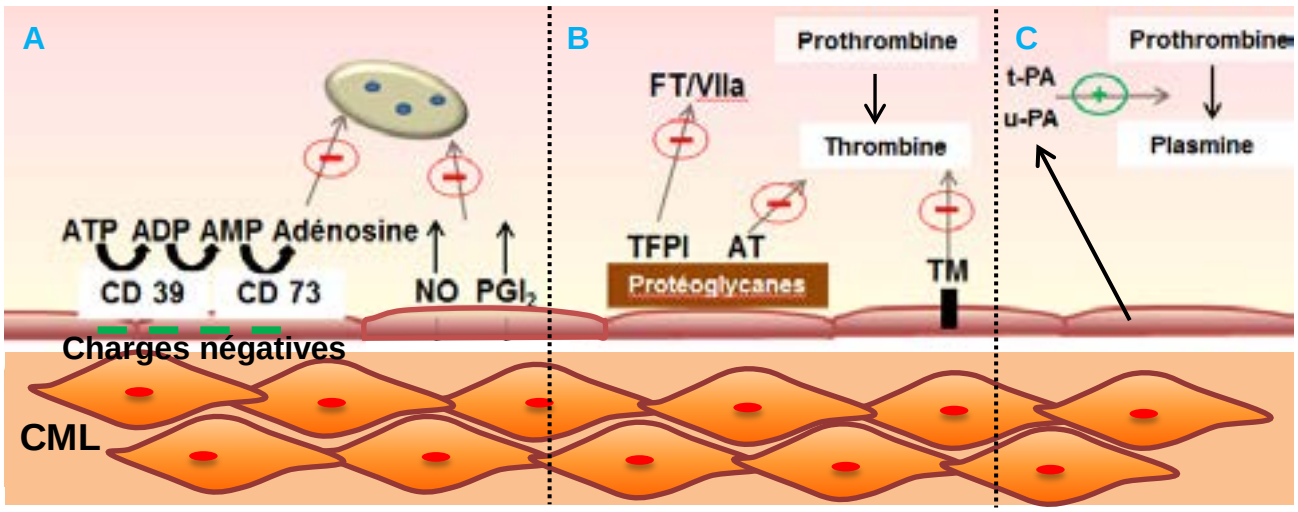


Figure 17 : Propriétés anti-thombotiques de l'endothélium quiescent.

A) Prévention de l'adhérence et de l'activation plaquettaire. B) Inhibition de la cascade de la coagulation C) Favorisation de la fibrinolyse. L'endothélium possède une activité biologique de synthèse, de sécrétion et de captation. AMP, adénosine 5'-monophosphate; AT, antithrombine; CML, cellule musculaire lisse; FT, facteur tissulaire; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; t-PA, tissue plasminogen activator; TM, thrombomoduline; u-PA, urokinase plasminogen activator.

B) Propriétés pro-thrombotiques des cellules endothéliales activées

L'activation des CE se produit en réponse à différents stimuli, d'une part de nature physique, tel que des flux sanguins perturbés, et d'autre part de nature chimique tel que l'ADP, l'ATP, la thrombine ou des cytokines. L'activation peut se produire dans un contexte physiologique, au cours de l'hémostase ou pathologique comme lors du diabète. La thrombogénéicité des CE activées, provient de leur capacité à présenter et à sécréter des substances, qui peuvent être i) pro-adhérentes et pro-activatrices pour les plaquettes, ii) pro-coagulantes et iii) inhibitrices de la fibrinolyse.

i) Facteurs pro-adhérents et pro-activateurs (Figure 18 A). La CE activée expose des molécules adhésives comme le FW et la P-sélectine, issus de l'exocytose des corps de Weibel-Palade (**Melcalf et al. 2008**). L'interaction des plaquettes avec le FW et la P-sélectine via la GPIbα et PSGL-1 (P-selectin GP ligand-1), permet leur capture et leur roulement à la surface de l'endothélium activé. L'endothélium activé sécrète également du TxA_2 et du PAF (platelet activating factor) qui activent les plaquettes **(Bustos, Coffman et al. 1997, McHowat, Kell et al. 2001)**.

ii) Les CE activent la cascade de coagulation en exposant du facteur tissulaire (FT) et des phospholipides membranaires anioniques, menant à une génération rapide de thrombine. De plus, les CE activées présentent une expression diminuée de la thrombomoduline, elles sont en conséquence moins à même de fixer la thrombine. (Figure 18 B).

iii) Le système fibrinolytique est inhibé via la sécrétion d'inhibiteurs des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1) qui inhibent le t-PA (Figure 18C) **(van Meijer and Pannekoek 1995)**.

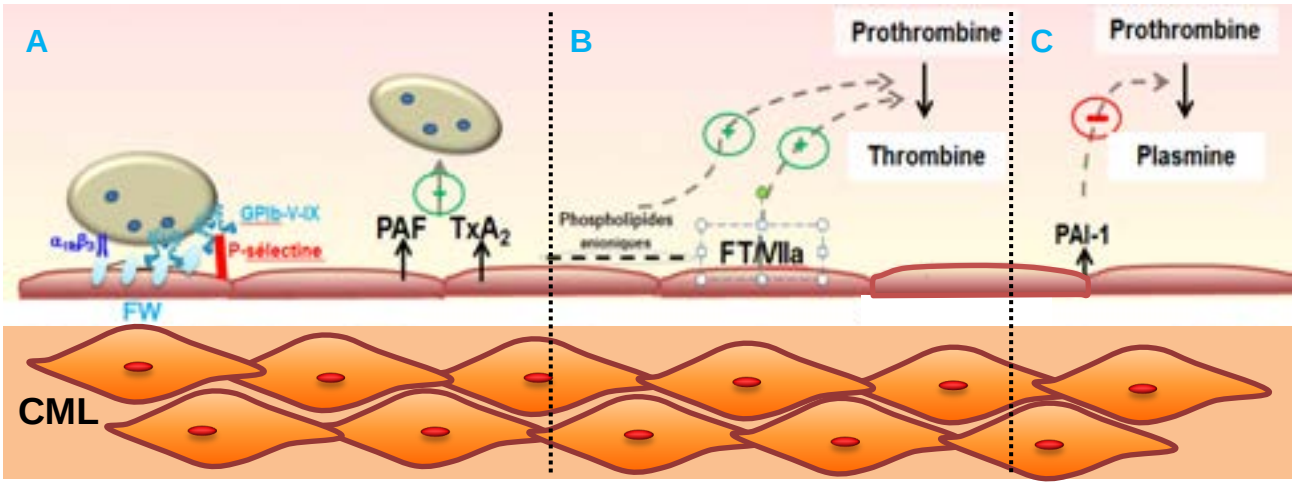


Figure 18 : Propriétés pro-thrombotiques de l'endothélium activé

A) Exposition et sécrétion de molécules pro-adhérentes et activatrices. B) Activation de la cascade de coagulation. C) Inhibition de la fibrinolyse. CML, cellule musculaire lisse; **FT**, facteur tissulaire; **PAF**, platelet-activating factor; **PAI-1**, plasminogen activator inhibitor-1.

III.2.4.2. Les cellules musculaires lisses et les fibroblastes

Les CML sont des cellules mononucléées et fusiformes retrouvées au niveau de la média **(Toussaint, Jacob et al. 2003, Bou-Gharios, Ponticos et al. 2004)**. Dans la paroi artérielle saine, la grande majorité des CML sont riches en myofilaments leur conférant un phénotype contractile. Leur principale fonction est de contrôler le tonus des vaisseaux. Ces CML sont incapables de migrer et possèdent une capacité de prolifération et de sécrétion faible **(Rensen, Doevendans et al. 2007)**. Dans certaines situations, comme par exemple suite à une lésion vasculaire, les CML sont stimulées et acquièrent un phénotype « sécrétoire », dévolu à la synthèse des macromolécules de la MEC. Ces CML participent activement au processus de cicatrisation en contribuant à la formation du nouveau tissu conjonctif **(Thyberg, Blomgren et al. 1997, Bou-Gharios, Ponticos et al. 2004).**

Les fibroblastes sont des cellules fusiformes ou étoilées pourvues de longs prolongements cytoplasmiques qui se localisent dans l'adventice (**Bou-Gharios et al., 2004**). Les fibroblastes ont pour fonction d'assurer la synthèse des macromolécules protéiques et polysaccharidiques de la MEC. Ils jouent un rôle essentiel dans la réparation tissulaire en dégradant le tissu lésé et en produisant une nouvelle MEC.

Les CML et les fibroblastes possèdent des propriétés pro-coagulantes car ils expriment de manière constitutive du facteur tissulaire à leur surface **(Mackman 1997)**. Ils sont également capables d'en sécréter après stimulation par des cytokines ou des facteurs de croissance comme le TGFβ (Transforming growth factor β) générés notamment lors de réactions inflammatoires.

III.3. La matrice extracellulaire

Les cellules de la paroi vasculaire sont enchâssées dans un réseau structuré et complexe formé de diverses molécules de nature protéique et glucidique, appelé la matrice extracellulaire (MEC). Les constituants de cette matrice sont classés en deux catégories : les glycoprotéines (GP) et les protéoglycanes. La composition de la MEC vasculaire n'est pas figée, elle varie selon le territoire vasculaire, au cours du vieillissement et de pathologies comme l'athérosclérose **(De Jaeger and Cherin 2012)**.

La MEC est une structure de soutien du vaisseau par sa capacité à conférer une rigidité et une résistance mécanique. Elle régule également la différenciation, la prolifération, la survie et la migration des CE, des CML et des fibroblastes **(Hynes 2009)**. D'autre part, elle participe à la réponse thrombogène suite à une lésion vasculaire en permettant l'adhérence et l'activation des plaquettes.

Les membranes basales sont une structure spécialisée de la MEC constituant un feuillet continu sous les CE et une gaine autour des CML. Elles se distinguent du reste de la MEC, par un haut degré d'organisation spatiale. Elles sont riches en collagène IV, en laminine, en nidogène et en perlecan **(Yurchenco 2011)**. Les membranes basales assurent des fonctions mécaniques de soutien et de cohésion et modulent différentes fonctions cellulaires **(Aumailley and Verrando 1993)**.

III.3.1. Les glycoprotéines

Une GP est une protéine portant un ou plusieurs groupements oligosaccharidiques. La MEC de la paroi vasculaire compte de nombreuses GP, dont les collagènes, la fibronectine, le facteur Willebrand, le fibrinogène, les laminines, les thrombospondines et les fibres élastiques.

III.3.1.1. Les collagènes

Les collagènes forment une famille de 27 membres. Chaque molécule de collagène est constituée d'une répétition d'un motif Glycine -X-Y, où X est fréquemment une proline et Y une hydroxyproline. Ces répétitions forment une chaîne polypeptidique, appelée chaîne α, enroulée en hélice gauche. Ces unités élémentaires sont principalement synthétisées par les CE, les CML et les fibroblastes. Trois chaînes α s'associent en une superhélice droite, appelée procollagène. Le clivage des domaines amino- et carboxy- terminaux par des peptidases convertit les molécules de procollagène en tropocollagène, qui s'associent pour former des polymères (Figure 19).

Au niveau des vaisseaux sanguins, 13 types de collagène répartis en 5 groupes en fonction de leur organisation supramoléculaire ont été décrits **(De Jaeger and Cherin, 2012)**. On distingue les collagènes : **a**) formant des fibrilles (I, III, V). Les molécules de tropocollagènes s'associent entre elles avec un léger décalage pour former une fibrille d'aspect strié. **b**) formant des réseaux (IV, VIII). Le tropocollagène s'assemble pour former un feuillet en forme tétramérique pour le type IV ou hexagonal pour le type VIII; **c**) formant des microfibrilles perlées (VI). Les tropocollagènes s'assemblent en dimères, puis en tétramères qui s'organisent les uns à la suite des autres en microfibrilles présentant des excroissances latérales donnant un aspect « perlé »; **d**) de la famille FACIT (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triplehelix) (XII, XIV, XV, XVI, XVIII, XIX). Ces collagènes s'associent aux fibrilles de collagène de type I, III, V, VI; **e**) de jonction et d'ancrage (VII). Le tropocollagène s'assemble en dimères qui s'associent latéralement pour constituer des fibrilles d'ancrage, permettant d'arrimer des structures macromoléculaires entre elles, comme la membrane basale à la MEC sous-jacente (Figure 19) **(van der Rest and Garrone 1991, Exposito, Cluzel et al. 2002)**. Ces 13 collagènes sont retrouvés dans les différentes couches de la paroi vasculaire. Les membranes basales contiennent des collagènes de type IV, et en moindre quantité les types III et VII. Au niveau de l'intima sont essentiellement présents les collagènes III, VI et XII. La média et l'adventice contiennent des collagènes de type I et III. Les autres types de collagènes trouvés dans la paroi sont minoritaires **(Farquharson and Robins 1989)**.

La fonction principale des collagènes est de conférer au vaisseau ses caractéristiques de rigidité et résistance mécanique. Une anomalie du collagène de type III entraine le syndrome d'Ehlers-Danlos, qui se traduit par une fragilité vasculaire, prédisposant à des ruptures d'anévrisme et des dissections aortiques **(De Paepe and Malfait 2012)**. Les collagènes font

partie des éléments les plus thrombogènes du sous-endothélium. Ils induisent l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes *in vitro* **(Parsons, Haycraft et al. 1986, Saelman, Nieuwenhuis et al. 1994, Nieswandt and Watson 2003).**

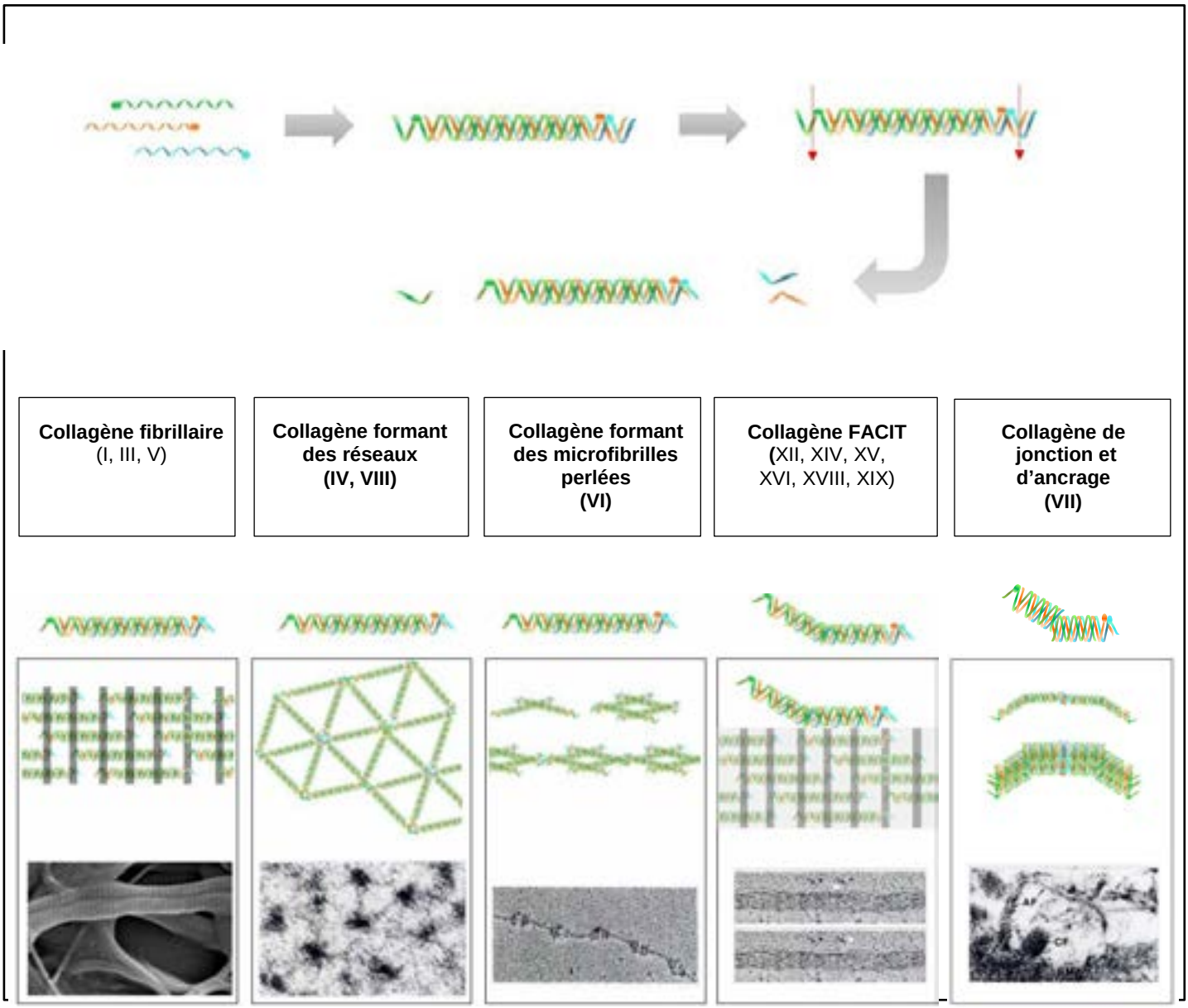


Figure 19 : Schématisation et micrographie électronique de l'organisation supramoléculaire de différents types de collagène retrouvés au niveau de la paroi vasculaire (adapté de **(van der Rest and Garrone 1991)).**

III.3.1.2. La fibronectine

Le terme fibronectine (FN) provient du latin, *fibro* et *nectere*, signifiant la « fibre qui relie », ce qui fait allusion à sa capacité à relier les cellules au collagène. Elle est composée de deux chaînes polypeptidiques reliées à leur extrémité C-terminale par deux ponts disulfure pour former un dimère d'environ 500 kDa. Chaque monomère est constitué de domaines répétés, au nombre de 12 pour le type I (45 AA), 2 pour le type II (60 AA) et de 15 à 17 pour le type III (90 AA), et d'une séquence variable "V" **(Pankov and Yamada 2002)**. Ces domaines interagissent avec de nombreux partenaires dont les collagènes, la fibrine et les glycosaminoglycanes (Figure 20). La FN est codée par un gène unique, qui génère 20 isoformes par épissage alternatif de son ARNm. Ces isoformes se différencient par l'inclusion ou l'exclusion : **a)** de l'extra domaine A (ED-A); **b)** de l'extra domaine B (ED-B); **c)** du quinzième domaine de type III (III_{15}) et **d)** de la séquence variable V : qui donne naissance à 5 variants (**Pankov and Yamada, 2002**). La présence ou l'absence des extra domaines permet de différencier deux formes de FN, la fibronectine plasmatique (FNp) et la fibronectine cellulaire (FNc) (Figure 20) :

- La FNp ne contient ni l'ED-A, ni l'ED-B et un seul de ses deux monomères possède la séquence variable V. Elle est synthétisée par les hépatocytes et circule dans le sang sous une forme dimérique soluble à une concentration de 230 à 650 µg/mL chez l'homme et de 600 µg/mL chez la souris. La FNp est également retrouvée au niveau de la MEC, où elle adopte une forme fibrillaire.
- La FNc regroupe une grande variété d'isoformes contenant l'ED-A et/ou ED-B et les différents variants d'épissage de la séquence V. Elle est synthétisée par les mégacaryocytes et se retrouve stockée dans les granules α des plaquettes. Au niveau de la paroi vasculaire, elle est produite par les CE, les CML et les fibroblastes et se localise dans toutes les couches du vaisseau. Dans la MEC, la FNc est assemblée en fibrilles insolubles. La FNc peut également être retrouvée sous une forme soluble dans le plasma à une concentration relativement faible de 1,3 à 1,4 µg/mL **(To and Midwood 2011)**. La concentration plasmatique de FNc augmente au cours de certaines pathologies telles que les accidents vasculaires cérébraux (7,3 µg/mL) **(Castellanos, Leira et al. 2004)**.

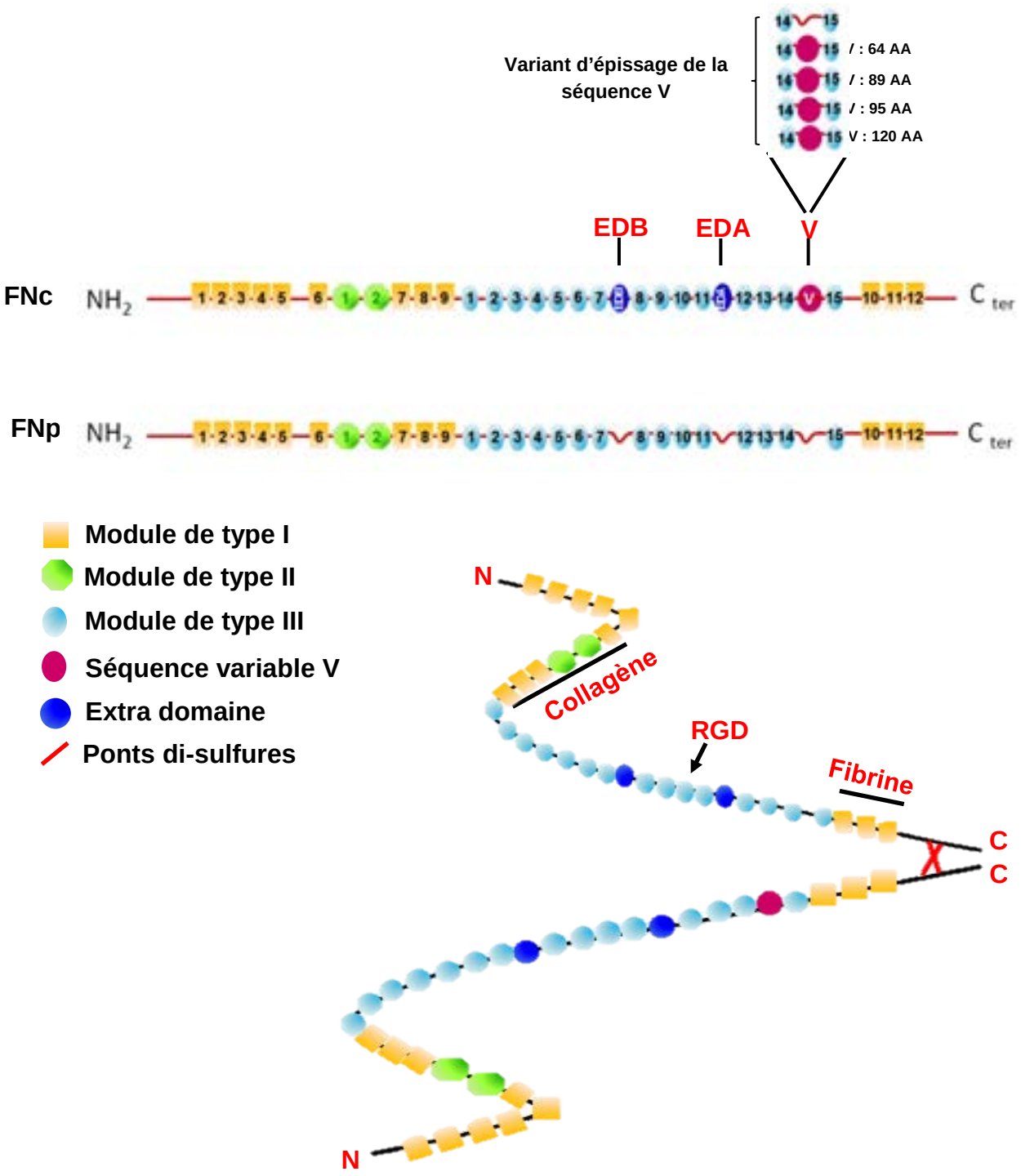


Figure 20 : Composition d'un dimère de FNc et FNp (adapté de **(Pankov and Yamada 2002; Cho and Mosher 2006)).** Les différents modules de type I, II, III, la séquence variable, le domaine RGD, ainsi que les sites d'interactions avec le collagène et la fibrine sont représentés sur la molécule de FN.

Au niveau de la MEC, la FN est sécrétée sous une forme soluble, qui est compacte en raison des interactions électrostatiques entre les domaines III_{12}-III_{14} d'un monomère avec les domaines III_2-III_3 de l'autre monomère **(Erickson and Carrell 1983, Johnson, Sage et al. 1999, To and Midwood 2011)**. Cette forme compacte de FN se lie aux intégrines présentes à la surface des cellules, notamment à $\alpha_5\beta_1$ **(Akiyama, Yamada et al. 1989)**, initiant une signalisation responsable d'une contractilité cellulaire menant au rassemblement (ou « clustering ») des intégrines. Ceci va permettre le rapprochement physique des molécules de FN ainsi que leur dépliement qui expose des sites d'interactions FN-FN. Les monomères de FN vont alors s'associer et se polymériser en fibres (Figure 21) **(Morla and Ruoslahti 1992, Singh, Carraher et al. 2010).**

La FN joue un rôle essentiel dans le développement des vertébrés. L'invalidation de son gène chez la souris est létale, résultant principalement de défauts de migration et de formation du mésoderme, un feuillet embryonnaire à l'origine du système cardio-vasculaire **(George, Georges-Labouesse et al. 1993)**. La FN régule de nombreuses fonctions cellulaires, telles que l'adhérence, la migration, la croissance et la différenciation (**Pankov and Yamada, 2002**). Elle intervient également dans la progression de certains cancers, dont les tumeurs ovariennes **(Olt, Berchuck et al. 1992)**. Enfin, la FN participe au processus de cicatrisation, en contribuant d'une part à la formation du réseau de fibrine qui vient consolider l'agrégat plaquettaire **(Greiling and Clark 1997)**, et d'autre part en concourant au recrutement et à l'activation des fibroblastes qui dégradent le tissu lésé et synthétisent la nouvelle matrice **(Kohan, Muro et al. 2010)**.

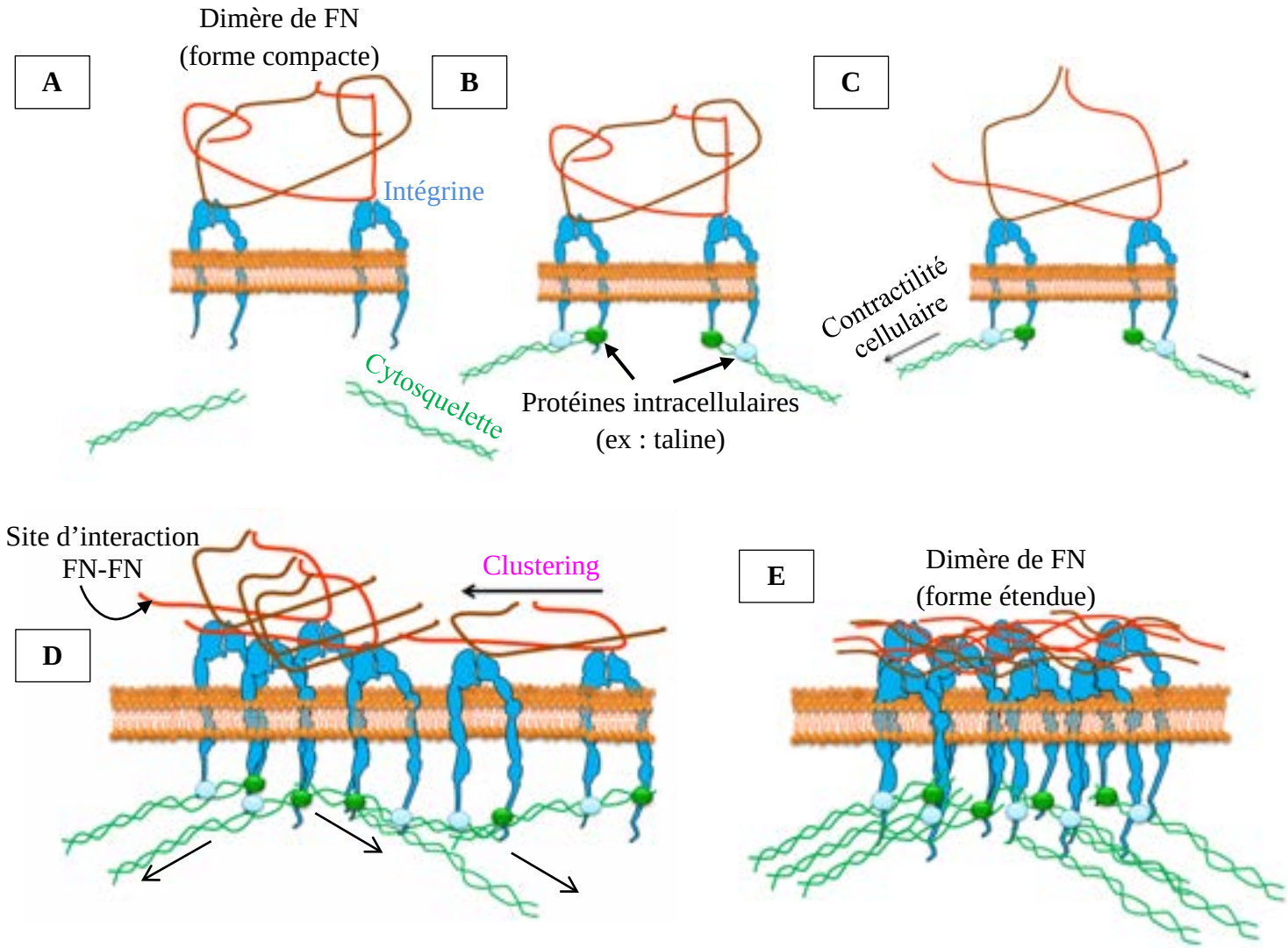


Figure 21 : Dynamique d'assemblage des fibres de FN (adapté d'après Singh et al., 2010).

(**A**) La FN soluble et compacte lie les intégrines des cellules de la paroi vasculaire. (**B**) L'interaction entre la FN et les intégrines initie une signalisation intracellulaire, qui permet la liaison des domaines cytoplasmiques des intégrines au cytosquelette d'actine et une réorganisation du cytosquelette. (**C**) La contractilité des cellules participe au dépliement de la FN. (**D**) Le clustering des intégrines associé à la contractilité cellulaire permet l'exposition de sites d'interaction FN-FN. (**E**) Les molécules de FN étendues, interagissent entre elles pour former des fibres de FN.

La FNp dimérique permet l'adhérence des plaquettes en conditions statique et de flux **(Ill, Engvall et al. 1984, Savage and Ruggeri 1991, Agbanyo, Sixma et al. 1993, Beumer, MJ et al. 1994, Beumer, Heijnen et al. 1995, Wu, de Groot et al. 1997, McCarty, Zhao et al. 2004)**. Cette adhérence est faible en comparaison au FW et au collagène et s'opère à des taux de cisaillement bas. Le mécanisme mis en jeu fait intervenir les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_V\beta_3$, et $\alpha_5\beta_1$ qui lient le domaine RGD de la FN, et dépend également de la GPIb/FW après adsorption du FW sur la FN (Figure 20) **(Beumer et al., 1994 ; McCarty et al., 2004; Beumer et al., 1995)**. Plus récemment, un rôle de la GPVI dans ce processus a également été montré **(Bultmann, Li et al. 2010)**. D'autres études *in vitro* et *in vivo*, se sont intéressées au rôle de la FNp dans la croissance d'un thrombus. Des travaux utilisant soit du sang reconstitué déplété en FN, soit des souris avec un déficit partiel ou total de FNp, ont montré une réduction de la taille et de la stabilité des thrombi **(Bastida, Escolar et al. 1987, Cho and Mosher 2006, Maurer, Tomasini-Johansson et al. 2010)**. Une hypothèse proposée pour expliquer cet effet, est que la FNp en se liant aux plaquettes activées, forme un polymère réactif qui d'une part, permet de recruter des plaquettes et contribue ainsi à la croissance du thrombus et d'autre part stabilise le thrombus en renforçant le réseau de fibrine **(Hynes, Ali et al. 1978, Cho and Mosher 2006)**. Ces résultats n'ont cependant pas été confirmés dans une étude récente qui montre qu'une souris triple KO pour la FNp, le FG et le FW présente une thrombose augmentée par rapport à une souris déficiente uniquement pour le FG et le FW **(Reheman, Yang et al. 2009)**. En ce qui concerne l'hémostase, la FNp semble jouer un rôle mineur, en effet, des patients présentant une carence en FNp (10 µg/mL *versus* 300 µg/mL) n'ont pas de défaut d'hémostase **(Shirakami, Shigekiyo et al. 1986)**. De même, des souris invalidées de manière conditionnelle pour la FNp, présentent un temps de saignement inchangé **(Sakai, Johnson et al. 2001)**.

L'importance de la FN tissulaire, qui se compose d'un mélange de FNp et FNc sous forme fibrillaire, a été peu explorée. Des premières études ont montré *in vitro* et *ex vivo* que cette FN présente dans un vaisseau isolé ou dans une MEC obtenue par culture de CE pourrait participer à l'adhérence des plaquettes **(Houdijk and Sixma 1985, Houdijk, de Groot et al. 1986, Beumer, Heijnen-Snyder et al. 2000)**. D'autre part, le rôle de l'EDA, qui n'est présent que dans la FNc, a été évalué chez des souris transgéniques, qui n'expriment que de la FN avec cet extradomaine. Ces souris ont des paramètres hémostatiques normaux, et présentent une thrombose artérielle augmentée, suggérant un rôle pro-thrombotique d'EDA **(Chauhan, Kisucka et al. 2008)**.

III.3.1.3. Le facteur Willebrand

Le facteur Willebrand (FW) est une GP multimérique dont le poids moléculaire varie de 500 à 20.000 kDa **(Ruggeri 1997, Ruggeri 2007)**. Il est composé de plusieurs domaines fonctionnels (Figure 22), dont un domaine A1 qui permet son association à la GPIbα et au collagène de type VI, un domaine A3 liant les collagènes I, III et IV, un domaine D3 liant le facteur VIII et un domaine C1 contenant un motif RGD qui interagit avec les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_V\beta_3$ (**Bergmeier and Hynes, 2012**). Il contient également au niveau du domaine A2, un site de clivage pour la métalloprotéase plasmatique ADAMTS13 (A Disintegrin and Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 repeat-13), régulant la taille des multimères **(Ruggeri 1999, Zhang, Halvorsen et al. 2009)**. Le FW est synthétisé par la CE et par le mégacaryocyte. Il se retrouve sous forme de multimères de bas poids moléculaire dans le sous-endothélium et dans le plasma (5-7 μg/mL) et sous forme de multimères de haut poids moléculaire dans les granules α des plaquettes et les corps de Weibel-Palade des CE (**Ruggeri, 1999**).

Dans le sang, les plaquettes n'interagissent pas avec le FW plasmatique car celui-ci possède une conformation globulaire peu favorable à la liaison de la GPIbα. Suite à une lésion vasculaire, le FW circulant s'adsorbe sur des GP retrouvées dans la paroi vasculaire, dont les collagènes **(Savage, Almus-Jacobs et al. 1998)**, la fibrine **(Endenburg, Hantgan et al. 1995)**, les laminines **(Inoue, Suzuki-Inoue et al. 2008)** et la FN (**Beumer et al., 1995**). Le FW immobilisé subit les contraintes de cisaillements du flux sanguin, qui induisent son dépliement et pourrait ainsi exposer le domaine A1 **(Schneider, Nuschele et al. 2007, Di Stasio and De Cristofaro 2010)**. Ce dernier lie la GPIbα et permet le recrutement des plaquettes circulantes **(Savage et al., 1996**). Ce FW, ainsi que le FW plasmatique, se lient également aux intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ activées, ce qui permet l'adhérence stable des plaquettes **(Savage, Saldivar et al. 1996, Kulkarni, Dopheide et al. 2000)**. Le FW régule la coagulation en liant le facteur VIII et le protégeant d'une dégradation protéolytique **(Schulte 2013)**.

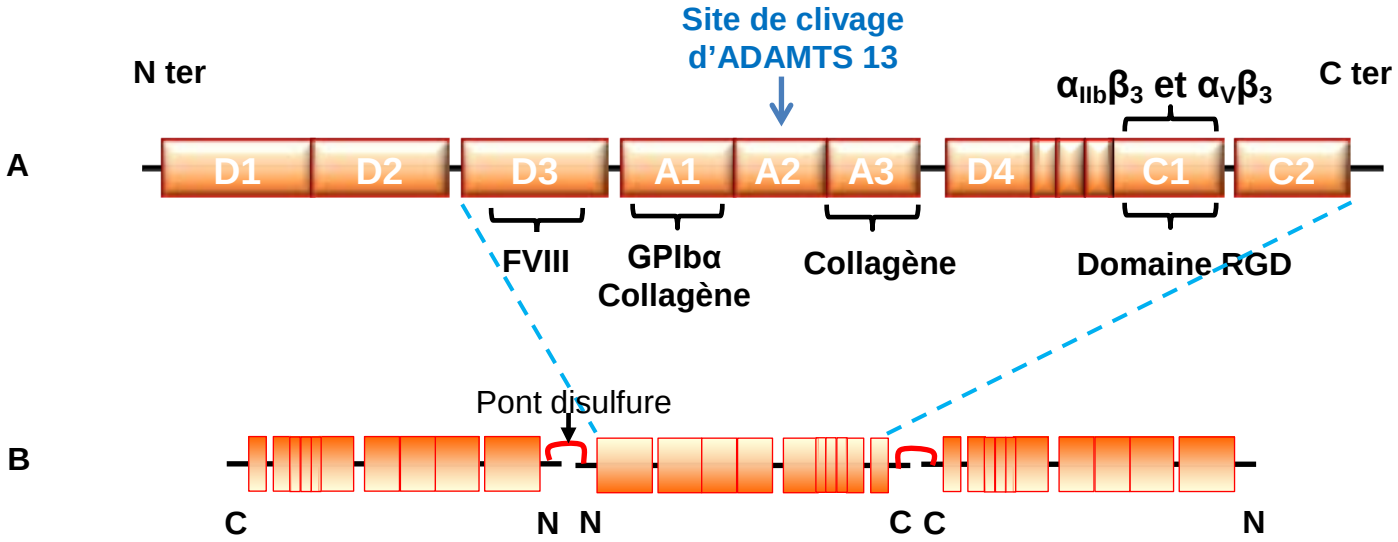


Figure 22 : Schéma : (A) des domaines structuraux et fonctionnels du FW et (B) d'un multimère de FW.

Lors de la biosynthèse et de la maturation du FW, les prodomaines D1 et D2 sont clivés par l'enzyme PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme) (**Bergmeier and Hynes, 2012)**. ADAMTS 13: A Disintegrin and Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 repeat-13.

L'importance du FW en hémostase est illustrée par l'existence de deux pathologies :

i) **La maladie de Willebrand**, qui est le syndrome hémorragique le plus fréquent chez l'homme et qui est dû à un déficit quantitatif ou qualitatif du FW **(Keeney and Cumming 2001)**. Cette pathologie est divisée en trois types :

- la maladie de Willebrand de **type 1** résulte d'un déficit quantitatif partiel du FW circulant (15 à 50% de la concentration d'un sujet sain) **(Sadler 2003)**. Les patients atteints par cette maladie sont pour la plupart asymptomatiques ou présentent uniquement des saignements mineurs des gencives ou du nez.

- la maladie de Willebrand de **type 2** regroupe les anomalies qualitatives du FW :

2A : diminution de l'affinité du FW pour la GPIb avec absence des multimères de haut poids moléculaire.

2B : augmentation de l'affinité du FW pour la GPIb. Le FW se lie aux plaquettes dans le sang, formant des agrégats qui sont éliminés, ce qui entraine une thrombopénie et une disparition des multimères de haut poids moléculaire. Une étude récente suggère qu'un troisième mécanisme pourrait participer aux saignements de ces patients. Il a été montré qu'une mutation de type 2B entraîne un défaut global d'activation plaquettaire **(Casari, Berrou et al. 2013)**.

2N : diminution de l'affinité du FW pour le facteur VIII. Les manifestations hémorragiques sont plus rares que dans les autres maladies de Willebrand de type 2.

2M : diminution de l'affinité du FW pour la GPIb avec présence de multimères de haut poids moléculaire.

La symptomatologie des maladies de Willebrand de type 2 est très proche de celle du type 1, mais certains patients peuvent présenter des hémorragies plus graves notamment digestives et nasales.

- la maladie de Willebrand de **type 3** correspond à un déficit quasi total du FW (<0,02 µg/mL *versus* 5-7 µg/mL), responsable de syndromes hémorragiques sévères **(Eikenboom 2001, James, Lillicrap et al. 2013)**.

ii) **Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)** est une maladie grave liée à un déficit en ADAMTS13, la métalloprotéase qui clive le FW. Ce déficit peut être acquis, résultant de la formation d'anticorps dirigés contre ADAMTS13, ou beaucoup plus rarement, héréditaire résultant de mutations des deux allèles de son gène. Le PTT entraîne des thromboses dans la microcirculation, qui sont responsables d'ischémies de différents organes, tel que le rein ou le cerveau. Cette pathologie se traduit également par des hémorragies cutanéo-muqueuses, qui résultent d'une thrombopénie causée par la consommation de plaquettes lors de la formation des agrégats **(Kremer Hovinga and Lammle 2012)**.

III.3.1.4. Le fibrinogène

Le fibrinogène (FG) est constitué de trois chaînes polypeptidiques, désignées Aα (67 kDa), Bβ (56 kDa) et γ (47 kDa), qui s'assemblent en un homodimère de 340 kDa par des ponts disulfures **(Mosesson 2005)**. Les lettres "A" de Aα et "B" de Bβ désignent respectivement les fibrinopeptides A et B, qui sont clivés par la thrombine lors de la conversion du fibrinogène en fibrine **(Medved and Weisel 2009)** (Figure 23). Chaque monomère de FG comporte trois sites de liaison pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$: deux séquences RGD, situées sur la chaîne Aα et un troisième site, le dodécapeptide qui correspond aux douze acides aminés de l'extrémité C-terminale de la chaîne γ **(Kloczewiak, Timmons et al. 1989, Smith, Ruggeri et al. 1990)**. Le FG est synthétisé et sécrété par les hépatocytes dans le sang où il circule à une concentration de 2 à 4 mg/mL **(Wolberg and Campbell 2008)**. Le FG plasmatique se retrouve également stocké après endocytose dans les granules α des plaquettes et des mégacaryocytes **(Harrison, Wilbourn et al. 1989)** et au niveau de l'intima **(Smith 1995)**.

Le récepteur du FG à la surface des plaquettes est l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Le FG soluble n'interagit avec son récepteur que lorsque ce dernier est activé. Le FG forme alors des ponts entre les plaquettes permettant leur agrégation. Lorsque le FG est immobilisé sur une surface, il subit un changement conformationnel permettant à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ de le reconnaitre **(Savage, Saldivar et al. 1996, Sivaraman and Latour 2010)**. L'adhérence des plaquettes sur le FG immobilisé est faible et limitée à des taux de cisaillement peu élevés **(Savage, Saldivar et al. 1996, Zaidi, McIntire et al. 1996)**. Le FG constitue également le principal substrat de la thrombine, dont l'action protéolytique permet la formation de fibrine, qui s'assemble en un réseau stabilisant l'agrégat plaquettaire **(Wolberg and Campbell, 2008)**.

Le rôle du FG en hémostase est illustré par l'afibrinogénémie, une pathologie résultant d'une absence totale de fibrinogène **(Acharya and Dimichele 2008)**. Les patients afibrigénomiques, dont le premier cas a été décrit en 1920, souffrent de syndromes hémorragiques sévères et sont sujets à des phénomènes d'emboles **(Rabe and Salomon 1920)**.

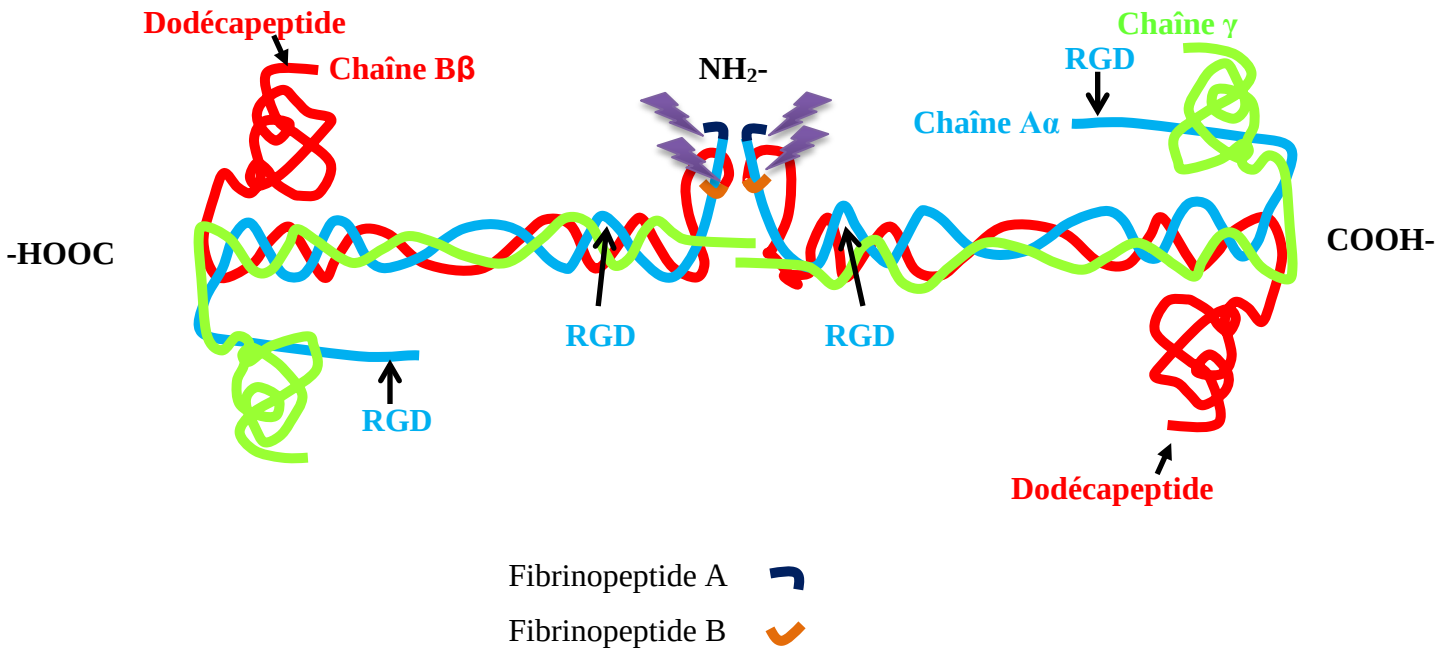


Figure 23 : Schématisation de la molécule de fibrinogène montrant les fibrinopeptides A et B (d'après **(Herrick, Blanc-Brude et al. 1999)).**

: site de clivage par la thrombine.

III.3.1.5. Les Laminines

Identifiées pour la première fois en 1979 dans les sarcomes murins d'Engelbreth-Holm-Swarm **(Timpl, Rohde et al. 1979)**, les laminines (LM) sont des GP hétérodimériques d'environ 800 kDa, constituées de l'association de chaînes α, β et γ (Figure 24) **(Hallmann, Horn et al. 2005)**. Cinq chaînes α, quatre β et trois γ, codées par des gènes distincts, s'assemblent pour former 18 isoformes différentes, nommées d'après la composition de leurs chaînes **(Aumailley, Bruckner-Tuderman et al. 2005)**; par exemple l'association des chaînes α5, β1 et γ1, forment la LM-511. Au niveau vasculaire quatre isoformes majeures ont été décrites : les LM-411, 421, 511 et 521. Elles sont synthétisées par les CE, les CML et les fibroblastes et se localisent au niveau des membranes basales des CE et des CML.

Les laminines jouent un rôle central dans la formation, l'architecture et la stabilité des membranes basales **(Aumailley and Smyth 1998)**. Elles modulent également l'adhérence, la prolifération, la migration et la différenciation de différents types cellulaires, dont les cellules épithéliales et endothéliales **(Schnaper, Kleinman et al. 1993, Aumailley and Smyth 1998, Hallmann, Horn et al. 2005)**. Leur importance est illustrée par l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle, qui découle d'une mutation des gènes codant pour les chaînes α3, β3 et γ2 et résulte notamment d'un défaut d'adhérence des kératinocytes **(McGowan and Marinkovich 2000)**. Les malades présentent une fragilité au niveau de la peau se traduisant par l'apparition de bulles ou de vésicules épidermiques qui se forment soit spontanément, soit à la suite de traumatismes minimes. La formation de ces bulles et leur éclatement sont cause de douleur, de plaies ouvertes et d'infections.

Plusieurs études ont montré que les plaquettes adhèrent sur une matrice de LM, en conditions statique et de flux **(Ill, Engvall et al. 1984, Polanowska-Grabowska, Simon et al. 1999, Inoue, Suzuki-Inoue et al. 2006)**. Une limite de ces études vient de l'utilisation d'isoformes non vasculaires de LM, comme la LM111 **(Virtanen, Gullberg et al. 2000, Hallmann, Horn et al. 2005)**. Plus récemment, il a été montré que des isoformes vasculaires de LM, dont les LM-411 et 511 assurent l'adhérence des plaquettes en conditions statique et de flux **(Geberhiwot, Assefa et al. 2001, Nigatu, Sime et al. 2006, Schaff, Tang et al. 2013)**. Cette adhérence repose sur l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ et la GPIbα qui lie le FW adsorbé sur les LM. Les plaquettes adhérentes sur LM s'activent et changent de forme. Cette activation implique l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ et la GPVI **(Inoue et al., 2008; Schaff et al., 2013)**. L'importance des LM en hémostase et thrombose reste à découvrir.

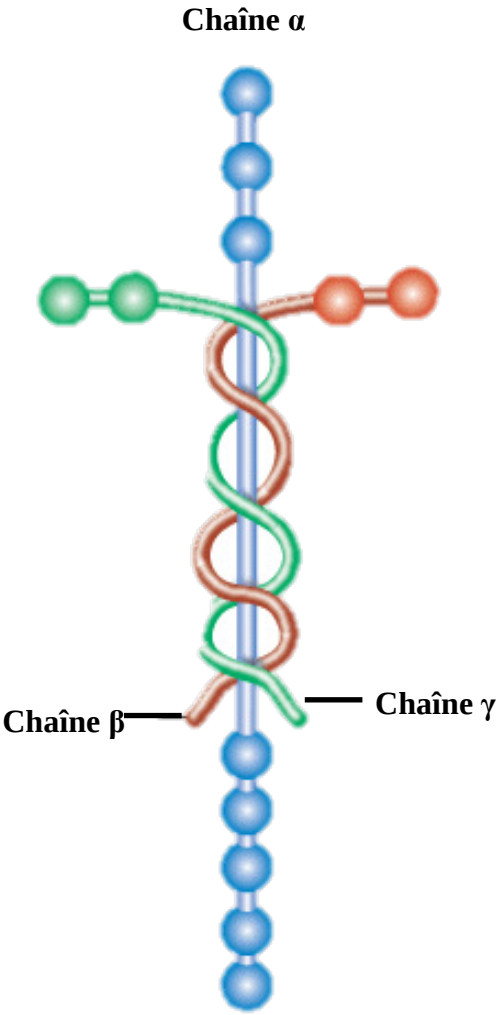


Figure 24 : Représentation schématique des trois chaînes d'une molécule de laminine. Adapté de **(Aumailley and Smyth, 1998).**

III.3.1.6. Les fibres élastiques

Les fibres élastiques sont constituées d'un cœur insoluble et amorphe de polymères d'élastine, qui est entouré par des microfibrilles composées de glycoprotéines comme les fibrillines **(Rosenbloom, Abrams et al. 1993)**. Dans les artères, les fibres élastiques sont majoritairement produites par les CML et s'organisent en deux feuillets épais, localisés de part et d'autre de la média, constituant les limitantes élastiques interne et externe (Figure 25 A). En plus de ces deux limitantes, on retrouve des couches de fibres élastiques dans la média des artères dites élastiques, telles que l'aorte. Les fibres élastiques sont facilement identifiables en histologie sur une coupe transversale, par leur aspect caractéristique en « tôle ondulée » (Figure 25 B) **(Kühnel 2003)**.

La fonction principale de ces fibres est de conférer une élasticité aux tissus, permettant d'assurer l'amortissement de la pulsatilité cardiaque. Diverses maladies génétiques affectent la structure, la distribution et l'abondance des fibres élastiques. Chez l'homme, l'hémizygotie du gène de l'élastine est responsable de l'atteinte vasculaire du syndrome de Williams-Beuren, qui se caractérise par la présence d'une sténose supravalvulaire aortique **(Pober 2010)**. Une autre pathologie, le syndrome de Marfan, caractérisé par une désorganisation des fibres élastiques due à des mutations affectant la fibrilline 1, augmente le risque d'anévrisme aortique **(Bolar, Van Laer et al. 2012)**.

En plus de son rôle dans la compliance artérielle, il a également été montré qu'une surface recouverte de fibrilline purifiée permet l'adhérence des plaquettes en condition de flux faibles, suggérant un rôle de cette protéine en hémostase **(Ross, McIntire et al. 1998)**.

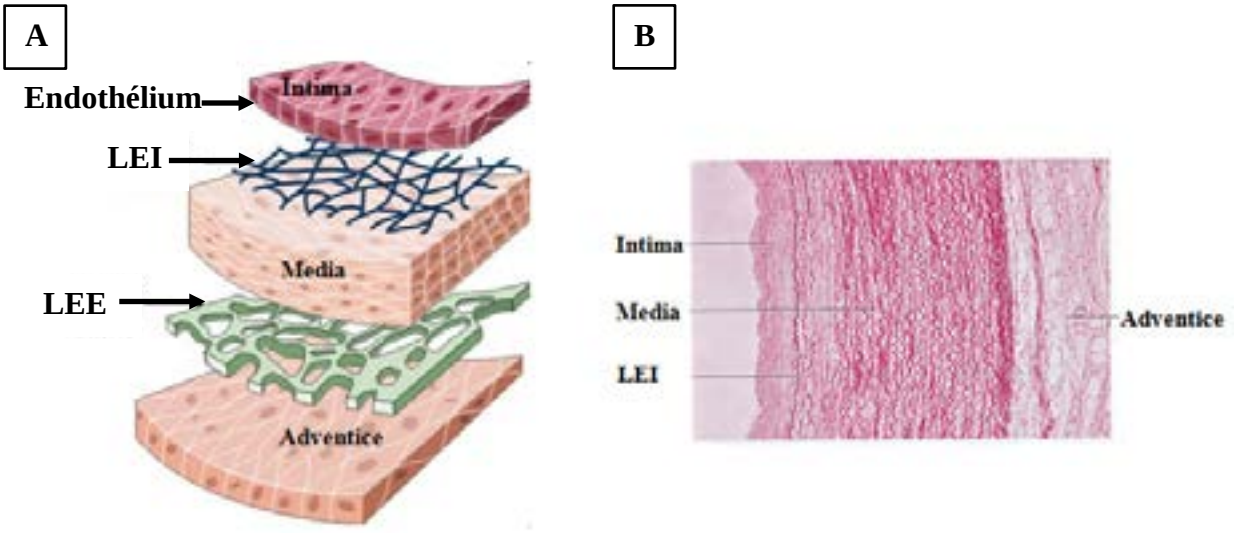
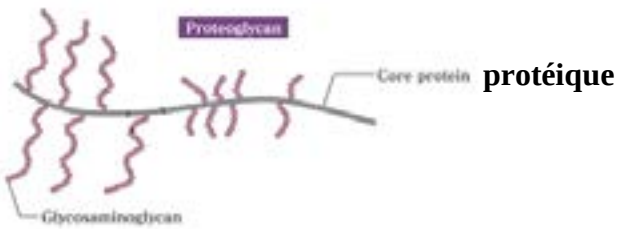


Figure 25 : A. Représentation des différentes couches de la paroi artérielle. LEI : limitante élastique interne; LEE : limitante élastique externe. **B. Coupe transversale d'une aorte thoracique humaine montrant l'aspect caractéristique « en tôle ondulée**» des fibres élastiques de la LEI et de la média présentent dans les artères élastiques (d'après **Kühnel, 2003**). Image de microscopie optique obtenue après coloration à l'hématoxyline-éosine.

III.3.2. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PG) sont composés d'une chaîne protéique portant un à plusieurs glycosaminoglycanes (GAG) (Figure 26) (**Prydz and Dalen 2000**). Les GAG sont de longs polymères linéaires constitués de la répétition d'un motif disaccharidique, qui porte des groupements carboxylates et/ou sulfates, conférant une forte charge négative **(Prydz and Dalen 2000)**. Les PG sont classés d'après la nature du GAG prédominant, qui peut être le chondroïtine-sulfate (exemple de PG : aggrécane, versicane, biglycane), le dermatane-sulfate (agrine, perlécane), l'héparane-sulfate (décorine) ou le kératane-sulfate (mimécane, fibromoduline) **(Toussaint et al., 2003)**. Les PG sont sécrétés par les CE, les CML et les fibroblastes et sont retrouvés dans toutes les tuniques de l'artère.

En raison de leurs fortes charges négatives, les PG fixent des molécules d'eau. L'hydratation qu'ils confèrent à la MEC joue un rôle structural essentiel et donne la capacité aux artères de supporter des variations importantes de pression **(Prydz and Dalen 2000)**. D'autre part, les PG permettent l'adhérence, la prolifération et la migration de différents types cellulaires dont les CE et les fibroblastes **(Wight, Kinsella et al. 1992, Moon, Matsumoto et al. 2005, Ferdous, Peterson et al. 2010)**. L'importance des PG est illustrée par la dysplasie disegmentaire de type Silverman-Handmaker, qui découle d'une mutation du gène codant pour le perlécane. Cette mutation est létale dès les premiers jours de vie résultant notamment d'un défaut de développement du cartilage au niveau de la colonne vertébrale **(Arikawa-Hirasawa, Wilcox et al. 2001)**. De plus, les PG, dont le perlécane participent à la mise en place des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer, qui en se développant finissent par faire dégénérer et mourir les neurones **(Ariga, Miyatake et al. 2010)**. Les PG participent également à la régulation du processus d'hémostase. Certains PG, comme l'héparane-sulfate modulent la coagulation en inhibant la thrombine **(Boneu and Cazenave, 1997)**, alors que d'autres, comme le versicane et la décorine assurent l'adhérence plaquettaire **(Guidetti, Bertoni et al. 2002, Mazzucato, Cozzi et al. 2002)**.



protéique

Figure 26: Représentation schématique d'un protéoglycane.

IV. La thrombose artérielle

IV.1. La physiopathologie

La thrombose artérielle correspond au développement d'un thrombus composé principalement de plaquettes et de fibrine dans une artère malade **(Jackson 2011)**. Elle représente la complication majeure de l'athérosclérose, qui est une maladie dégénérative de la paroi des artères de gros et moyen calibre, caractérisée par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux (Figure 27) **(Libby, Ridker et al. 2011)**. La croissance d'une lésion athéromateuse diminue progressivement la lumière vasculaire, menant à une sténose, qui modifie les conditions rhéologiques locales **(Nesbitt, Mangin et al. 2006)**. L'érosion ou la rupture de la plaque d'athérosclérose mène à l'exposition d'un matériel thrombogène, au contact duquel les plaquettes adhèrent, s'activent et agrègent pour former un thrombus **(Jackson 2011)**. Ce dernier peut conduire à l'occlusion d'une artère soit au site de formation, soit après fragmentation du thrombus en emboles, dans une artère de plus petit calibre située en aval. Ceci entraine des complications ischémiques graves comme les syndromes coronariens aigus (SCA), les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou l'ischémie des membres inférieurs **(Jackson 2011)**. La thrombose artérielle représente la première cause de mortalité dans le monde **(OMS 2011)**.

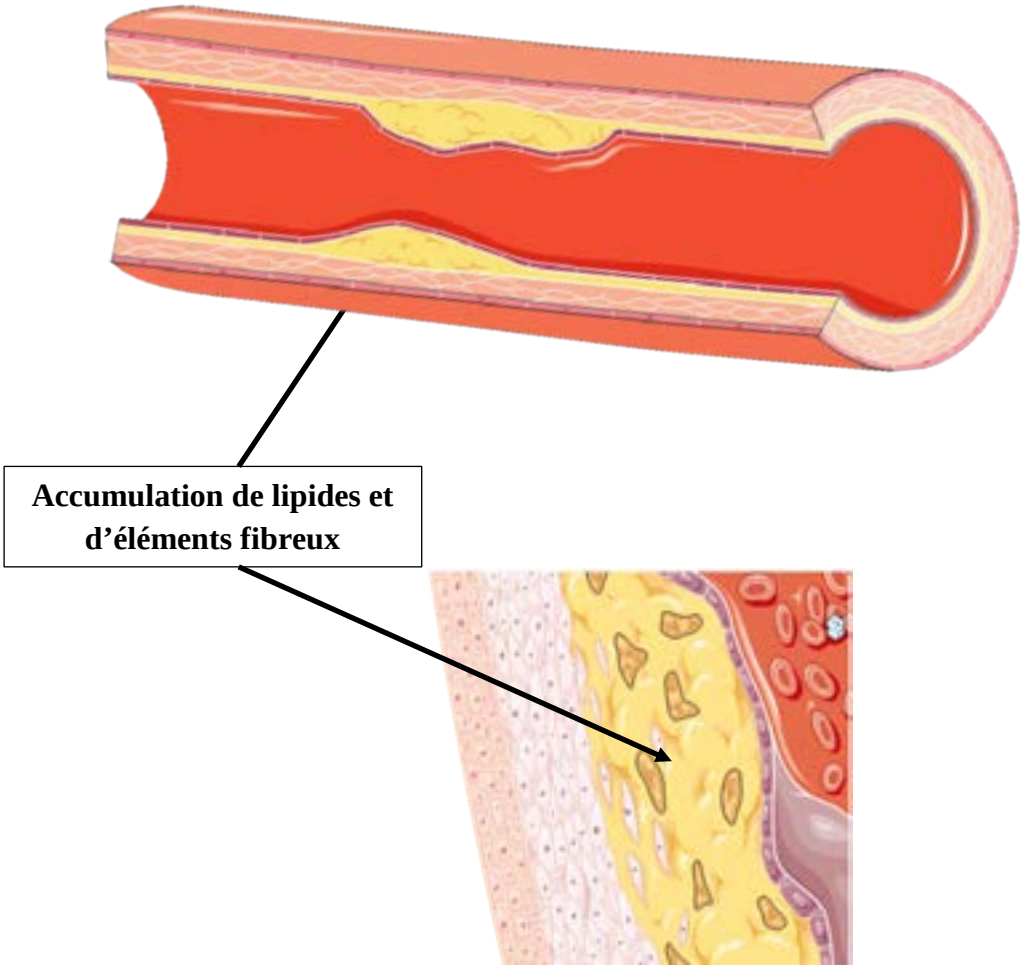


Figure 27 : Représentation schématique d'une artère sténosée par une plaque d'athérosclérose.

IV.2. Les traitements et préventions de la thrombose artérielle

Le traitement et la prévention de la thrombose artérielle met en jeu des approches chirurgicales invasives combinées à des approches médicamenteuses.

IV.2.1. Approches chirurgicales

Les approches chirurgicales ont pour but de rétablir une circulation du sang normale soit en court-circuitant la zone obturée, comme lors d'un pontage, soit en rétablissant une lumière vasculaire normale, par angioplastie, endarterectomie ou embolectomie (Figure 28) **(Attias, Besse et al. 2013)**. Ces différentes approches sont utilisées en fonction de la sévérité et de la localisation de la lésion.

Le pontage permet de contourner la région sténosée en reliant l'artère saine en amont de l'oblitération avec celle en aval, afin d'irriguer les tissus privés d'oxygène. Cette procédure est fréquemment employée pour les obstructions des artères coronaires, illiaques et fémorales **(Attias, Besse et al. 2013)**.

L'angioplastie endoluminale permet de dilater une artère sténosée. Elle peut être soit programmée après détection d'une sténose artérielle significative, soit accomplie en urgence en cas de signes aigus d'obstruction d'une artère, tel qu'un syndrome coronarien aigu (SCA). Cette intervention consiste à pratiquer une petite incision au niveau du bras ou de l'aine, permettant d'introduire un ballonnet dans une artère. Le ballonnet est conduit à l'aide d'une tige guidée au niveau de la zone sténosée, puis gonflé pour comprimer la plaque et rétablir l'écoulement du sang. L'angioplastie est généralement associée à la mise en place d'une endoprothèse métallique comparable à un ressort, nommée « stent », qui maintient l'artère ouverte. Cette technique est notamment employée pour le traitement des artères coronaires, carotides, iliaques ou fémorales **(Attias, Besse et al. 2013)**.

L'endartériectomie est l'ablation des plaques d'athérosclérose présentes dans les couches internes d'une artère malade. Il s'agit de la méthode de référence pour traiter la sténose carotidienne **(Attias, Besse et al. 2013)**.

L'embolectomie selon la méthode de Fogarty est un procédé visant à extraire un thrombus obstruant une artère. Cette technique consiste à introduire un ballonnet en amont de la zone artérielle occluse, puis à le retirer après gonflement pour retirer le thrombus. Cette technique est généralement utilisée pour les emboles obstruant l'artère d'un membre **(Attias, Besse et al. 2013)**.

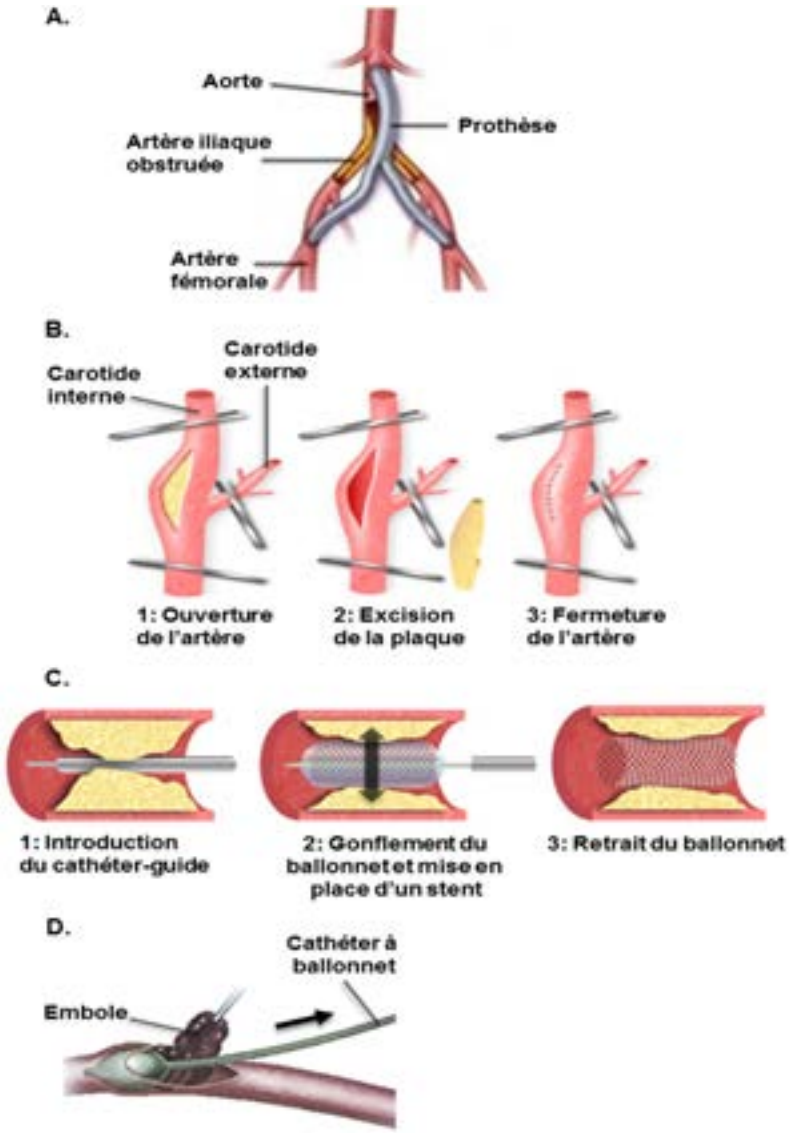


Figure 28 : Les principales approches chirurgicales de revascularisation.

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 **Attias, Besse et al. 2013**).

IV.2.2. Approches médicamenteuses

Le traitement et la prévention des thromboses artérielles font essentiellement appel aux médicaments antiplaquettaires. Ceux-ci peuvent être associés à des anticoagulants, tels que l'héparine ou les inhibiteurs de la thrombine ou du facteur Xa **(Alquwaizani, Buckley et al. 2013)**.

IV.2.2.1. Les antiplaquettaires

Les antiplaquettaires ciblent, soit l'activation plaquettaire en inhibant la cyclo-oxygénase (COX), le récepteur $P2Y_{12}$ de l'ADP ou les phosphodiestérases (PDE des nucléotides cycliques), soit l'agrégation plaquettaire en bloquant directement l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Figure 29) **(Yeung and Holinstat 2012)**.

IV.2.2.1.1. L'aspirine

L'aspirine est une pro-drogue, qui est hydrolysée en acide salicylique par des estérases au niveau des voies digestives (foie et muqueuse gastro-intestinale) et du plasma. L'acide salicylique acétyle de manière irréversible un groupement sérine de la COX-1 des plaquettes, empêchant la synthèse de TxA_2, un puissant activateur des plaquettes **(Roth, Stanford et al. 1975, Patrono and Rocca 2012)**. L'effet inhibiteur de l'aspirine persiste durant toute la durée de vie des plaquettes. L'étude ISIS-2 a montré que l'aspirine diminue de 20% la mortalité des personnes atteintes de SCA à 5 semaines **(ISIS-2 1988)**. En prévention secondaire, des méta-analyses réalisées par l'Antithrombotic Trialists' Collaboration (ATC), indiquent que l'aspirine diminue le risque d'accident cardiovasculaire de 26% durant la première année, avec une baisse de récidives de SCA de 34% et d'AVC de 22% **(Antithrombotic Trialists 2002, Baigent, Blackwell et al. 2009, Barash and Akhtar 2010)**. En prévention primaire, l'aspirine n'est indiquée que lorsque le risque d'accident cardiovasculaire est élevé et son utilisation reste controversée en raison d'une augmentation du risque de saignement **(Campbell, Smyth et al. 2007, De Berardis, Lucisano et al. 2012)**. En effet, la prise d'aspirine augmente les risques de saignements, en particulier, les hémorragies gastro-intestinales **(Isles, Norrie et al. 1999)**. Un autre effet secondaire est le risque allergique, qui peut se manifester par de l'urticaire, de l'asthme, des réactions anaphylactiques et des œdèmes

de Quincke **(Berkes 2003, Inomata 2012)**. L'aspirine est actuellement administrée à des doses comprises entre 50 et 150 mg/jour, car des doses supérieures de 325 mg/jour n'améliorent pas la protection d'accidents ischémiques, mais augmentent les risques de saignements gastro-intestinaux **(Campbell, Smyth et al. 2007)**.

IV.2.2.1.2. Les antagonistes du récepteur $P2Y_{12}$

Les antagonistes du récepteur $P2Y_{12}$ inhibent l'amplification de l'activation et de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP **(Gachet 2012)**. Ils regroupent des thiénopyridines et des agents développés plus récemment comme le ticagrelor et le cangrelor **(Yeung and Holinstat 2012)**.

Les thiénopyridines comprennent trois pro-drogues, la ticlopidine, le clopidogrel et le prasugrel, qui sont métabolisées par des enzymes hépatiques telles que les cytochromes P450 et des estérases, en métabolites capables d'inhiber irréversiblement le récepteur $P2Y_{12}$ **(Yeung and Holinstat 2012)**.

La ticlopidine (Ticlid®) constitue la première génération des thiénopyridines et présente une efficacité supérieure de 8% par rapport à l'aspirine dans la prévention des infarctus du myocarde, des AVC et de la mortalité à un an d'après l'étude ATC de 1994 **(ATC 1994)**. Elle n'est quasiment plus employée en raison des nombreux effets secondaires associés à son utilisation dont la neutropénie **(Quinn and Fitzgerald 1999, Yeung and Holinstat 2012)**.

Le clopidogrel (Plavix®) est une thiénopyridine d'utilisation courante. C'est un anti-thrombotique puissant et efficace, dont le bénéfice a été démontré dans plusieurs études cliniques dont CAPRIE **(CAPRIE 1996)**. Cette étude montre que le clopidogrel réduit le risque d'évènements ischémiques de 8,7% par rapport à l'aspirine chez des patients ayant eu des antécédents de chirurgie cardiaque **(CAPRIE 1996)**. Actuellement, la combinaison du clopidogrel et de l'aspirine constitue le traitement de référence pour les SCA et les angioplasties avec pose de stent **(Terpening 2009)**. L'étude CHARISMA a montré que cette combinaison est plus efficace en prévention secondaire que l'aspirine ou le clopidogrel seul sur 28 mois, avec notamment une diminution accrue par rapport à une monothérapie de 7% des risques cardiovasculaires, de 6% des infarctus du myocarde et de 21% les AVC **(Bhatt, Fox et al. 2006)**. Il existe une hétérogénéité de réponse au clopidogrel, qui procure un niveau de protection insuffisant chez 20 à 30 % des patients **(Sofi, Marcucci et al. 2010)**. Ceci

pourrait être lié à sa faible métabolisation, car seul 15% du clopidogrel administré est transformé en métabolite actif **(Ancrenaz, Daali et al. 2010)**. Le clopidogrel augmente les risques de saignements intracrâniens et gastro-intestinaux **(CAPRIE 1996)**. De ce fait, il est administré à des doses inhibant 50% de l'agrégation plaquettaire à l'ADP, afin de minimiser ces risques hémorragiques **(Gachet 2006, Yeung and Holinstat 2012)**.

Le prasugrel (Efient®) est une nouvelle thiénopyridine qui présente des propriétés pharmacologiques similaires au clopidogrel mais s'en distingue par sa métabolisation plus rapide **(Gachet 2012)**. Elle possède une plus faible incidence de non-répondeurs que le clopidogrel, avec seulement 3% en comparaison de 25% pour le clopidogrel **(Wiviott, Braunwald et al. 2007, Wiviott, Antman et al. 2010)**. Ceci se fait au détriment d'un risque hémorragique plus important de 33% en comparaison à celui du clopidogrel **(Wiviott, Braunwald et al. 2007)**.

En plus des thiénopyridines d'autres agents dirigés contre le $P2Y_{12}$ ont récemment été développés **(Yousuf and Bhatt 2011)**. Le ticagrelor, actuellement sur le marché américain et prochaînement en Europe, est un antagoniste réversible direct du $P2Y_{12}$. D'après l'étude PLATO, il réduit de manière plus importante le risque de décès et d'infarctus après un SCA et le risque de thrombose sur stent que le clopidogrel **(Cannon, Harrington et al. 2010)**. Cette plus grande efficacité résulterait d'une deuxième propriété, l'inhibition de la recapture de l'adénosine par les globules rouges, qui en retour stimule les récepteurs purinergiques de type A, $P1A_{2A}$ et $P1A_{2B}$ des plaquettes **(Cattaneo and Faioni 2012)**. Son utilisation engendre comme effets secondaires, des dyspnées, selon un mécanisme encore mal compris, mais qui semble lié à l'augmentation de la concentration d'adénosine **(Cattaneo and Faioni 2012)**. L'elinogrel est un antagoniste réversible direct du récepteur $P2Y_{12}$, administrable par voie orale et intraveineuse. L'étude Innovative-PCI suggère que l'elinogrel bloque le $P2Y_{12}$ plus rapidement et plus efficacement que le clopidogrel sans augmenter le risque de saignement de patients subissant une intervention percutanée coronarienne **(Leonardi, Rao et al. 2010, Welsh, Rao et al. 2012, Patel, Lane et al. 2013)**. Le cangrelor (AR-C69931 MX) est un analogue de l'ADP et un antagoniste réversible direct du $P2Y_{12}$. Plusieurs études de phase III n'ont pas pu établir sa supériorité par rapport au clopidogrel dans les interventions coronariennes percutanées **(Bhatt, Lincoff et al. 2009, Harrington, Stone et al. 2009, Yeung and Holinstat 2012, Patel, Lane et al. 2013)**.

IV.2.2.1.3. Les inhibiteurs des Phosphodiestérases

Les inhibiteurs des PDE plaquettaires, tels que le cilostazol ou le dypirimadole, diminuent la dégradation de l'AMPc et du GMPc, menant à un effet antiagrégant et vasodilatateur. D'après l'étude European Stroke Prevention, la combinaison de l'aspirine et du dipyridamole est deux fois plus efficace que chacun des médicaments administré seul **(Sivenius, Cunha et al. 1999)**. Le cilostazol est actuellement utilisé pour améliorer la distance de marche maximale et sans douleur chez les patients présentant une claudication intermittente liée à une ischémie des membres inférieurs (**Gurbel and Tantry 2010)**. Alors que l'étude DECLARE-LONG II a montré que le cilostazol associé à l'aspirine et au clopidogrel, diminue le taux de mortalité et d'infarctus du myocarde de 12% à 7,2% sur un an, en comparaison de la combinaison aspirine/clopidogrel **(Biondi-Zoccai, Lotrionte et al. 2008, Gurbel and Tantry 2010, Lee, Park et al. 2011)**, d'autres études comme CILON-T, n'observent pas d'effet bénéfique du cilostazol **(Suh, Lee et al. 2011)**. La combinaison aspirine et dipyridamole est utilisée en prévention secondaire chez des patients ayant souffert d'un AVC, mais son efficacité n'a pas été démontrée pour les autres pathologies vasculaires **(Hirsh, Guyatt et al. 2008, Gurbel and Tantry 2010)**. Pour l'ensemble de ces raisons, les inhibiteurs de PDE restent peu utilisés.

IV.2.2.1.4. Les antagonistes d'$\alpha_{IIb}\beta_3$

Les antagonistes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ bloquent l'agrégation des plaquettes en empêchant leur interaction avec le fibrinogène. Les 3 agents anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$ utilisés en clinique sont, l'abciximab (ReoPro®), l'eptifibatide (Integrilin®) et le tirofiban (Agrastat®). L'abciximab est dérivé d'un fragment Fab d'un anticorps monoclonal murin humanisé (c7E3) **(Coller 1995)**. L'eptifibatide est un heptapeptide dérivé d'un venin de serpent contenant une séquence KGD (lysine-glycine-acide aspartique) qui reconnait spécifiquement $\alpha_{IIb}\beta_3$ **(Scarborough, Rose et al. 1991, Yeung and Holinstat 2012)**. Le tirofiban est une molécule non peptidique dérivée de la tyrosine **(Peerlinck, De Lepeleire et al. 1993)**. Une méta-analyse de 2002, indique que les antagonistes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ réduisent le taux de mortalité et la survenue d'infarctus du myocarde à 30 jours de 9% en comparaison à l'héparine **(Boersma, Harrington et al. 2002, Meadows and Bhatt 2007)**. Les anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$ sont des anti-thrombotiques efficaces, qui sont réservés à l'usage hospitalier dans la prise en charge des

SCA (abciximab; eptifibatide; tirofiban) et des patients subissant une intervention coronarienne percutanée (abciximab) **(VIDAL 2013)**. La limite principale des antagonistes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est le risque de saignement élevé **(Winchester, Wen et al. 2011)**. Aujourd'hui, les anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$ sont fréquemment remplacés par la combinaison aspirine/clopidogrel dans le traitement des SCA.

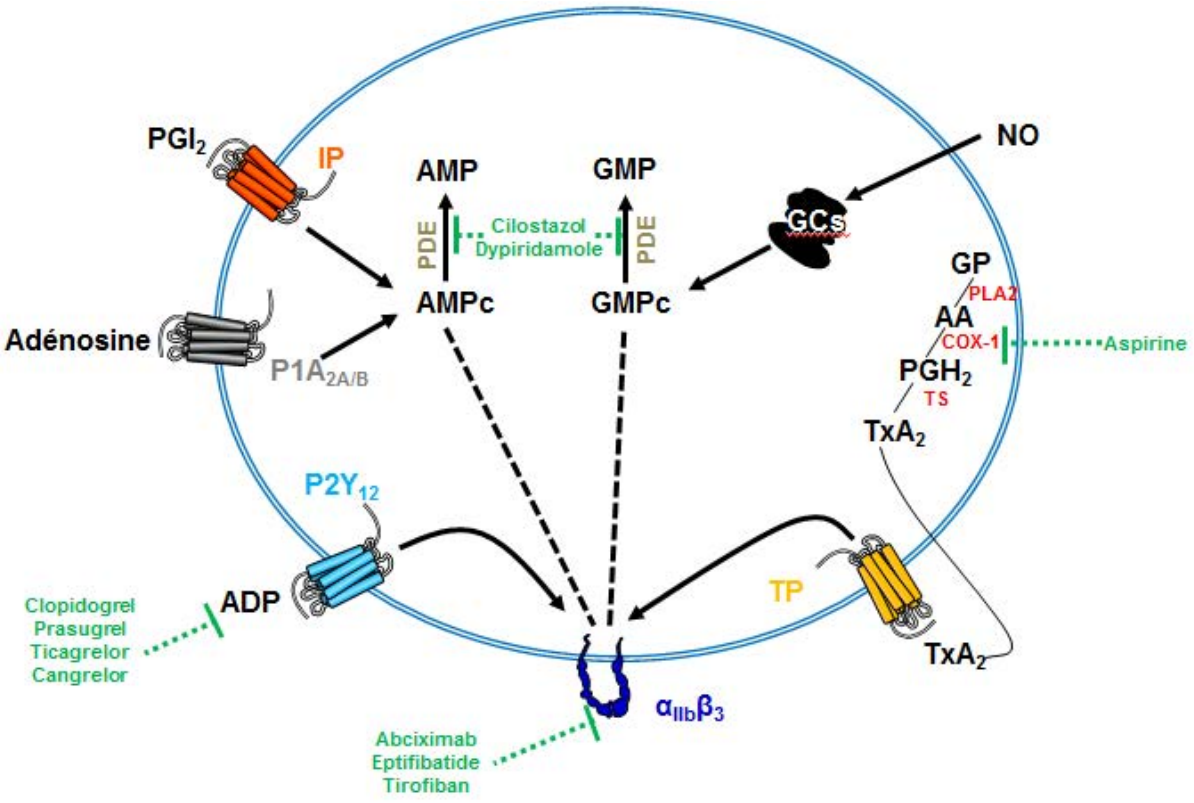
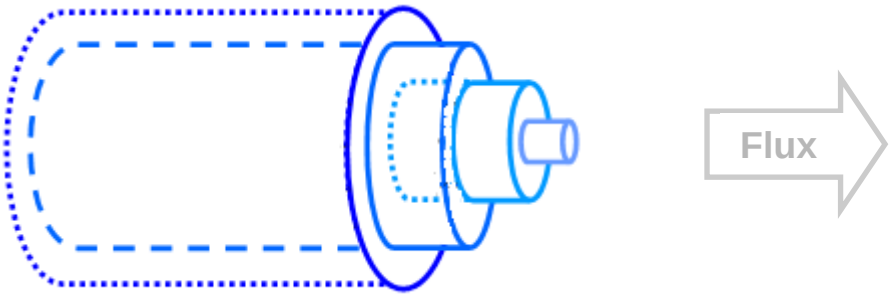
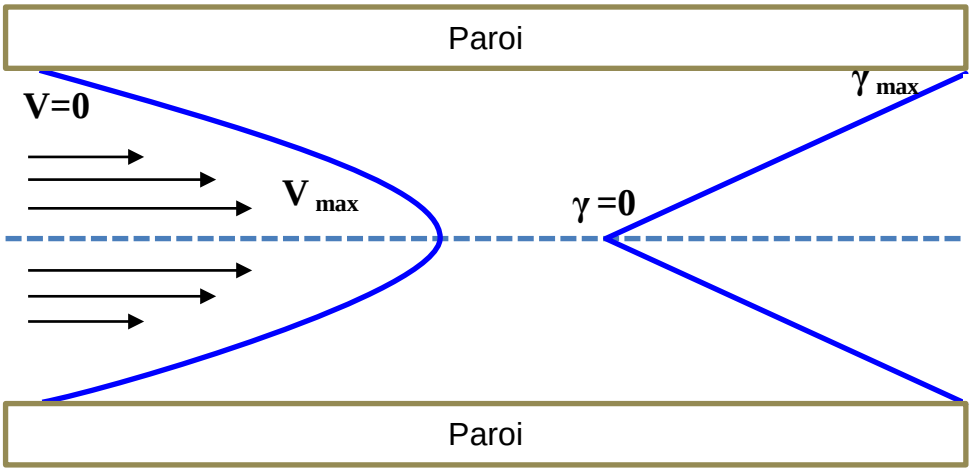


Figure 29 : Les différents agents antiplaquettaires utilisés en clinique.

AA : acide arachidonique ; AMP : adénosine 5'-monophosphate ; AMPc : adénosine 3′,5′-monophosphate cyclique ; COX-1 : cyclo-oxygénase1 ; GCs : guanylate cyclase soluble ; GMP : guanosine 5'-monophosphate ; GMPc guanosine 3′,5′-monophosphate cyclique ; GPL : glycérophospholipides ; IP : récepteur de la prostacycline ; NO : monoxyde d'azote; PDE : phosphodiestérases ; PGH_2 : prostaglandine H2; PGI_2 : prostacycline ; PLA2 : phospholipase A2 ; TP : récepteur du thromboxane ; TS : thromboxane synthase.





Vitesse V

V = 0 à la paroi du vaisseau

Taux de cisaillement γ

γ = 0 au centre du vaisseau

Figure 30 : Modélisation de l'écoulement d'un fluide newtonien dans un cylindre.

V. Flux sanguin et fonctions plaquettaires

Les conditions hémorhéologiques dépendent principalement de la viscosité du sang, de son débit et de la géométrie du vaisseau. Elles ont été décrites dès 1852 par le médecin berlinois Rudolf Virchow, pour jouer un rôle important dans la thrombose. Depuis, de nombreuses études ont montré que le flux sanguin module l'adhérence, l'activation et l'agrégation plaquettaire **(Nesbitt, Mangin et al. 2006, Nesbitt, Westein et al. 2009)**.

V.1. Notions de rhéologie

La rhéologie est un terme inventé par Eugène Cook Bingham en 1929, venant du grec rheo (couler) et logos (étude) et qui correspond à l'étude de l'écoulement et de la déformation de la matière sous l'effet d'une force **(Janmey and Schliwa 2008)**. Les fluides ont une viscosité propre, qui est responsable de la résistance à l'écoulement. Les fluides sont classés en « newtoniens », qui sont caractérisés par une viscosité constante ne variant pas en fonction de la vitesse d'écoulement, et « non-newtoniens », pour lesquels la viscosité change en fonction des forces appliquées. Selon les lois établies par Jean-Léonard-Marie Poiseuille, l'écoulement d'un fluide newtonien dans un cylindre circulaire peut être modélisé comme une infinité de couches coaxiales (l'axe de symétrie des couches est identique à celui du cylindre), se déplaçant dans un même sens (Figure 30) (**Goldsmith and Turitto 1986**). En raison de sa viscosité, qui est responsable de frictions entre les différentes couches de fluides adjacentes et également entre le fluide et la paroi, un fluide newtonien présente un profil de vitesse parabolique, avec une vitesse d'écoulement maximale au centre et une vitesse théorique nulle à la paroi. L'écoulement d'un fluide est caractérisé par deux paramètres :

i) le taux de cisaillement, qui représente le gradient de vitesse relatif entre deux couches de fluide adjacents ou entre une couche de fluide et la paroi. Il est inversement proportionnel à la vitesse et est estimé à partir de la formule :

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

Q = débit (m^3/s)

r = distance par rapport au centre (m)

R = rayon du cylindre (m)

ii) La contrainte de cisaillement, qui représente la force par unité de surface exercée entre deux couches de fluides adjacentes ou entre une couche de fluide et la paroi. Sa valeur correspond au produit du taux de cisaillement par la viscosité :

$\tau(r) = \eta\, \dot{\gamma}\, r)$	$\tau(r)$ = contrainte de cisaillement (dyne/cm²)
	η = viscosité du liquide (Poiseuille)
	$\dot{\gamma}(r)$ = taux de cisaillement (s^{-1})

Les fluides non newtoniens sont subdivisés en plusieurs groupes, dont i) les rhéofluidifiants, comme par exemple l'encre ou la peinture, qui présentent une viscosité diminuant lorsque le taux de cisaillement augmente et ii) les rhéoépaississants, tel que par exemple la Maïzena, qui voient leur viscosité augmenter avec le taux de cisaillement.

V.1.1. La rhéologie du sang

V.1.1.1. Le sang, un fluide rhéofluidifiant

Le sang est un fluide rhéofluidifiant, une propriété résultant principalement de la présence de globules rouges (GR), qui représentent environ 45% du volume sanguin total. Lorsque le taux de cisaillement est bas, les GR ont tendance à s'agréger formant des « rouleaux » qui peuvent également interagir entre eux. Ce phénomène transitoire et réversible a pour conséquence d'augmenter la viscosité du sang. En revanche, lorsque le taux de cisaillement augmente, comme dans les artérioles et dans la microcirculation, les « rouleaux » se désagrègent et les GR s'alignent dans le sens de la circulation de manière aléatoire, diminuant ainsi la viscosité (Figure 31). **(Murata and Secomb 1988, Skalak and Zhu 1990, Fedosov, Pan et al. 2011)**. D'autre part, les GR sont capables de se déformer en réponse aux contraintes de cisaillement qui s'appliquent à leur surface, ce qui facilite leur circulation au travers des capillaires et des artérioles de petit diamètre **(Skalak and Branemark 1969)**.

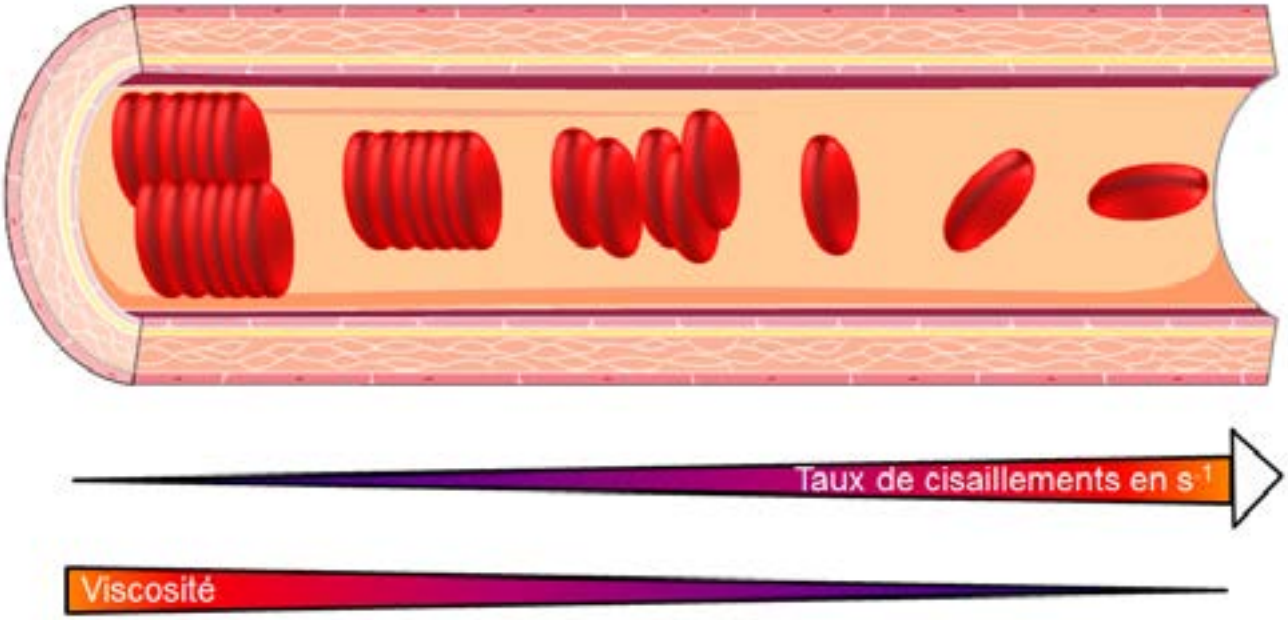


Figure 31 : Schématisation du comportement des globules rouges (GR).

Les rouleaux de GR se forment à des taux de cisaillement bas. Ils se désagrègent au fur et à mesure que le taux de cisaillement augmente, menant à une circulation de GR individuels.

V.1.1.2. Le sang est considéré comme un fluide newtonien au niveau de la paroi artérielle

Les éléments de taille importante présents dans un fluide ont tendance à migrer vers le centre du flux, où l'on retrouve les contraintes de cisaillement les plus basses. Ce phénomène est augmenté par la déformabilité des cellules et par leur diamètre. Dans le cas du sang, les GR se concentrent au centre du flux, forment des agrégats et repoussent les leucocytes et les plaquettes vers la paroi vasculaire, un phénomène nommé margination (Figure 32) **(Palmer 1967)**. Une conséquence de la margination est que les plaquettes et les leucocytes qui se trouvent à proximité de la paroi, sont idéalement localisés pour intervenir rapidement suite à une lésion vasculaire ou une inflammation **(Tangelder, Teirlinck et al. 1985, Goldsmith and Turitto 1986, Aarts, van den Broek et al. 1988)**. D'autre part, la couche proche de la paroi étant pauvre en GR et présentant donc une viscosité faible et constante, le sang à cet endroit peut être considéré comme un fluide newtonien **(Kroll, Hellums et al. 1996, Nesbitt, Mangin et al. 2006)**.

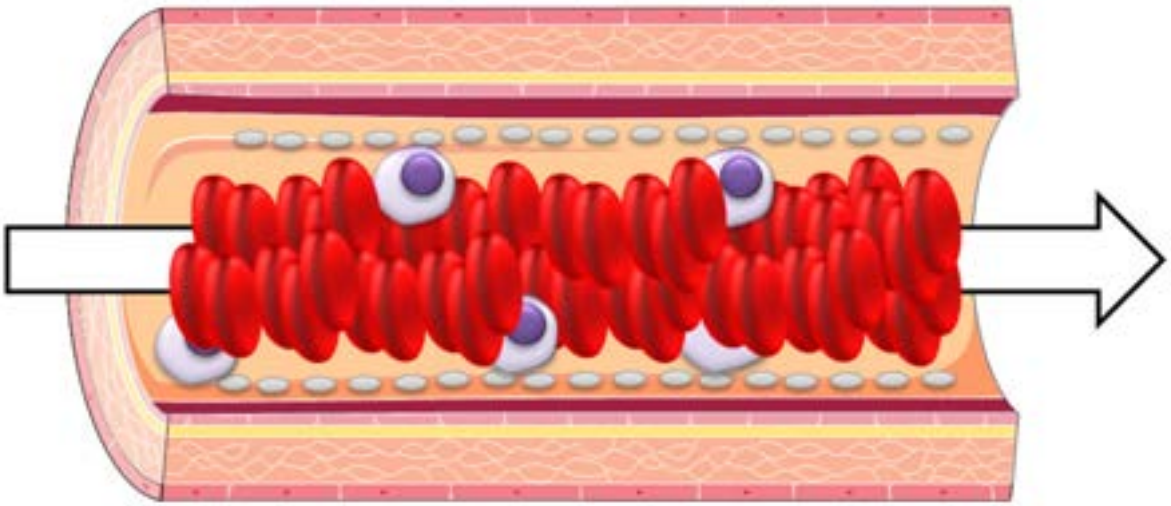


Figure 32 : Schématisation du processus de margination des plaquettes

Les plaquettes et les globules blancs (GB) sont repoussés vers la paroi par les globules rouges (GR).

V.1.1.3. Impact de la géométrie vasculaire sur la rhéologie sanguine

La rhéologie sanguine est affectée par la géométrie variable de l'arbre vasculaire, qui présente des différences de diamètre considérables suivant le type et la localisation des vaisseaux. De ce fait, les taux de cisaillement qui dépendent directement du rayon R, sont faibles dans les veines et les grosses artères, et élevés dans les artérioles et la microcirculation (Tableau 1) **(Goldsmith and Turitto 1986, Kroll, Hellums et al. 1996)**. D'autre part l'arbre vasculaire contient des bifurcations, des embranchements et des rétrécissements notamment dans des conditions pathologiques au niveau de vaisseaux présentant un épaississement de la paroi en raison de formation de plaques d'athérosclérose. Ces rétrécissements, qui sont appelés sténose dès que la réduction de la lumière dépasse 50%, modifient profondément les conditions hémorhéologiques locales **(Nesbitt, Mangin et al. 2006)**. On retrouve une décélération du flux sanguin dans la région pré-sténotique **(zone A)**, suivie d'une accélération au niveau du rétrécissement de la gorge **(zone B)**. Au niveau de la sténose, les flux atteignent des vitesses extrêmes **(zone C)**, qui peuvent dépasser des taux de cisaillement de 20.000 s^{-1} (tableau 1). Enfin, la région post-sténotique présente des flux très perturbés, avec des zones de stase et de flux inverses et oscillatoires **(zone D)** (Figure 33) **(Siegel, Markou et al. 1994, Nesbitt, Mangin et al. 2006, Gay and Zhang 2008)**.

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 1 : Taux et contraintes 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**).

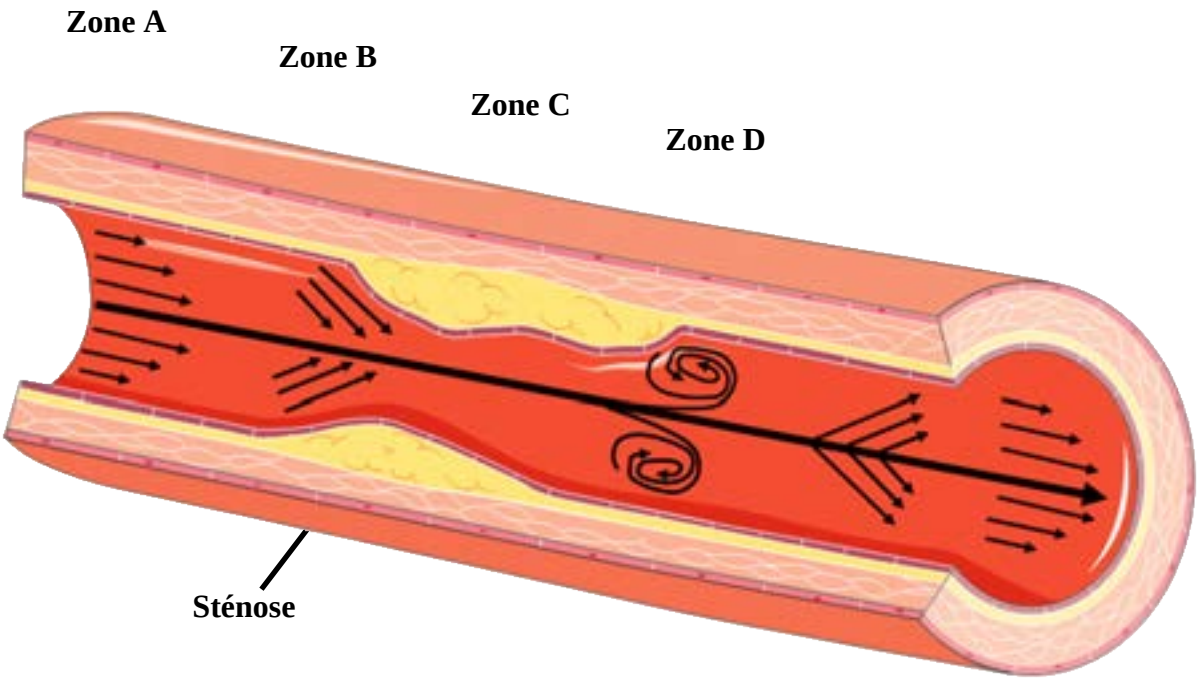


Figure 33 : Représentation schématique de la rhéologie sanguine au niveau d'un vaisseau sténosé.

V.2. Rôle du flux sanguin sur les fonctions plaquettaires

V.2.1. Rôle du flux sanguin sur l'adhérence plaquettaire

Le flux sanguin affecte directement l'adhérence des plaquettes en régulant les interactions entre les récepteurs et les protéines adhésives. Des flux faibles, tels que ceux retrouvés dans la circulation veineuse ou dans les artères de gros calibre (100-300 s^{-1}), permettent aux principaux récepteurs des plaquettes comme les intégrines et les glycoprotéines dont la GPVI, d'interagir avec leurs ligands et d'assurer ainsi le recrutement des plaquettes circulantes **(Savage, Almus-Jacobs et al. 1998, Ruggeri 2002, Nieswandt and Watson 2003, Bennett 2005)**. En conditions de flux plus élevés (>1.000 s^{-1}) retrouvés au niveau de la microcirculation, dans les artérioles ou dans des vaisseaux sténosés, les forces du flux empêchent ces interactions de se faire, et seul le complexe GPIb-V-IX permet l'attachement des plaquettes en liant le FW. Ceci résulte principalement de la constante d'association rapide de la GPIbα pour le FW **(Nesbitt, Mangin et al. 2006)**. Plusieurs études ont également montré que les forces du flux déplient le FW globulaire, ce qui permettrait l'exposition de différentes régions dont le domaine A1, augmentant ses propriétés adhésives **(Siedlecki, Lestini et al. 1996, Ni and Freedman 2003, Schneider, Nuschele et al. 2007, Di Stasio and De Cristofaro 2010)**. Une étude récente basée sur le FRET (fluorescence resonance energy transfer) a montré que les molécules de GPIbα sont plus proches les unes des autres à 10.000 s^{-1} qu'à 1.600 s^{-1}, suggérant que des vitesses élevées de flux induisent l'oligomérisation de la GPIbα, ce qui faciliterait l'adhérence des plaquettes au FW en condition de flux élevés **(Gitz, Koopman et al. 2013)**. Le flux peut également permettre un recrutement des plaquettes circulantes en favorisant l'adhérence de protéines plasmatiques, telles que le FW et le FG. Il a été montré que le FG était recruté abondamment dans des régions de séparation de flux, qui peuvent se produire au niveau des bifurcations artérielles où les vitesses d'écoulement sont très basses **(Pfeiffer, Mandrusov et al. 1998, Nesbitt, Mangin et al. 2006).**

V.2.2. Rôle du flux sanguin sur la signalisation et l'activation plaquettaire

Des études réalisées dans un système de perfusion ou un viscosimètre, ont montré que des flux extrêmes (>10.000 s^{-1}) activent les plaquettes, attesté par l'augmentation de l'affinité de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et l'exposition de la phosphatidylsérine à la surface des plaquettes **(Holme, Orvim et al. 1997, Shankaran, Alexandridis et al. 2003)**. Ce phénomène, nommé SIPA (Shear Induced Platelet Activation), résulte de la capacité du flux à modifier la conformation de la GPIbα et du FW, permettant leur interaction et le déclenchement d'une signalisation menant à l'activation plaquettaire **(Shankaran, Alexandridis et al. 2003, Nesbitt, Mangin et al. 2006)**. D'autre part, dans des conditions normales, les plaquettes circulent dans un état de repos, suggérant que des flux physiologiques ne les activent pas. En revanche, les flux élevés sensibiliseraient les plaquettes selon un mécanisme nommé « priming ». Une étude a montré que des plaquettes soumises à des flux élevés (>1.300 s^{-1}) pendant un temps court, deviennent pro-coagulantes, ce qui n'est pas le cas lorsqu'elles sont soumises à des flux faibles (25 s^{-1}) **(Sheriff, Bluestein et al. 2010)**.

Le mécanisme impliqué serait de la mécanotransduction, un processus qui permet de convertir des forces physiques exercées sur des récepteurs de surface en signaux biochimiques menant à des réponses cellulaires **(Hahn and Schwartz 2009)**. Ce phénomène est bien connu pour les CE, qui disposent de récepteurs de surface sensibles aux forces du flux, appelés mécanosenseurs, et capables de déclencher des réponses cellulaires comme la synthèse de NO **(Hahn and Schwartz 2009)**. Au niveau plaquettaire, des travaux ont suggéré que le complexe GPIb-V-IX, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le récepteur de l'ADP, $P2Y_1$ seraient des mécanorécepteurs capables d'induire une signalisation calcique dont l'intensité est modulée par le flux **(Mazzucato, Pradella et al. 2002, Goncalves, Nesbitt et al. 2005)**. Un premier travail s'intéressant au complexe GPIb-V-IX, a montré que seul 2% des plaquettes adhérentes au FW présentent des signaux calciques de 600 nM à 500 s^{-1}, contre 80% ayant des concentrations calciques intraplaquettaires moyenne de 1.800 nM à 6.000 s^{-1} **(Mazzucato, Pradella et al. 2002)**. Un autre travail indique que plus les accélérations de flux sont élevées, plus le nombre de plaquettes présentant une augmentation rapide et transitoire de la concentration de Ca^{2+} intraplaquettaire augmente **(Goncalves, Nesbitt et al. 2005)**. L'utilisation d'antagonistes a montré que ce processus de mécanotransduction passe par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $P2Y_1$ **(Goncalves, Nesbitt et al. 2005)**.

V.2.3. Rôle du flux sanguin sur l'agrégation plaquettaire

Les flux élevés générés dans un viscosimètre entrainent l'agrégation des plaquettes par des interactions entre le complexe GPIb-V-IX et le FW, et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le FG **(Peterson, Stathopoulos et al. 1987, Moake, Turner et al. 1988, Goto, Ikeda et al. 1998).** Ce mécanisme fait intervenir l'activation des plaquettes et dépend de la sécrétion d'ADP par les granules denses des plaquettes activées. La capacité des flux élevés (> 10.000 s^{-1}) à entrainer l'agrégation des plaquettes a également été démontrée dans une chambre en flux, après perfusion de sang sur du FW immobilisé **(Ruggeri, Orje et al. 2006)**. Dans ce cas, le mécanisme d'agrégation semble indépendant de l'activation des plaquettes et de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, car il n'est pas inhibé par l'utilisation de prostaglandine E1 et d'EDTA **(Ruggeri, Orje et al. 2006, Reininger 2009)**. Le flux serait également capable d'entrainer l'agrégation plaquettaire en modulant le $P2X_1$. En effet, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré un rôle plus important de ce canal ionique dans la formation d'un thrombus à des taux de cisaillement élevés **(Hechler, Lenain et al. 2003; Oury, Kuijpers et al. 2003)**.

Le développement de chambres microfluidiques contenant des rétrécissements, a permis d'étudier l'effet de flux altérés, comme ceux retrouvés au niveau d'une sténose artérielle, sur l'agrégation des plaquettes. Les flux perturbés retrouvés au niveau d'une région post-sténotique, forment des thrombi plus volumineux qu'au niveau d'une zone sans rétrécissement **(Nesbitt, Westein et al. 2009, Tovar-Lopez, Rosengarten et al. 2013, Westein, van der Meer et al. 2013)**. Cette observation peut être mise en parallèle d'études cliniques montrant la formation d'un thrombus volumineux au niveau d'une zone pos-sténotique **(Houdart, Mounayer et al. 2001, Arabi, Vellody et al. 2011).** Le processus d'agrégation dans la région post-sténotique reste encore mal compris, mais pourrait être lié à des phénomènes de stase et de recirculation qui facilitent le recrutement des plaquettes. Une étude a montré que la taille des thrombi qui se forment au niveau post-sténotique, n'est réduite ni par l'indometacine, ni par des inhibiteurs de $P2Y_1$ et $P2Y_{12}$ suggérant que la formation des thrombi dans cette région est indépendante de l'ADP et du TxA_2 **(Nesbitt, Westein et al. 2009).** D'autres études plus récentes proposent au contraire que les flux perturbés présents au niveau post-sténotique facilitent l'action de ces agonistes solubles **(Jackson, Nesbitt et al. 2009, Westein, van der Meer et al. 2013)**.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. Le ciblage de la GPIbβ inhibe l'activation induite par le complexe GPIb-V-IX, ainsi que la thrombose artérielle

Publication 1 :

"Targeting platelet GPIbβ reduces platelet adhesion, GPIb signaling, thrombin generation and prevents arterial thrombosis"

Maurer E, MPhil*[1], Tang C, PhD*[1], Schaff M, PhD[1], Bourdon C, BSc[1], Receveur N, BSc[1], Ravanat C, PhD[1], Eckly A, PhD[1], Hechler B, PhD[1], Gachet C, MD, PhD[1], Lanza F, PhD[1] and Mangin PH, PhD[1]

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

Introduction

Le complexe GPIb-V-IX est un récepteur multimoléculaire spécifiquement exprimé à la surface des plaquettes. Il est composé de quatre glycoprotéines transmembranaires, la GPIbα, GPIbβ, GPIX et GPV, appartenant à la famille des protéines riches en leucine **(Luo, Mo et al. 2007, Mo, Liu et al. 2012)**. L'importance physiologique du complexe est attestée par une maladie hémorragique rare, la pathologie de Bernard-Soulier, qui survient lorsqu'une des sous-unités du complexe est absente ou non fonctionnelle **(Lanza 2006)(Lanza 2006)**. La sous-unité GPIbα est particulièrement importante, car elle possède un domaine N-terminal qui interagit avec les différents ligands du complexe, notamment le facteur Willebrand. Cette interaction assure l'adhérence des plaquettes en conditions de flux élevé et entraine leur activation. Le complexe a également été décrit pour jouer un rôle dans l'activité pro-coagulante des plaquettes. Le ciblage de la GPIbα est reconnu pour être une potentielle stratégie anti-thrombotique, mais plusieurs études chez l'animal et des essais cliniques de phase II suggèrent que cette approche pourrait entrainer un risque de saignement important **(Gilbert, DeFeo-Fraulini et al. 2007, Markus, McCollum et al. 2011)(Gilbert, DeFeo-Fraulini et al. 2007; Markus, McCollum et al. 2011)**. Une étude réalisée au laboratoire a montré que l'utilisation de RAM.1, un anticorps monoclonal de rat ciblant la partie extracellulaire de la GPIbβ humaine, inhibe l'adhérence plaquettaire au FW en condition de flux (Perrault, Moog et al. 2001, Perrault, Mangin et al. 2003)(**Perrault, Moog et al. 2001; Perrault, Mangin et al. 2003**).

L'un des objectifs de ma thèse a été d'évaluer l'impact de RAM.1 sur la signalisation, l'activité pro-coagulante de GPIb-V-IX et sur la formation de thromboses *in vitro* et *in vivo*. L'étude de l'impact de RAM.1 sur la signalisation se base sur l'émission de filopodes de CHO transfectées avec le complexe GPIb-V-IX ainsi que sur l'étude de la signalisation calcique de plaquettes murines. Afin d'étudier l'effet de RAM.1 sur l'activité pro-coagulante, nous avons étudié la génération de thrombine à l'aide d'un automate CAT (calibrated automated thrombogram) et l'exposition de phosphatidylsérine par cytométrie en flux. L'impact de RAM.1 sur la formation de thromboses *in vitro* a été évalué par perfusion de sang au travers de microcapillaires de verre recouverts de collagène. Son effet *in vivo* a été apprécié à l'aide d'un fragment F(ab)'2 de RAM.1 dans deux modèles de thrombose (laser et mécanique) ainsi que par la mesure du temps de saignement à la queue des souris.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

Journal of the American Heart Association

Targeting Platelet GPIbβ Reduces Platelet Adhesion, GPIb Signaling and Thrombin Generation and Prevents Arterial Thrombosis

Eric Maurer, Chaojun Tang, Mathieu Schaff, Catherine Bourdon, Nicolas Receveur, Catherine Ravanat, Anita Eckly, Béatrice Hechler, Christian Gachet, Francois Lanza and Pierre H. Mangin

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33:1221-1229; originally published online April 4, 2013;
doi: 10.1161/ATVBAHA.112.301013
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2013 American Heart Association, Inc. 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/content/33/6/1221

Data Supplement (unedited) at:
http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2013/04/04/ATVBAHA.112.301013.DC1.html

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the Permissions and Rights Question and Answer document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
http://www.lww.com/reprints

Subscriptions: Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:
http://atvb.ahajournals.org//subscriptions/

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ by guest on February 20, 2014

Targeting Platelet GPIbβ Reduces Platelet Adhesion, GPIb Signaling and Thrombin Generation and Prevents Arterial Thrombosis

Eric Maurer,* Chaojun Tang,* Mathieu Schaff, Catherine Bourdon, Nicolas Receveur, Catherine Ravanat, Anita Eckly, Béatrice Hechler, Christian Gachet, Francois Lanza, Pierre H. Mangin

Objective—The glycoprotein (GP) Ib-V-IX complex regulates the adhesion, activation, and procoagulant activity of platelets. We previously reported that RAM.1, a rat monoclonal antibody directed against the extracellular domain of mouse GPIbβ, diminished adhesion of platelets and chinese hamster ovary cells transfected with the human GPIb-IX complex to von Willebrand factor under fl w conditions. Here, we further evaluated the functional importance of GPIbβ by studying the impact of RAM.1 on GPIb-mediated platelet responses and in vitro and in vivo thrombus formation.

Approach and Results—We show that RAM.1 dramatically reduced GPIb-mediated filopodia extension of chinese hamster ovary GPIb-IX cells after adhesion to von Willebrand factor. RAM.1 also reduced filopodia extension and GPIb-mediated Ca^{2+} signaling after adhesion of mouse platelets to von Willebrand factor. RAM.1 inhibited thrombin generation in platelet-rich plasma without impairing phosphatidylserine exposure. In addition, RAM.1 reduced thrombus formation after perfusion of mouse whole blood over collagen in a shear-dependent manner. This effect was confirmed in vivo, because injection of F(ab)′2 fragments of RAM.1 diminished thrombus formation induced by laser beam injury of mesenteric arterioles and forceps injury of the abdominal aorta. In contrast, RAM.1 F(ab)′2 did not prolong the tail-bleeding time or increase the volume of blood lost.

Conclusions—These findings are the first evidence that targeting a subunit other than GPIbα can lead to an antithrombotic effect via the GPIb-V-IX complex. This could represent an alternative way to reduce thrombus formation with a minor impact on hemostasis. **(*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1221-1229.)**

Key Words: hemostasis ■ platelets ■ thrombosis ■ von Willebrand factor

Platelets adhere and aggregate at sites of vascular injury to form a plug, which stops blood loss. Under pathological conditions, excessive platelet accumulation after atherosclerotic plaque rupture can induce occlusive thrombus formation, leading to life-threatening ischemic complications.[1] At the elevated blood fl ws found in arteries, the glycoprotein (GP) Ib-V-IX receptor ensures the first step of platelet recruitment to the damaged vessel wall through its binding to von Willebrand factor (VWF) present in the subendothelium.[2] GPIb-V-IX also participates in thrombus growth by interacting with the VWF exposed at the surface of activated platelets located at the edge of the thrombus.[3] Besides, the GPIb-V-IX complex contributes to the platelet procoagulant activity, which is responsible for thrombin generation, a key factor of thrombus formation.[4–7] Numerous ex vivo and in vivo studies have shown that targeting the GPIbα/VWF axis with different blockers, including antibodies, nanobodies, aptamers, or proteins isolated from snake venom, efficiently reduces thrombus growth in various experimental models.[8–14] These studies suggest that targeting the GPIb-V-IX complex could represent an interesting antithrombotic strategy.[15–17]

GPIb-V-IX belongs to the leucine-rich repeat protein family and is composed of 4 type I transmembrane glycoproteins: GPIbα is disulfide linked to 2 GPIbβ subunits to form GPIb, which noncovalently associates with GPIX and GPV.[18–20] GPIbα interacts through its intracellular domain with filamin-1, which is linked to the actin cytoskeleton. This interaction plays an important role in the surface expression of the GPIb-V-IX complex and in its anchorage within the plasma membrane.[21–24] GPIbα also binds to 6 members of the 14-3-3 family, which participate in integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation.[25–27] The intracellular domains of GPIbβ and GPV have been reported to interact with calmodulin, but the functional significance of this interaction remains to be established. All of the known extracellular ligands of the GPIb-IX complex (VWF, thrombin, Mac-1, P-selectin, thrombospondin-1, factor XI and factor XII, and high-molecular weight kininogen) bind to the 45-kDa globular N-terminal extracellular domain of GPIbα,

Received on: January 11, 2013; final ersion accepted on: March 12, 2013.

From the Inserm UMR-S949, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), Strasbourg, France.

*These authors contributed equally.

The online-only Data Supplement is available with this article at http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.112.301013/-/DC1.

Correspondence to Pierre Mangin, INSERM UMR-S949, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), 10, rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France. E-mail pierre.mangin@efs-alsace.fr

© 2013 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol **is available at http://atvb.ahajournals.org** **DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.301013**

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ by guest on February 20, 2014

whereas no docking site for any other molecule has been identified on GPIbβ or GPIX. The binding of VWF to GPIbα induces an intracellular signal involving a member of the Src-kinase family, which activates phospholipase Cγ2 and leads to intracellular Ca^{2+} mobilization and filopodia extension.[28] Studies in chinese hamster ovary (CHO) cell lines expressing mutated and deleted forms of the GPIb-IX complex have pointed to the intracellular region of GPIbβ rather than GPIbα as being critical for VWF-induced signaling.[29] However, the in vivo importance of GPIb-V-IX signaling still remains unknown.

We previously reported that the rat monoclonal antibody RAM.1 directed against the mouse GPIbβ extracellular domain inhibited VWF binding to platelets, and the adhesion of platelets and CHO cells transfected with the human GPIb-IX complex (hGPIb-IX CHO) to immobilized VWF under fl w conditions.[30,31] Although the precise mechanisms of these effects remain unclear, RAM.1 does not seem to prevent VWF binding to GPIbα through a steric hindrance notably supported by the fact that a Fab fragment of this antibody had a similar effect.[30] It has recently been reported that RAM.1 did not modify VWF binding to GPIb-IX reconstituted in phospholipid bilayer nanodiscs, further suggesting that the effect of RAM.1 may not be attributable to direct interference with the VWF–GPIbα interaction.[32]

Here, we observed that RAM.1 induced a dramatic decrease in filopodia extension of hGPIb-IX CHO cells adhering to VWF, suggesting that it could also affect GPIb-mediated signals. To establish this in platelets and evaluate its impact on thrombosis, we performed in vitro and in vivo studies in mice. We observed that RAM.1 inhibited GPIb-induced filopodia extension, in vitro and ex vivo, and GPIb-mediated intracellular Ca^{2+} mobilization after adhesion of mouse platelets to VWF. Interestingly, RAM.1 reduced collagen and tissue factor (TF)-induced thrombin generation in mouse platelet-rich plasma without impairing surface exposure of phosphatidylserine. RAM.1 also prevented thrombus formation in an in vitro fl w system and in 2 in vivo murine thrombosis models, without affecting the tail-bleeding time. Altogether, these results suggest that targeting GPIbβ could strongly reduce GPIb-mediated signaling, thrombin generation and thrombus growth, whereas having a minor impact on hemostasis.

Materials and Methods

Materials and Methods are available in the online-only Supplement.

Results

RAM.1 Inhibits GPIb-Mediated Signaling

The GPIb-V-IX complex supports adhesion of platelets to VWF, a process initiating an intracellular signal. Because RAM.1 was found to inhibit fl w-dependent adhesion of hGPIb-IX CHO cells, we also examined its effect on GPIb-mediated filopodia extension, which reflects signaling in these cells.[26] RAM.1 (10 μg/mL) did not significantly modify the number of hGPIb-IX CHO cells, adhering to VWF under static conditions (Figure 1B), but reduced by 73±1% the number of cells extending filopodia (n=3; P=0.001) clearly indicating impaired signaling (Figure 1A and 1C). Because RAM.1 is targeted against mouse GPIbβ, we next examined its effects on murine platelets. RAM.1 reduced the morphological changes of platelets with almost no cells extending ≥5 filopodia as compared with ≈42±3% in control (n=3; P=0.007), in the absence of a significant effect on adhesion (Figure 1D–1F). These results converge to establish that RAM.1 is an inhibitor of the GPIb-mediated signals leading to cytoskeletal reorganization. A salient feature of GPIb-mediated signals is the activation of phospholipase Cγ2, which generates inositol 1,4,5-trisphosphate through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and ultimately leads to the mobilization of intracellular Ca^{2+} stores.[28] Real-time confocal microscopy showed that RAM.1 strongly inhibited the intracellular Ca^{2+} spikes of individual VWF-adherent platelets, an effect which was concomitant with the inhibition of filopodia extension (Figure 1G–1I). The mean increase in intracellular Ca^{2+} concentration was reduced by 58±7% in the presence of RAM.1 as compared with the control (n=3; P<0.0001; Figure 1H). Altogether these results support the view that RAM.1 efficiently inhibits GPIb-mediated signaling. This effect seems to be specific because RAM.1 did not affect platelet morphological changes, or aggregation induced by soluble agonists (adenosine 5′-disphosphate, thrombin, or the thromboxane A_2 mimetic U46619) or other immobilized proteins (collagen, fibrinogen; data not sh wn).

RAM.1 Reduces TF- and Collagen-Induced Thrombin Generation

The GPIb-V-IX complex is known to regulate the procoagulant activity of platelets and its defect, such as in patients with Bernard-Soulier syndrome results in a reduced prothrombin consumption.[33] In agreement with these observations, we recently reported that mouse platelets lacking GPIb have a profound defect in thrombin generation.[7] The ability of RAM.1 to decrease thrombin generation was measured in a calibrated automated thrombin assay using mouse-citrated platelet-rich plasma. RAM.1 reduced by 41±10% and 70±7%, the total amount of thrombin generated (endogenous thrombin potential) in response to TF (208±33 nmol/L versus 350±37 nmol/L thrombin×minutes; n=3; P=0.002) and collagen (173±38 nmol/L versus 568±107 nmol/L thrombin×minutes; n=3; P=0.029), respectively (Figure 2A–2C). RAM.1 also decreased by 39±6% and 61±7%, the maximal concentration of thrombin generated (Peak) after stimulation with TF (n=3; P=0.003) or collagen (n=3; P=0.046), respectively (Figure 2D). As a control, we showed that Xia.B2, a function-blocking antibody binding to GPIbα, did not significantly decrease TF-induced thrombin generation in this assay (Figure I in the online-only Data Supplement). Surprisingly, a fl w cytometry analysis revealed that RAM.1 did not reduce the surface exposure of phosphatidylserine, because annexin-V binding was unchanged after stimulation with collagen-related peptide, thrombin, a mixture of collagen-related peptide and thrombin, or the Ca^{2+} ionophore A23187 (n=7; P>0.05; Figure 2E). These results indicate that RAM.1 markedly impairs thrombin generation through a mechanism that seems independent of phosphatidylserine exposure.

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ by guest on February 20, 2014

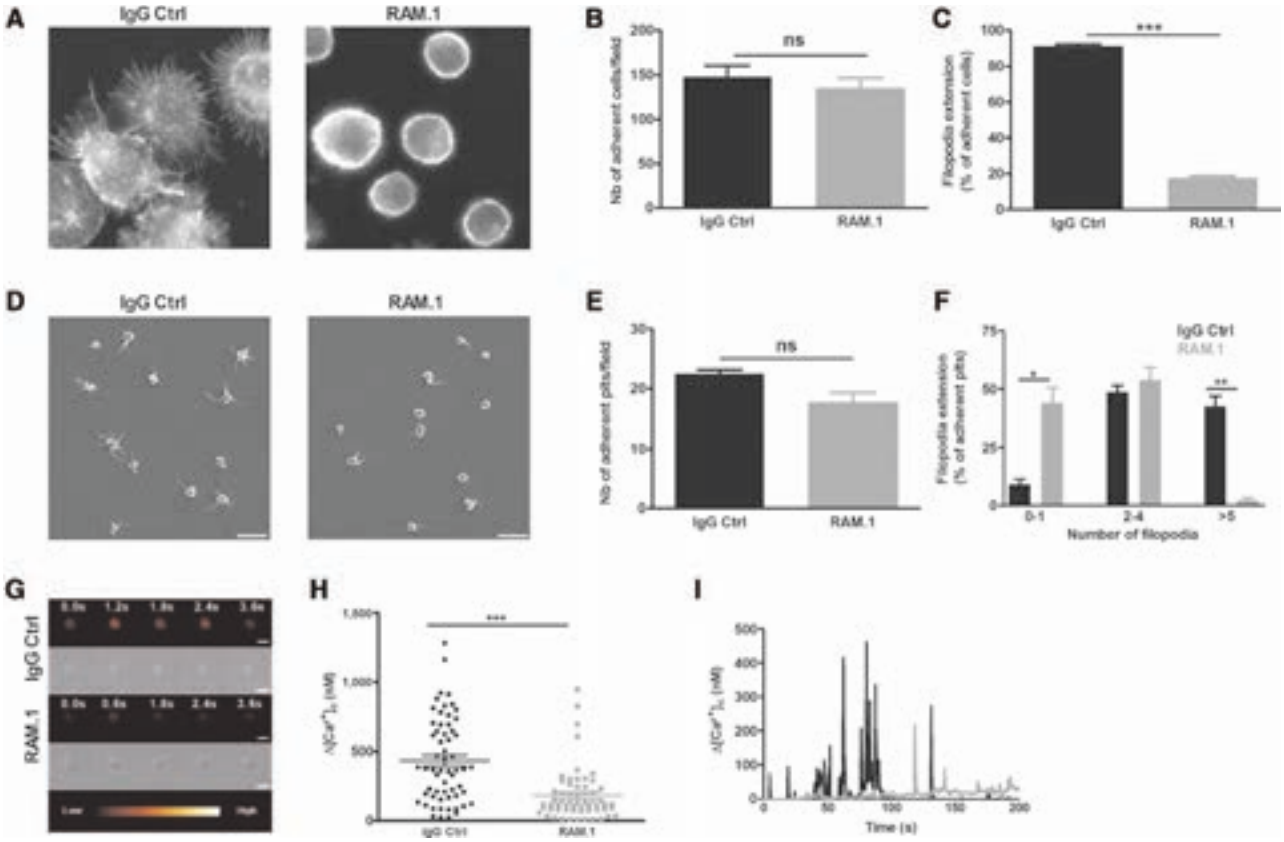


Figure 1. RAM.1 inhibits glycoprotein (GP) Ib–mediated filopodia extension after adhesion of chinese hamster ovary (CHO) Ib-IX cells or mouse platelets to immobilized von Willebrand factor (VWF) and decreases intracellular Ca^{2+} levels. **A–C**, hGPIb-IX CHO cells were treated with RAM.1 (10 μg/mL) or a control antibody and allowed to adhere to immobilized VWF for 30 minutes in the presence of botrocetin (1 μg/mL) and EDTA (5 mmol/L). The cells were then fixed, stained with TRITC-phalloidin, and examined by fluorescence microscopy to obtain representative images (**A**). The total number of adherent cells (**B**) and the percentage of cells extending filopodia (ns: $P>0.05$; **C**) were determined in 8 random fields. Results represent the mean±SEM in 3 independent experiments (***$P<0.001$). **D–F**, Washed mouse platelets (3×10^7/mL) incubated with Integrilin (40 μg/mL) were treated with RAM.1 (10 μg/mL) or a control antibody and allowed to adhere for 15 minutes to a VWF matrix in the presence of botrocetin (1 μg/mL). Adherent platelets were fixed and examined by scanning electron microscopy to obtain representative images (**D**). The bars indicate 10 μm. The fixed cells were also stained with TRITC-phalloidin, and the total number of adherent platelets (**E**) and the percentages of platelets extending 0 to 1, 2 to 4, and >5 filopodia were analyzed in 5 random fields (ns: $P>0.05$; **F**). Results represent the mean±SEM in 4 independent experiments (*$P<0.05$; **$P<0.01$). **G–I**, Washed mouse platelets (5×10^8/mL) loaded with Ca^{2+} indicator and morphological dyes and treated with RAM.1 (10 μg/mL) or a control antibody were allowed to adhere to immobilized human VWF in the presence of botrocetin (2 μg/mL) and Integrilin (40 μg/mL). The changes in fluorescence in individual adherent platelets were monitored by confocal microscopy and converted to Ca^{2+} concentrations. **G**, Single-channel Oregon Green fluorescence (**top**) and differential interferential contrast (**bottom**) images depicting Ca^{2+} oscillations and morphological changes of a representative platelet adhering to VWF. Scale bar, 4 μm. **H**, Dot plot distribution of the maximal increase in cytosolic Ca^{2+} of individual platelets adhering to VWF. **I**, Representative Ca^{2+} profile of single platelets adhering to VWF and treated or not treated with RAM.1 (***$P<0.001$). IgG indicates immunoglobulin G.

RAM.1 Inhibits Thrombus Formation in a Flow-Based Assay

To address the role of RAM.1 in thrombus formation in vitro, anticoagulated mouse whole blood labeled with 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide was perfused over immobilized collagen. The 3D reconstructed images obtained by confocal microscopy indicated that RAM.1 (20 μg/mL) efficiently reduced the thrombus volume at a shear rate of 3000 s^{-1} (Figure 3A). Interestingly, the effect of RAM.1 was shear dependent with no inhibition at a shear rate of 300 s^{-1} and a progressive 28±9% (n=3; $P=0.054$), 47±10% (n=3; $P=0.019$), and 54±3% (n=3; $P=0.001$) reduction in the thrombus volume at 750 s^{-1}, 1500 s^{-1}, and 3000 s^{-1}, respectively (Figure 3B–3E).

RAM.1 Inhibits GPIb-Mediated Filopodia Extension Ex Vivo

To study the effects of RAM.1 in vivo, we generated F(ab)′2 fragments to prevent Fc-dependent platelet activation and subsequent removal from the circulation. We first confirmed that RAM.1 F(ab)′2 inhibited filopodia extension after adhesion of mouse platelets to VWF to a similar extent as RAM.1 immunoglobulin G (Figure II in the online-only Data Supplement). We next verified that after intravenous injection of 1, 2, or 3 mg/kg of RAM.1 F(ab)′2, this antibody bound to circulating platelets and did not reduce the platelet count nor the expression level of GPIbα (Figure 4A–4C). Finally, we observed that platelets isolated 30 minutes after injection of RAM.1 F(ab)′2 fragments (3 mg/kg) exhibited a clear reduction in their ability

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ by guest on February 20, 2014

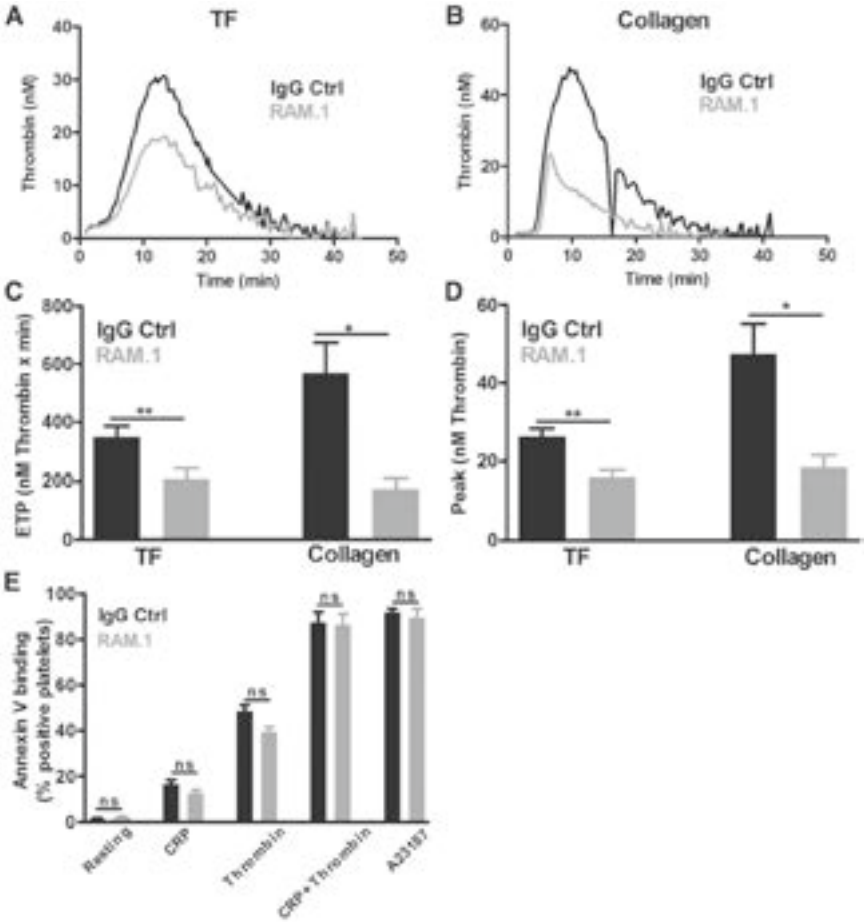


Figure 2. RAM.1 decreases glycoprotein (GP) Ib–mediated thrombin generation. **A**–**D**, Calibrated automated thrombin (CAT) experiments were performed in mouse-citrated platelet-rich plasma (PRP; final platelet count 1.3×10^8 cells/mL). The reaction was triggered by addition of tissue factor (TF; 0.5 pmol/L) or collagen (30 μg/mL) in the presence of Ca^{2+} and the fluorogenic substrate Z-GGR-AMC. Thrombin activity was determined from the accumulation of the fluorescent product and calculated relative to a thrombin calibrator. **A** and **B**, Representative thrombin generation curves in PRP treated with RAM.1 (10 μg/mL) or a control antibody. **C**, The bar graphs correspond to the endogenous thrombin potential (ETP) values, representing the total amount of thrombin generated. **D**, The bar graphs represent the peak values, which correspond to the maximal thrombin concentration attained. **E**, Washed platelets from wild-type mice were treated with 10 μg/mL of RAM.1 or a control antibody and assayed for annexin-V binding by flow cytometry after stimulation with collagen-related peptide (CRP; 10 μg/mL), thrombin (1 U/mL), a mixture of CRP (10 μg/mL) and thrombin (1 U/mL) or A23187 (0.5 mmol/L). The results are presented as the mean±SEM in 3 to 7 independent experiments for each condition (*P<0.05; **P<0.01; and ns: P>0.05). IgG indicates immunoglobulin G.

to extend filopodia on a VWF surface compared with untreated mice (n=5; P=0.007; Figure 4D and 4E).

RAM.1 Inhibits Thrombus Formation In Vivo

The impact of RAM.1 on thrombus formation was evaluated in 2 models of localized arterial injury. In the well-characterized model of laser injury of mesenteric arterioles,[34] 20 minutes after injection of RAM.1 F(ab)′2 fragments (3 mg/kg) into C57Bl/6 mice, the thrombus area was reduced by 57±9% as compared with the control (1–5 vessels per mouse: control: n=5 [13 vessels]; RAM.1: n=5 [11 vessels]; P=0.040; Figure 5A and 5B). To confirm this result, we used a second model of arterial thrombosis in which the aorta is mechanically injured with a forceps.[35] Similarly as in the laser injury model, injection of RAM.1 F(ab)′2 fragments (3 mg/kg) strongly decreased thrombus growth (area under the curve: 48±10% reduction; control: n=9 mice; RAM.1: n=11 mice; P=0.031; Figure 5C and 5D). Overall these data indicate that targeting GPIbβ with RAM.1 inhibits thrombus growth in vivo.

RAM.1 Does Not Prolong the Tail-Bleeding Time and the Volume of Blood Loss

The effect of RAM.1 on hemostasis was investigated in a tail-bleeding assay. No prolongation of the tail-bleeding time was observed 20 minutes after injection of RAM.1 F(ab)′2 (3 mg/kg) as compared with control F(ab)′2 fragments (n=10; P>0.05; Figure 6A). Moreover, RAM.1 did not increase the volume of blood lost over a 30-minute period of time (4.9±2.1 μL) as compared with the control (26.7±12.6 μL; n=10; P>0.05; Figure 6B). These results suggest that treatment with RAM.1 does not modify hemostatic functions in mice.

Discussion

We originally reported that the rat antimouse GPIbβ antibody, RAM.1, decreased binding of VWF to the human GPIb-V-IX complex and impaired human platelet adhesion to VWF under fl w conditions, and we wanted to further characterize the properties of this antibody especially in vivo.[30] This study extends our previous findings by providing evidence that targeting GPIbβ with RAM.1 inhibits VWF-induced GPIb signaling both in a human and in a mouse system, as shown by decreases in filopodia extension and intracellular Ca^{2+} flu es. Interestingly, RAM.1 also impacts on TF- and collagen-induced thrombin generation. Moreover, we found that RAM.1 inhibits in vitro thrombus growth after perfusion of anticoagulated mouse whole blood over collagen. This observation was in accordance with the defective thrombus formation occurring in vivo in 2 murine models based, respectively, on laser-induced injury of mesenteric arterioles and mechanical injury of the aorta. Finally, we showed that RAM.1 seems to have a minor impact on hemostasis, because it did not prolong the time to first arrest bleeding nor increased the volume of blood lost in a tail-bleeding assay.

One major finding of our previous work was the inhibition of platelet adhesion to VWF under fl w conditions.[30] In

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ by guest on February 20, 2014

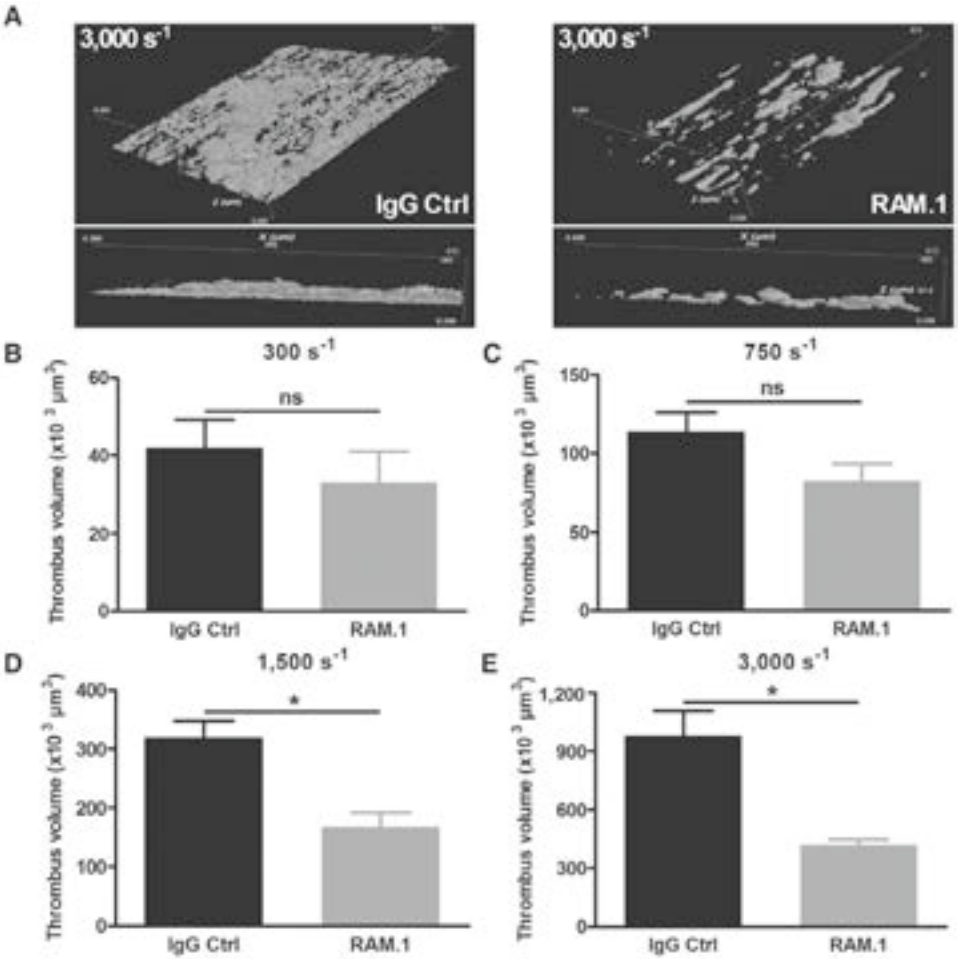


Figure 3. RAM.1 inhibits thrombus growth in an in vitro flow system. **A**–**E**, Anticoagulated mouse whole blood (hirudin: 100 U/mL) labeled with 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide (1 μmol/L) and incubated with RAM.1 (20 μg/mL), or a control antibody was perfused over immobilized collagen at the indicated shear rates. Thrombus growth was monitored in real time by confocal microscopy. **A**, Representative 3D reconstructed images of platelet thrombi obtained after 180 s of perfusion at 3000 s^{-1}. **B**–**E**, Bar graphs represent the thrombus volumes measured after 180 s, and data are the mean±SEM in 3 separate experiments (*$P<0.05$; ***$P<0.001$; and ns: $P>0.05$). IgG indicates immunoglobulin G.

the present study, we found that neither mouse platelets nor hGPIb-IX CHO cells displayed a significant decrease in adhesion to VWF in a static assay. These apparently contradictory results can probably be related to the fact that the inhibitory effect of RAM.1 on GPIbα/VWF interactions would be more evident under fl w than under static conditions. One possibility is that receptor/ligand interactions being less stable under fl w, they become more sensitive to an inhibitory effect. It is also possible that the use of botrocetin in the static assay, which potently increases the adhesiveness of the VWF A1 domain for GPIbα, could overcome the inhibitory effect of RAM.1.

We previously reported that binding of VWF to GPIbα activates phospholipase Cγ2 through one or more members of the Src-kinase family, leading to the mobilization of intracellular Ca^{2+} stores and filopodia extension.[28] This signaling cascade was inhibited by blocking the VWF binding site of GPIbα. We now provide evidence that targeting GPIbβ with RAM.1 also inhibits GPIb signaling. This points to a role of GPIbβ in VWF-induced platelet activation, in agreement with another previous study, where we found that the intracellular region of GPIbβ, rather than that of GPIbα, participates in GPIb signaling leading to filopodia extension.[29] The mechanism is still unknown, but because its intracellular domain is devoid of catalytic activity, one may hypothesize that it acts through binding partners. So far, only 14-3-3ζ and calmodulin have been described to interact with GPIbβ. Although calmodulin has been reported to play a role in platelet shape change, its pharmacological inhibition did not affect GPIb-mediated filopodia formation after adhesion of platelets to VWF (P. Mangin and F. Lanza, unpublished data, 2003). We and others found that the GPIbα/14-3-3ζ interaction participates in GPIb-mediated integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation, but not in the signaling cascade leading to filopodia extension.[25,26] However, it was recently proposed that binding of 14-3-3ζ to the S609 residue of GPIbα regulates Src kinase and protein kinase C activation, leading to an increase in intracellular Ca^{2+} concentrations.[36] Whether other as yet unidentified binding partners of GPIbβ participate in GPIb signaling remains to be determined.

The mechanism through which RAM.1 inhibits GPIb signaling remains unclear. Its binding to GPIbβ could alter the organization of the GPIb-IX complex within the plasma membrane and in turn reduce the binding properties of GPIbα, which would result in the transmission of a weaker signal.[30] Alternatively, a change in conformation could disturb interaction of GPIb-IX with intracellular partners involved in GPIb-mediated signaling. This hypothesis could be supported by observation that RAM.1 promotes dephosphorylation of S166 in the intracytoplasmic domain of GPIbβ, a site implicated in 14-3-3 binding.[30,31]

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ by guest on February 20, 2014

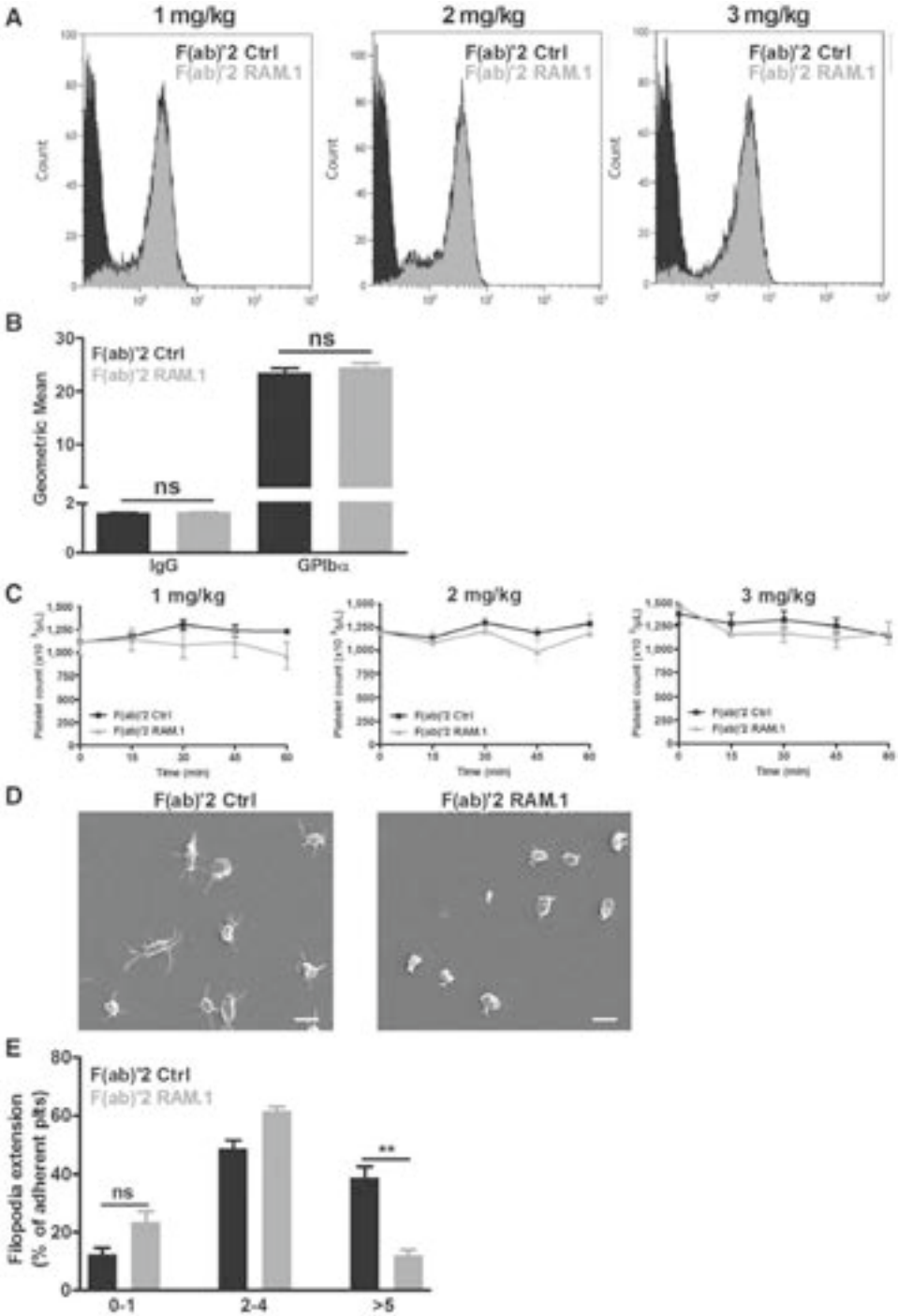


Figure 4. RAM.1 F(ab)′2 fragments injected into mice do not affect the platelet count and the expression level of glycoprotein (GP) Ibα, but inhibit GPIb-mediated filopodia extension. Control or RAM.1 F(ab)′2 fragments (1, 2, or 3 mg/kg) were injected into the jugular vein of C57Bl/6 mice. **A**, Washed platelets were isolated from the blood of C57Bl/6 mice injected with control or RAM.1 F(ab)′2 (1, 2, or 3 mg/kg), and bound RAM.1 was revealed with anti-F(ab)′2 antibodies. Representative histograms of RAM.1 F(ab)′2 binding to platelets determined by flow cytometry. **B**, The surface expression of GPIbα was determined in anticoagulated whole blood by flow cytometry. Platelets were gated by FSC/SSC characteristics (10 000 platelets per sample), and results were expressed as the geometric mean±SEM of the relative fluorescence intensity, in arbitrary units (3 mice per group). **C**, The platelet count was determined over time in whole blood collected into EDTA (6 mmol/L) after severing the mouse tail. **D** and **E**, Washed mouse platelets (3×10^7/mL) from mice injected with control or RAM.1 F(ab)′2 were allowed to adhere for 15 minutes to a human von Willebrand factor (VWF) matrix in the presence of botrocetin (1 μg/mL) and Integrilin (40 μg/mL). **D**, Adherent platelets were fixed, and representative images were obtained by scanning electron microscopy. The bars indicate 5 μm. **E**, Alternatively, the fixed platelets were stained with TRITC-phalloidin, and the numbers of platelets extending 0 to 1, 2 to 4, and >5 filopodia were analyzed in 5 random fields and expressed as the percentage of the total adherent cells (n=3). Results represent the mean±SEM in 4 independent experiments (**$P<0.01$). IgG indicates immunoglobulin G.

Based on reduced prothrombin consumption in patients with Bernard-Soulier syndrome, the GPIb-IX complex is known to participate in the process of thrombin generation. We provide evidence that RAM.1 inhibits thrombin generation in mouse platelet-rich plasma. Because RAM.1 did not reduce annexin-V binding in response to strong agonists, such as collagen-related peptide, thrombin, or A23187, the mechanism involved seems to be distinct from the exposure of phosphatidylserine. Because GPIbα binds several coagulation factors, including factor XII and factor XI, high-molecular weight kininogen, and thrombin, one could hypothesize that RAM.1 reduces their binding and thereby lowers the ability of platelets to promote thrombin generation. However, we recently showed that the procoagulant function of the GPIb-V-IX complex seems to be independent of the N-terminal domain of GPIbα, which contains all known ligand-binding site.[7] Future studies are needed to precisely define the mechanism by which RAM.1 impairs thrombin generation.

We observed that RAM.1 inhibits in vitro thrombus formation during perfusion of mouse whole blood over collagen. The effect of RAM.1 was modest at low-shear rates, in agreement with the fact that other receptors, such as integrins $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$, participate in the initial phase of thrombus formation and can overcome blockade or absence

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ by guest on February 20, 2014

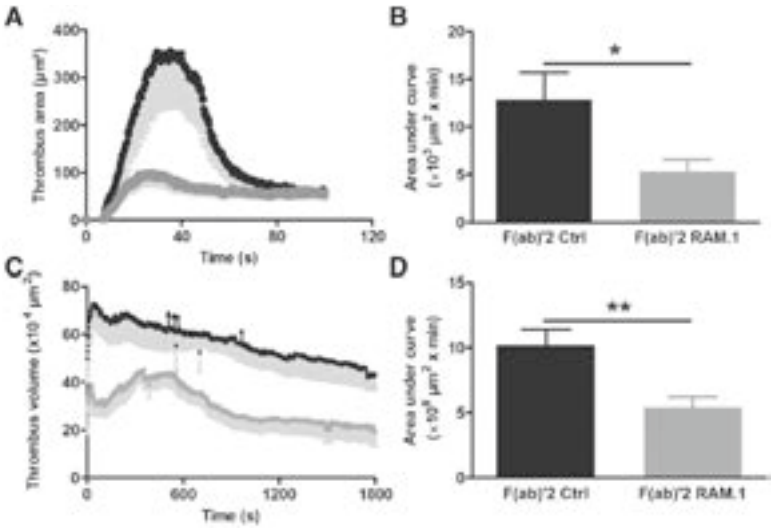


Figure 5. RAM.1 F(ab)′2 fragments inhibit thrombus growth in 2 in vivo thrombosis models. Control or RAM.1 F(ab)′2 fragments (3 mg/kg) and 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide (5 µL of a 100 µmol/L solution/g of body weight) were injected into the jugular vein of C57Bl/6 mice. **A** and **B**, Laser-induced lesions were generated in mesenteric arterioles. **A**, Tracings represent the mean surface area±SEM of the thrombi developing over time. **B**, Bar graphs represent the area of the thrombus during 100 s and are expressed as the area under curve (AUC). Control: n=13 vessels in 5 mice; RAM.1 F(ab)′2: n=11 vessels in 5 mice (*P<0.05). **C** and **D**, Forceps were used to produce a mechanical injury of the aorta of mice. **C**, Tracings represent the mean surface area±SEM of the thrombi developing over time. **D**, Bar graphs represent the area of the thrombus during 30 minutes and are expressed as the AUC. Control: n=9 mice; RAM.1 F(ab)′2: n=11 mice (*P<0.05; **P<0.01).

of the GPIb-V-IX complex.[37] Consistent with the key role of this receptor at high-shear rates,[2] RAM.1 had a more marked influence under these conditions. Unfortunately, the effect of RAM.1 on thrombus formation could not be evaluated in human platelets, which became activated by the antibody in whole blood. Development of a more specific agent against human GPIbβ is needed to investigate this in future studies.

Importantly, the inhibitory effect of RAM.1 was demonstrated in 2 distinct thrombosis models, suggesting that pharmacological targeting of GPIbβ could reduce thrombus growth in vivo. Because RAM.1 inhibits platelet adhesion to VWF and thrombin generation, its antithrombotic effect is likely to result from these GPIb-IX–mediated functions. Whether the effect of RAM.1 on dampening GPIb signals also participates in this process is speculative. So far, the role of GPIb signaling in thrombus growth remains elusive, and because no specific signaling molecules have been identified downstream of GPIb, evaluating its importance is challenging. We recently identified a region between R164 and P170 in the intracellular domain of GPIbβ as playing a role in GPIb signaling and are evaluating its importance in GPIbβ$^{-/-}$ mice transduced with human GPIbβ constructs.[29]

A defect or deficien y of either GPIbα or its main ligand, VWF, leads to the hemorrhagic disorders known as Bernard-Soulier syndrome and VWF disease, respectively.[38,39] Therefore, pharmacological targeting of the GPIbα/VWF axis might result in an increased bleeding risk. This is in agreement with the fact that the aptamer ARC1789, which blocks GPIb binding to VWF, transiently prolonged the cutaneous bleeding time in healthy volunteers and increased the bleeding risk of patients undergoing carotid endarterectomy with one of them presenting a serious adverse event of intraoperative bleeding.[40,41] Our data indicated that RAM.1 does not prolong the mouse tail-bleeding time, suggesting no major impact on hemostasis. From these observations, we propose that targeting GPIbβ could prevent excessive thrombus growth with a potentially minor effect on the risk of bleeding.

In conclusion, this study provides evidence that a ligand of the mouse GPIbβ extracellular domain can blunt VWF-induced GPIb signaling and strongly reduce thrombin generation. This effect combined with its capacity to inhibit platelet adhesion to VWF under fl w could contribute to the strong reduction in thrombus formation, suggesting that targeting the extracellular domain of GPIbβ may prevent thrombosis.

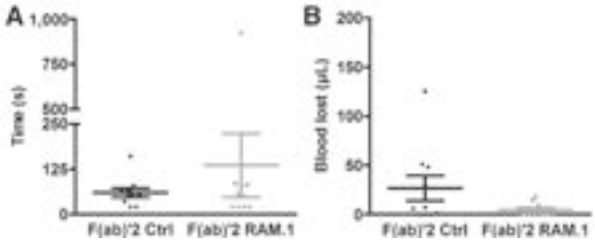


Figure 6. RAM.1 F(ab)′2 fragments do not modify the tail-bleeding time or the volume of blood lost. Control or RAM.1 F(ab)′2 fragments (3 mg/kg) were injected into C57Bl/6 mice. The tail-bleeding times (**A**) and volumes of blood lost over a 30-minute period (**B**) were determined in 10 mice for each group. The symbols represent individual mice, and the mean value±SEM for each population is indicated.

Acknowledgments

We thank Stéphanie Magnenat, Sylvie Moog, Simone Schuhler, and Jean-Yves Rinckel for technical assistance; Monique Freund for animal care; and Juliette Mulvihill for reviewing the English of the article.

Sources of Funding

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). E. Maurer was supported by an Inserm-région Alsace bursary, Mathieu Schaff by a Contrat doctoral from the French government, and C. Tang was supported by a postdoctoral fellowship from the FFCSA (Fondation Franco-Chinoise pour la Science et ses Applications) and the CSC (China Scholarship Council).

Disclosures

None.

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ by guest on February 20, 2014

References

1. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8:1227–1234.
2. Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996;84:289–297.
3. Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest*. 2000;105:783–791.
4. Dörmann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood*. 2000;96:2469–2478.
5. Béguin S, Kumar R, Keularts I, Seligsohn U, Coller BS, Hemker HC. Fibrin-dependent platelet procoagulant activity requires GPIb receptors and von Willebrand factor. *Blood*. 1999;93:564–570.
6. Béguin S, Keularts I, Al Dieri R, Bellucci S, Caen J, Hemker HC. Fibrin polymerization is crucial for thrombin generation in platelet-rich plasma in a VWF-GPIb-dependent process, defective in Bernard-Soulier syndrome. *J Thromb Haemost*. 2004;2:170–176.
7. Ravanat C, Strassel C, Hechler B, Schuhler S, Chicanne G, Payrastre B, Gachet C, Lanza F. A central role of GPIb-IX in the procoagulant function of platelets that is independent of the 45-kDa GPIbalpha N-terminal extracellular domain. *Blood*. 2010;116:1157–1164.
8. Cauwenberghs N, Meiring M, Vauterin S, van Wyk V, Lamprecht S, Roodt JP, Novák L, Harsfalvi J, Deckmyn H, Kotzé HF. Antithrombotic effect of platelet glycoprotein Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1347–1353.
9. Diener JL, Daniel Lagassé HA, Duerschmied D, Merhi Y, Tanguay JF, Hutabarat R, Gilbert J, Wagner DD, Schaub R. Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1155–1162.
10. Ulrichts H, Silence K, Schoolmeester A, de Jaegere P, Rossenu S, Roodt J, Priem S, Lauwereys M, Casteels P, Van Bockstaele F, Verschueren K, Stanssens P, Baumeister J, Holz JB. Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical effica y and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. *Blood*. 2011;118:757–765.
11. Chang MC, Lin HK, Peng HC, Huang TF. Antithrombotic effect of crotalin, a platelet membrane glycoprotein Ib antagonist from venom of Crotalus atrox. *Blood*. 1998;91:1582–1589.
12. Konstantinides S, Ware J, Marchese P, Almus-Jacobs F, Loskutoff DJ, Ruggeri ZM. Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Ibalpha and VI deficien y in a mouse model of arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2014–2021.
13. Bergmeier W, Piffath CL, Goerge T, Cifuni SM, Ruggeri ZM, Ware J, Wagner DD. The role of platelet adhesion receptor GPIbalpha far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:16900–16905.
14. Azzam K, Garfin el LI, Bal dit Sollier C, Cisse Thiam M, Drouet L. Antithrombotic effect of a recombinant von Willebrand factor, VCL, on nitrogen laser-induced thrombus formation in guinea pig mesenteric arteries. *Thromb Haemost*. 1995;73:318–323.
15. Bonnefoy A, Vermylen J, Hoylaerts MF. Inhibition of von Willebrand factor-GPIb/IX/V interactions as a strategy to prevent arterial thrombosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2003;1:257–269.
16. Vanhoorelbeke K, Ulrichts H, Van de Walle G, Fontayne A, Deckmyn H. Inhibition of platelet glycoprotein Ib and its antithrombotic potential. *Curr Pharm Des*. 2007;13:2684–2697.
17. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIb complex as a target for antithrombotic drug development. *Thromb Haemost*. 2008;99:473–479.
18. Mo X, Lu N, Padilla A, López JA, Li R. The transmembrane domain of glycoprotein Ibbeta is critical to efficient expression of glycoprotein Ib-IX complex in the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2006;281:23050–23059.
19. Mo X, Liu L, López JA, Li R. Transmembrane domains are critical to the interaction between platelet glycoprotein V and glycoprotein Ib-IX complex. *J Thromb Haemost*. 2012;10:1875–1886.
20. Luo SZ, Mo X, Afshar-Kharghan V, Srinivasan S, López JA, Li R. Glycoprotein Ibalpha forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibbeta subunits in the resting platelet. *Blood*. 2007;109:603–609.
21. Williamson D, Pikovski I, Cranmer SL, Mangin P, Mistry N, Domagala T, Chehab S, Lanza F, Salem HH, Jackson SP. Interaction between platelet glycoprotein Ibalpha and filamin-1 is essential for glycoprotein Ib/IX receptor anchorage at high shear. *J Biol Chem*. 2002;277:2151–2159.
22. Cranmer SL, Ashworth KJ, Yao Y, Berndt MC, Ruggeri ZM, Andrews RK, Jackson SP. High shear-dependent loss of membrane integrity and defective platelet adhesion following disruption of the GPIbα-filamin interaction. *Blood*. 2011;117:2718–2727.
23. Kanaji T, Ware J, Okamura T, Newman PJ. GPIbα regulates platelet size by controlling the subcellular localization of filamin. *Blood*. 2012;119:2906–2913.
24. Jurak Begonja A, Hoffmeister KM, Hartwig JH, Falet H. FlnA-null megakaryocytes prematurely release large and fragile platelets that circulate poorly. *Blood*. 2011;118:2285–2295.
25. Gu M, Xi X, Englund GD, Berndt MC, Du X. Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3) using a reconstituted mammalian cell expression model. *J Cell Biol*. 1999;147:1085–1096.
26. 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.
27. Mangin PH, Receveur N, Wurtz V, David T, Gachet C, Lanza F. Identification of fi e novel 14-3-3 isoforms interacting with the GPIb-IX complex in platelets. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1550–1555.
28. 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.
29. David T, Strassel C, Eckly A, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F. The platelet glycoprotein GPIbbeta intracellular domain participates in von Willebrand factor induced-filopodia formation independently of the Ser 166 phosphorylation site. *J Thromb Haemost*. 2010;8:1077–1087.
30. Perrault C, Moog S, Rubinstein E, Santer M, Baas MJ, de la Salle C, Ravanat C, Dambach J, Freund M, Santoso S, Cazenave JP, Lanza F. A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIbbeta modulates vWF mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost*. 2001;86:1238–1248.
31. Perrault C, Mangin P, Santer M, Baas MJ, Moog S, Cranmer SL, Pikovski I, Williamson D, Jackson SP, Cazenave JP, Lanza F. Role of the intracellular domains of GPIb in controlling the adhesive properties of the platelet GPIb/V/IX complex. *Blood*. 2003;101:3477–3484.
32. Yan R, Mo X, Paredes AM, Dai K, Lanza F, Cruz MA, Li R. Reconstitution of the platelet glycoprotein Ib-IX complex in phospholipid bilayer Nanodiscs. *Biochemistry*. 2011;50:10598–10606.
33. Caen J, Bellucci S. The defective prothrombin consumption in Bernard-Soulier syndrome. Hypotheses from 1948 to 1982. *Blood Cells*. 1983;9:389–399.
34. Hechler B, Nonne C, Eckly A, Magnenat S, Rinckel JY, Denis CV, Freund M, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C. Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb Haemost*. 2010;8:173–184.
35. Mangin PH, Tang C, Bourdon C, Loyau S, Freund M, Hechler B, Gachet C, Jandrot-Perrus M. A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;341:156–163.
36. Zhang W, Zhao L, Liu J, Du J, Yan R, Dai K. Role of 14-3-3ζ in platelet glycoprotein Ibα-von Willebrand factor interaction-induced signaling. *Int J Mol Sci*. 2012;13:5364–5374.
37. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under fl w. *Cell*. 1998;94:657–666.
38. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:395–424.
39. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagiparous thrombocytic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1:46.

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ by guest on February 20, 2014

40. Gilbert JC, DeFeo-Fraulini T, Hutabarat RM, Horvath CJ, Merlino PG, Marsh HN, Healy JM, Boufakhreddine S, Holohan TV, Schaub RG. First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation*. 2007;116:2678–2686.

41. Markus HS, McCollum C, Imray C, Goulder MA, Gilbert J, King A. The von Willebrand inhibitor ARC1779 reduces cerebral embolization after carotid endarterectomy: a randomized trial. *Stroke*. 2011;42:2149–2153.

Significance

Blood platelets are critical in hemostasis, which stops blood loss. They also play a key role in arterial thrombosis responsible for ischemic diseases, such as myocardial infarction or stroke, which are the leading cause of mortality worldwide. The glycoprotein (GP) Ib-V-IX complex plays an important role in platelet adhesion, activation, aggregation, and procoagulant activity and has been proposed as an interesting antithrombotic target. However, a defect in either GPIbα or its main ligand, von Willebrand factor, leads to hemorrhagic disorders, suggesting that a pharmacological targeting of the GPIbα/von Willebrand factor axis could result in an increased bleeding risk. In this study, we show that targeting GPIbβ with the monoclonal antibody RAM.1 inhibits GPIb-mediated platelet activation, procoagulant activity, and thrombus formation in vitro and in vivo. Interestingly, RAM.1 does not prolong the tail-bleeding time of wild-type mice, suggesting that targeting GPIbβ could represent an antithrombotic strategy with a potentially low-bleeding risk.

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ by guest on February 20, 2014

MATERIALS AND METHODS

Materials

Paraformaldehyde (PFA) and glutaraldehyde were from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA). Human VWF was isolated from factor VIII concentrates (EFS-Alsace, Strasbourg, France) according to a previously described method.[1] Botrocetin was purified from snake venom (Latoxan, Valence, France) as described previously.[2] Acid citrate dextrose (ACD) solution was from Bioluz (St-Jean-de-Luz, France) and hirudin from Transgene (Illkirch-Graffenstaden, France). The monoclonal antibody RAM.1 was produced in our laboratory[3] and the rat IgG isotype control was obtained from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France). The anti-GPIbα antibody, Xia.B2, was from Emfret Analytics (Eibelstadt, Germany). Acid-soluble type I fibrillar collagen (ASC) solution was prepared from bovine Achilles tendon as previously described.[4] Fatty acid-free human serum albumin (HSA), TRITC-phalloidin, fibrinogen, bovine serum albumin (BSA), U46619, adenosine 5'-diphosphate (ADP) and bovine thrombin were from Sigma-Aldrich (Lyon, France). The GPIIb-IIIa antagonist eptifibatide (Integrilin®) was obtained from Millennium Pharma (San Francisco, CA). 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DIOC_6$), Oregon Green 488 BAPTA-AM-1 and Calcein red-orange-AM were from Molecular Probes (Eugene, OR). Xylasine (Rompun®) and ketamine (Imalgen®) were provided by Bayer (Puteaux, France) and Merial (Lyon, France), respectively. Calibrated automated thrombin (CAT) reagents were from STAGO (Asnières, France) and the fluorogenic substrate Z-GGR-AMC was from Bachem (Bubendorf,Switzerland). Fluoresceinisothiocyanate (FITC)–conjugated annexin V was from Roche Diagnostics (Meylan, France) and recombinant human tissue factor (Innovin) was from Dade Behring. Cross-linked collagen-related peptide (CRP) was obtained from Dr. R.W. Farndale (University of Cambridge, Cambridge, UK). Ca^{2+} ionophore A23187 was from Calbiochem (La Jolla, California). CHO cells transfected with human GPIb-IX complex were kindly provided by Dr J. Lopez (Houston, TX).

Preparation of F(ab')2 fragments

$F(ab')_2$ fragments were prepared as described with minor modifications.[5] Monoclonal antibody (MoAb) RAM.1 was dialyzed overnight against a 0.1 mol/L sodium acetate buffer (pH 4). The antibody (2.4 mg/mL) was digested by incubation with pepsin (Sigma-Aldrich (Lyon, France); 1 part pepsin to 50 parts MoAb) for 2.5 hours at 37°C. Digestion was stopped by adding 1 volume of a 2 mol/L Tris buffer (pH 9) . Digested IgG were dialysed against 20 mmol/L Tris buffer (pH8) and $F(ab')_2$ fragments were further purified on a monoQ column.

Platelet count

Whole blood was collected into EDTA (6 mmol/L) after severing the tail of an anesthetized mouse. The platelet count was determined in a Scil Vet ABC automatic cell counter (Scil Animal Care Company, Holtzheim, France) set to murine parameters.

Static adhesion assay

Glass coverslips were coated for 2 h with human VWF (10 µg/mL) and the surface was blocked with PBS-1% HSA for 1 h. Adhesion of CHO cells transfected with the GPIb-IX complex to a VWF surface was studied as previously described.[6] Briefly, 10^5 cells were allowed to adhere to VWF in the presence of botrocetin (1 µg/mL) and EDTA (5 mmol/L) at 37°C for 30 min. After a washing step, the adherent cells were fixed with 4% PFA, stained with TRITC-phalloidin (2 µg/mL) and viewed by epifluorescence microscopy. The number of adherent cells and the percentage of cells extending at least one filopod were quantified. Adhesion of platelets to VWF was investigated as described elsewhere.[7] Briefly, mouse platelets in Tyrode's buffer (138 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 12 mmol/L $NaHCO_3$, 0.4 mmol/L NaH_2PO_4, 1 mmol/L $MgCl_2$, 2 mmol/L $CaCl_2$, 5 mmol/L Hepes, 3.5 mg/mL HSA, 5.5

mmol/L glucose, pH 7.3), preincubated for 15 min with RAM.1 or an isotype control, were allowed to adhere to VWF (9 x 10^6 cells/coverslip) in the presence of botrocetin (1 µg/mL) and Integrilin (40 µg/mL) at 37°C. After 15 min, non-adherent platelets were removed by washing and adherent platelets were fixed with 4% PFA, stained with TRITC-phalloidin (2 µg/mL) and viewed by epifluorescence microscopy. The number of adherent platelets and of those extending filopodia were determined. Alternatively, the adherent platelets were fixed with 2.5% glutaraldehyde and processed for scanning electron microscopy as previously described.[7]

Measurement of cytosolic Ca^{2+} concentrations

Intracellular Ca^{2+} concentrations were monitored using a quantitative dual-dye ratiometric assay as previously described.[8] Briefly, mouse platelets resuspended at 5 x 10^8/mL after a first washing step were simultaneously loaded with the membrane-permeating non ratiometric Ca^{2+} indicator dye Oregon Green 488 BAPTA-AM-1 (5 µmol/L) and the morphological dye Calcein red-orange-AM (4 µmol/L) for 30 min at 37°C. The dye-loaded platelets were washed a second time and finally resuspended in Tyrode's buffer containing apyrase (0.02 U/mL). The increases in platelet and Ca^{2+}-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, Wetzlar, Germany) (1.85 frames/s for 10 min). The ratio of the signal intensities in the two dye channels was converted into intracellular Ca^{2+} concentrations (Leica TCS SP5 LASAF software).

Measurement of annexin V binding

Measurement of annexin V binding was performed as previously described.[9] Briefly, washed mouse platelets in Tyrode's buffer were activated with CRP (10 µg/mL) or thrombin (1 U/mL) alone or together, or with A23187 (0.5 mmol/L) for 10 min at 37°C. A 2 µL aliquot of activated or resting platelets was then incubated with FITC-conjugated annexin V for 20 min and

analyzed by flow cytometry. A forward scatter/FL1 dot plot was performed to determine the ratio of activated to non-activated platelets. Activated annexin V-positive platelets were quantified as the percentage of total platelets.

Calibrated automated thrombin generation analyses

Calibrated automated thrombin (CAT) analyses were performed by the thrombogram method as previously described.[9] Briefly, 20 µL of tissue factor (0.5 pmol/L Innovin 1/12 000 final dilution) or collagen (30 µg/mL) were added in triplicate to 80 µL of citrated (3.15%) mouse platelet-rich plasma (PRP) (1.3×10^8 platelets/mL final concentration) in a 96-well plate (Immulon 2 Dynex; Stago, Paris, France) maintained at 37°C. The accumulation of fluorescence from cleaved thrombin substrate: Z-GGR-AMC (41 µmol/L) in the presence of $CaCl_2$ (1.7 mmol/L) was measured continuously at excitation and emission wavelengths of 390 and 460 nm, respectively (Fluoroskan Ascent; ThermoLab Systems, Helsinki, Finland). The area under the curve, also called the endogenous thrombin potential (ETP), corresponds to the total amount of thrombin formed in the sample. Peak corresponds to the maximal concentration of thrombin generated.

Measurement of the thrombus volume

Rectangular glass microcapillaries (VitroCom, Mountain Lakes, NJ) were coated with type I collagen (2.5 mg/mL) overnight at 4°C and blocked with PBS-1% HSA for 30 min at room temperature. Hirudinated (100 U/mL) mouse whole blood labeled with $DIOC_6$ (1 µmol/L) was perfused through the collagen-coated channels at 37°C and various shear rates using a programmable syringe pump (PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA). To determine the thrombus volume, the fluorescence emitted in the range 490-595 nm after excitation with a 488 nm argon-ion laser was measured using a confocal Leica SP5 inverted microscope with a resonant scanner and a 40x oil objective. Series of optical sections in xyz were recorded from the base to the peak of the thrombi at designated time points. The images were then stacked and analyzed with ImageJ software (National Institute of Health,

Bethesda, MD) to determine the volume of the thrombi. 3D reconstructed images were obtained using Image surfer (Center for Computer-Integrated Systems for Microscopy and Manipulation, Chapel Hill, NC).

Mice

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. We used 8-week-old male mice. All procedures for animal experiments were carried out in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals as defined by European laws.

Tail bleeding time

The tail bleeding time was measured as previously reported.[10] The time required for the arrest of bleeding and the volume of blood lost were determined over a 30 min period.

Arterial thrombosis models

Mice were anesthetized with an i.p. injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) and injected with a fluorescent dye ($DIOC_6$, 5 µL of a 100 µM solution/g of body weight) to label platelets and allow visualization of a thrombus. Mesenteric arterioles were injured with a laser and the resultant thrombus growth was monitored as previously described.[11] Alternatively, thrombosis was induced mechanically by compression of the abdominal aorta with forceps for 60 s.[12] Thrombus formation was then monitored in real time with a fluorescence microscope coupled to a charge-coupled device camera (Roper Scientific, Evry, France) and the images were analyzed with the Metamorph software (Molecular Devices, Roper Scientific). The mice were maintained and the experiments were performed in the animal facilities of the EFS-Alsace.

Statistics

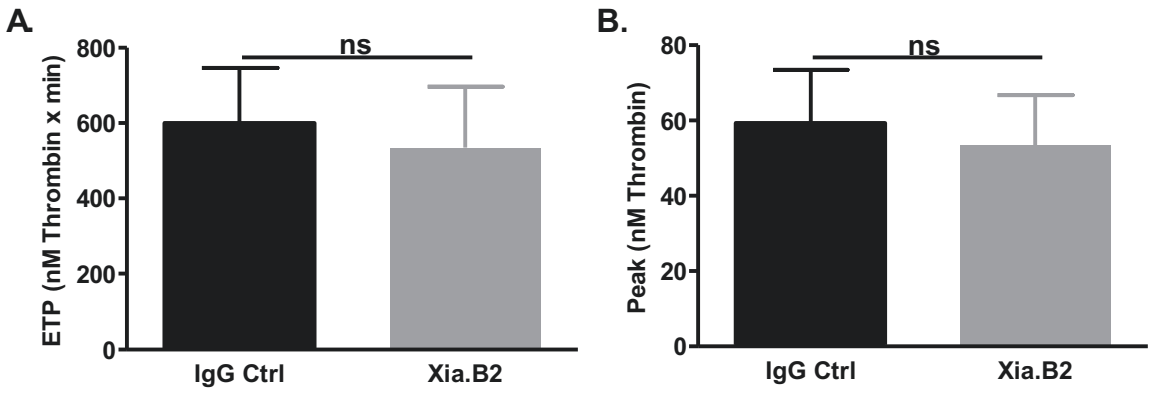
All values are reported as the mean ± standard error of the mean (SEM) unless otherwise indicated. The data of Figures 1, 2, 3, 4, S1 and S2 were analysed with a two-tailed paired t-test. The data of Figures 5 and 6 were analysed with a Grubbs' test followed with a two-tailed unpaired t-test. Differences were considered to be significant for $p<0.05$. All statistical tests were carried out using Prism software (GraphPad, La Jolla, CA).

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. Perrault C, Moog S, Rubinstein E, Santer M, Baas MJ, de la Salle C, Ravanat C, Dambach J, Freund M, Santoso S, Cazenave JP, Lanza F. A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of gpibbeta modulates vwf mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost*. 2001;86:1238-1248
4. Cazenave JP, Packham MA, Mustard JF. Adherence of platelets to a collagen-coated surface: Development of a quantitative method. *J Lab Clin Med*. 1973;82:978-990
5. Cauwenberghs N, Meiring M, Vauterin S, van Wyk V, Lamprecht S, Roodt JP, Novak L, Harsfalvi J, Deckmyn H, Kotze HF. Antithrombotic effect of platelet glycoprotein ib-blocking monoclonal antibody fab fragments in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1347-1353
6. Yuan Y, Kulkarni S, Ulsemer P, Cranmer SL, Yap CL, Nesbitt WS, Harper I, Mistry N, Dopheide SM, Hughan SC, Williamson D, de la Salle C, Salem HH, Lanza F, Jackson SP. The von willebrand factor-glycoprotein ib/v/ix interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein ib/v/ix-transfected cells. *J Biol Chem*. 1999;274:36241-36251
7. 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
8. Schaff M, Receveur N, Bourdon C, Wurtz V, Denis CV, Orend G, Gachet C, Lanza F, Mangin PH. Novel function of tenascin-c, a matrix protein relevant to atherosclerosis, in platelet recruitment and activation under flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:117-124
9. Ravanat C, Strassel C, Hechler B, Schuhler S, Chicanne G, Payrastre B, Gachet C, Lanza F. A central role of gpib-ix in the procoagulant function of platelets that is independent of the 45-kda gpibalpha n-terminal extracellular domain. *Blood*. 2010;116:1157-1164
10. Leon C, Eckly A, Hechler B, Aleil B, Freund M, Ravanat C, Jourdain M, Nonne C, Weber J, Tiedt R, Gratacap MP, Severin S, Cazenave JP, Lanza F, Skoda R, Gachet C. Megakaryocyte-restricted myh9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood*. 2007;110:3183-3191
11. Hechler B, Nonne C, Eckly A, Magnenat S, Rinckel JY, Denis CV, Freund M, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C. Arterial thrombosis: Relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb Haemost*. 2010;8:173-184
12. Mangin PH, Tang C, Bourdon C, Loyau S, Freund M, Hechler B, Gachet C, Jandrot-Perrus M. A humanized glycoprotein vi (gpvi) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-gpvi agents. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;341:156-163

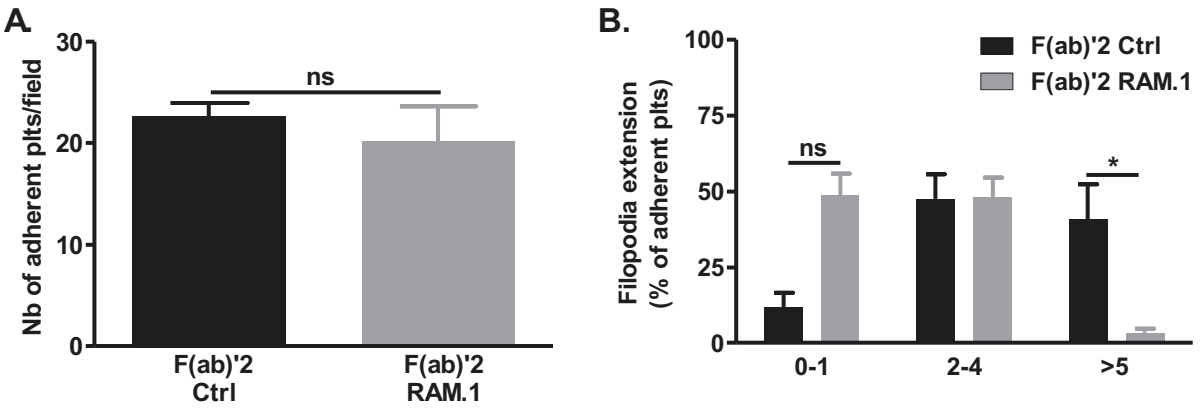
SUPPLEMENTAL FIGURES

Supplemental figure I



Supplemental Figure I: Xia.B2, does not decrease TF-induced thrombin generation. A-B, CAT experiments were performed in mouse citrated PRP. The reaction was triggered by addition of TF (0.5 pmol/L) in the presence of Ca^{2+} and the fluorogenic substrate Z-GGR-AMC. Thrombin activity was determined from the accumulation of the fluorescent product and calculated relative to a thrombin calibrator. **A,** The bar graphs correspond to the endogenous thrombin potential (ETP) values, representing the total amount of thrombin generated. **B,** The bar graphs represent the peak values which correspond to the maximal thrombin concentration attained. The results are presented as the mean ± SEM in three independent experiments for each condition.

Supplemental figure II



Supplemental figure II: RAM.1 F(ab)'2 inhibits GPIb-mediated filopodia extension after platelet adhesion to immobilized VWF. A-B, Washed mouse platelets (3 x 10^7/mL) incubated with Integrilin (40 µg/mL) were treated with control or RAM.1 F(ab)'2 fragments (10 µg/mL) and allowed to adhere for 15 min to a VWF matrix in the presence of botrocetin (1 µg/mL). Adherent platelets were fixed and examined by scanning electron microscopy. The total number of adherent platelets (**A**) and the percentage of platelets extending 0-1, 2-4 and >5 filopodia (ns: $P>0.05$) (**B**) were analysed in five random fields (n=3). Results represent the mean ± SEM in three independent experiments (*$P<0.05$).

Conclusion

Nos résultats montrent que RAM.1 réduit l'émission de filopodes et la signalisation calcique de plaquettes adhérentes sur le FW. L'utilisation de cet anticorps réduit la quantité de thrombine générée en réponse au collagène et au facteur tissulaire, sans impacter l'exposition de phosphatidylsérine. RAM.1 diminue également la formation de thrombi *in vitro* après perfusion de sang sur du collagène. Cette réduction est de plus en plus marquée au fur et à mesure que le taux de cisaillement augmente. RAM.1 inhibe la thrombose artérielle produite mécaniquement ou par un laser. Le temps de saignement et le volume de sang perdu ne sont pas affectés par RAM.1, suggérant que cet anticorps n'impacte pas l'hémostase.

En conclusion, ces observations suggèrent que le ciblage de GPIbβ pourrait prévenir la croissance excessive des thrombi avec un effet potentiellement mineur sur le risque de saignement. L'ensemble de ces données a fait l'objet d'une publication dans Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology en 2013.

2. Rôle de la fibronectine cellulaire, présente dans le sous-endothélium sous une forme fibrillaire, dans l'adhérence et l'activation des plaquettes

Publication 2 :

"Fibrillar cellular fibronectin is a strong thrombogenic component of the vessel wall promoting thrombus growth through TLR4"

Eric Maurer[1], Mathieu Schaff[1], Amandine Baron[1], Nicolas Receveur[1], Catherine Bourdon[1], Bernhard Nieswandt[2], Christophe Dubois[3], Martine Jandrot-Perrus[4], François Lanza[1], Christian Gachet[1], Pierre H. Mangin[1].

[1]UMR_S949, Inserm, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, F-67065, France. [2]University Hospital Würzburg, Rudolf Virchow Center, DFG Research Center for Experimental Biomedicine, University of Würzburg, Würzburg, Germany. [3]UMR_S1076, Inserm, Faculté de Pharmacie, Marseille, F-13385, France. [4]UMR_S698, Inserm, CHU Bichat, Paris, F-75877, France.

Soumis

Introduction

La fibronectine est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire composée de deux monomères liés par des ponts disulfures, qui régule différentes fonctions cellulaires telles que l'adhérence, la migration, la croissance et la différentiation **(Pankov and Yamada 2002)**. La fibronectine est encodée par un gène unique, qui génère 20 isoformes par épissage alternatif de son ARNm. Ces isoformes se différencient par l'inclusion ou l'exclusion d'extra domaines A et B. La présence ou l'absence de ces extra domaines permet de différencier deux formes de fibronectine, la fibronectine plasmatique et la fibronectine cellulaire **(Pankov and Yamada 2002)**. Au niveau vasculaire, ces deux formes sont retrouvées : a) la fibronectine plasmatique est synthétisée par les hépatocytes et circule dans le sang sous une forme dimérique soluble et est également retrouvée sous une forme fibrillaire dans la paroi vasculaire et b) la fibronectine cellulaire synthétisée notamment par les cellules de la paroi vasculaire est présente sous une forme fibrillaire dans le sous-endothélium. Alors que la forme dimérique de la fibronectine plasmatique a été décrite pour assurer l'adhérence et l'activation des plaquettes **(Beumer, MJ et al. 1994, Beumer, Heijnen et al. 1995, McCarty, Zhao et al. 2004)**, l'importance des formes fibrillaires des fibronectines plasmatique et cellulaire n'a pas encore été évaluée.

L'objectif de ce projet est d'étudier la capacité des fibronectines cellulaire et plasmatique pariétales, en particulier la forme fibrillaire de la fibronectine cellulaire à réguler différentes fonctions plaquettaires telles que l'adhérence, l'activation, l'agrégation et l'activité pro-coagulante. Notre étude se base sur l'utilisation d'un système de perfusion dans lequel du sang anticoagulé est aspiré à l'aide d'une pompe programmable, au travers de chambres recouvertes de fibronectine plasmatique ou cellulaire rendue fibrillaire. La première difficulté de cette étude a été de former de la FN fibrillaire, puisqu'elle est commercialisée sous forme dimérique. La fibrillogénèse de la FN est un processus médié par des cellules. Dans ce travail j'ai réussi à former un réseau fibrillaire d'une manière originale et indépendante des cellules, en étirant mécaniquement des dimères de FN plasmatique et cellulaire immobilisés grâce à une pompe à aspiration (Figure 34). L'activation des plaquettes a été évaluée à l'aide du changement de forme et de l'apparition de signaux calciques cytosoliques. Des anticorps bloquants et du sang de souris modifiées génétiquement ont été utilisés pour identifier les récepteurs impliqués dans l'adhérence, l'activation et l'agrégation plaquettaire.

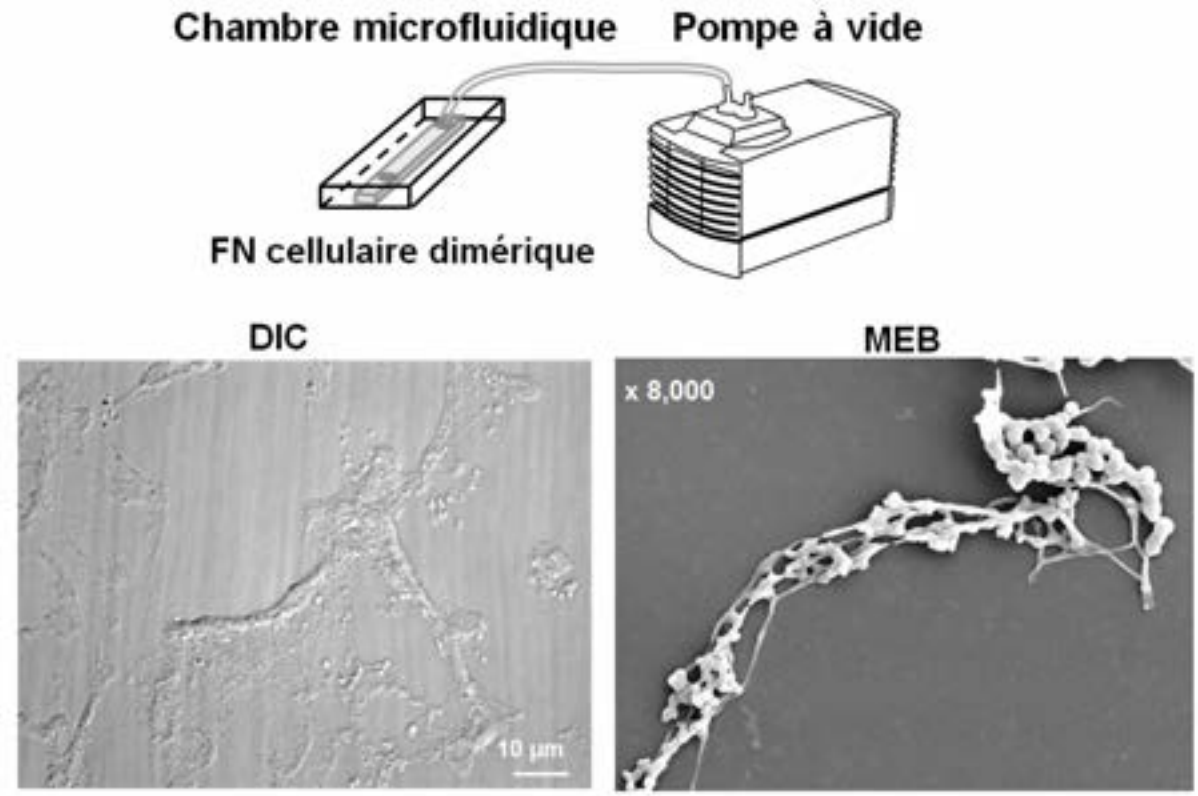


Figure 34 : Formation de fibres de fibronectine cellulaire *in vitro*

Fibrillar cellular fibronectin is a strong thrombogenic component of the vessel wall promoting thrombus growth through TLR4

Running title: Thrombogenicity of fibrillar cellular fibronectin

Eric Maurer[1], Mathieu Schaff[1], Nicolas Receveur[1], Catherine Bourdon[1], Bernhard Nieswandt[2], Christophe Dubois[3], Martine Jandrot-Perrus[4], François Lanza[1], Christian Gachet[1], Pierre H. Mangin[1].

[1]UMR_S949, Inserm, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, F-67065, France. [2]University Hospital Würzburg, Rudolf Virchow Center, DFG Research Center for Experimental Biomedicine, University of Würzburg, Würzburg, Germany. [3]UMR_S1076, Inserm, Faculté de Pharmacie, Marseille, F-13385, France. [4]UMR_S698, Inserm, CHU Bichat, Paris, F-75877, France.

Correspondence: Pierre H Mangin, UMR_S949, INSERM, 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

Total world count of the manuscript: 5158

Total world count of the abstract: 200

Total number of figures: 7

Reference count: 63

Scientific category: Thrombosis and hemostasis

Key points

Subendothelial fibrillar cellular fibronectin supports efficient thrombus formation through TLR4

ABSTRACT

The ability of cellular and plasma fibronectins, found in the vessel wall in a fibrillar conformation, to regulate platelet functions and trigger thrombosis remains poorly understood. In this study, we looked at how parietal fibronectin, in particular the fibrillar cellular form, can modulate platelet responses under flow conditions. A fibrillar network was formed by mechanically stretching immobilized dimeric cellular fibronectin. Perfusion of anticoagulated whole blood over this surface resulted in efficient adhesion of platelets and thrombus formation. The initial steps of platelet adhesion and activation, as evidenced by filopodia extension and an increase in intracellular calcium levels (419±29 nM), were dependent on integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$. Subsequent thrombus growth was mediated by these integrins together with the GPIb-IX complex, GPVI and TLR4, potentially through its binding to the EDA region of cellular fibronectin, highlighting a novel role for this receptor in platelets. Upon thrombus formation, the platelets became procoagulant and generated fibrin as revealed by video-microscopy. In conclusion, this work provides evidence that fibrillar cellular fibronectin is a strong thrombogenic surface which supports efficient platelet adhesion, activation, aggregation and procoagulant activity through the interplay of a series of receptors including integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$, the GPIb-IX complex, GPVI and TLR4.

Introduction

Under normal conditions, platelet adhesion, activation and aggregation at a site of vascular injury result in the formation of a plug which stops blood loss[1]. In contrast, rupture of an atherosclerotic plaque in a diseased artery can lead to an occlusive thrombus resulting in life-threatening pathologies like myocardial infarction or stroke[2]. The initial step of plug or thrombus formation depends on the interaction of platelets with numerous adhesive proteins present in the vessel wall such as von Willebrand factor (VWF), collagens, thrombospondins, laminins and fibronectin (FN)[3].

FN is an extracellular matrix protein which interacts with many different cell types, thereby regulating various functions such as adhesion, migration, growth and differentiation[4]. Its crucial importance in vertebrate development is evidenced by the early embryonic lethality observed in FN-deficient mice[5]. FN is a 500 kDa glycoprotein containing two monomers linked by disulfide bonds, each being composed of 12 type I, 2 type II and 15 to 17 type III modules[4]. FN is encoded by a single gene which, through alternative mRNA splicing, generates 20 variants differing by inclusion or exclusion of the type III_{15} homology connecting segment, the extra domains A (EDA) and B (EDB) and the presence of the region V, variable in length. EDA is recognized as an important site for cell interaction since it binds various receptors including $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_9\beta_1$ integrins and the toll-like receptor 4 (TLR4)[6,7]. Two main forms of FN have been identified, namely plasma FN (pFN) and cellular FN (cFN). pFN, which is secreted by hepatocytes, lacks the EDA and EDB sequences and circulates at concentrations ranging from 230 to 650 µg/mL[8]. pFN can be incorporated into the vessel wall where it assembles in fibrils. cFN is synthesized by endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts and is present as insoluble fibrils in the extracellular matrix[9,10]. cFN contains the EDA and EDB sequences in variable proportions and is particularly highly expressed under conditions of atherosclerosis[11].

When pFN is immobilized on a surface, this glycoprotein supports modest levels of platelet adhesion under both static and flow conditions[12-14]. The interaction between platelets and pFN is known to depend on integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$[12,14] and on the GPIb-IX/VWF axis[13]. More recently, it was proposed that the collagen receptor GPVI also supports platelet adhesion through its binding to

pFN[15]. The role of dimeric pFN in platelet aggregation and thrombus formation remains controversial with numerous *in vitro* and *in vivo* studies reporting either prothrombotic[16-20] or antithrombotic properties[21-24]. To date, the thrombogenicity of the fibrillar forms of pFN and cFN, which are present in the vessel wall, remains largely unknown. The aim of this study was thus to characterize *in vitro* the ability of pFN and cFN, in their fibrillar conformations, to trigger different platelet functions.

We provide evidence that fibrillar, but not dimeric pFN and cFN efficiently support platelet adhesion under various flow conditions. Subsequently, while fibrillar cFN permits the formation of large thrombi composed of tightly packed platelets, only small aggregates form on fibrillar pFN. This could be explained by the lack of the EDA region in pFN, which is a binding site for TLR4, a receptor involved in thrombus growth on fibrillar cFN. Integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$, together with GPIb-IX and GPVI, also promote thrombus growth on this surface. In contrast, the initial step of platelet adhesion and activation on fibrillar cFN is only ensured by $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$. Finally, the platelets adhering to fibrillar cFN under flow become procoagulant, resulting in fibrin formation.

Materials and Methods

Materials

Paraformaldehyde (PFA) and glutaraldehyde were from Electron Microscopy Sciences (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Recombinant hirudin was from Transgene (Illkirch-Graffenstaden, France). Fatty acid-free human serum albumin (HSA), human cFN and bovine serum albumin (BSA) were from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Fluorsave reagent was from Millipore (Molsheim, France). 3,3'-dihexylcarbocyanine iodide ($DIOC_6$), DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), Alexa 568-conjugated annexin V and CellTrace Calcein green-AM were from Molecular Probes (Paisley, UK). The Ca^{2+} ionophore A23187 was from Calbiochem (La Jolla, California, USA) and acid citrate dextrose (ACD) solution from Bioluz (St-Jean-de-Luz, France). Human von Willebrand factor (VWF) and plasma fibronectin were isolated in our laboratory according to a previously described method[25,26]. AR-C69931MX (Cangrelor), a selective ADP receptor ($P2Y_{12}$) antagonist, was from the Medicines Co. (Parsippany, NJ), aspirin from Sanofi-Aventis (Paris, France) and the $P2Y_1$ antagonist MRS2500 from Tocris Cookson Inc. (Bristol, UK).

Antibodies and synthetic peptides

Azide-free blocking monoclonal antibodies were: anti-human integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Reopro; E. Lilly, Indianapolis, IN, USA), anti-human GPIbα (AK2; GeneTex, Euromedex, Souffelweyersheim, France), anti-human integrin β_1 (P5D2; Abcam, Cambridge, United Kingdom) anti-human integrin α_5 (P1D6; Abcam), anti-human integrin α_2 (BHA2.1; Millipore), anti-human integrin α_6 (GoH3; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and anti-human TLR4 (HTA125; eBioscience, Paris, France and 76B357.1; Imgenex, San Diego, California, United States). The 9O12 Fab fragment directed against human GPVI was a generous gift from Dr. M. Jandrot-Perrus (Inserm U698, Paris, France). Other antibodies used were: MOPC-21, a mouse IgG1 κ isotype control (Biolegend, San Diego, CA), a rat IgG1 isotype control (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and ab23750, a polyclonal rabbit anti-murine fibronectin antibody (Abcam). An Alexa 488-coupled goat anti-rabbit secondary antibody was from Molecular Probes (Paisley, UK) and mouse Fc fragment from Jackson

ImmunoResearch Laboratories (Baltimore, PA, USA). The anti-human GPIbα peptide OS-1 was synthesized by PolyPeptide Laboratories (Strasbourg, France). The Alexa 647-coupled anti-human fibrin antibody 59d8 was a generous gift from Dr. C. Dubois (Inserm, Marseille, France).

Mice

α_{IIb}-null ($\alpha_{IIb}^{-/-}$) mice have been previously described[27]. β_1-null ($\beta_1^{-/-}$) mice were kindly provided by Dr. R. Fässler (Max Planck Institute, Martinsried, Germany)[28] and GPVI-null (GPVI$^{-/-}$) mice by Dr. B. Nieswandt (University of Würzburg, Germany)[29]. 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 were carried out in conformity with the French legislation for animal experimentation and followed the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Methods

Immunohistofluorescence of mouse carotid arteries

Immunohistofluorescence experiments were adapted from Takaku[30]. Briefly, 8 week-old WT mice were anesthetized and the carotid artery was excised, opened in the longitudinal direction and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min. The carotid was incubated with a mouse Fc fragment (10 µg/mL) and normal goat serum (1/50) to prevent nonspecific antibody binding. The vessel was stained with a polyclonal rabbit anti-murine fibronectin antibody (ab23750, 10 µg/mL), washed in PBS (3 x 15 min) and further stained with an Alexa 488-coupled goat anti-rabbit secondary antibody (10 µg/mL) and DAPI (0.5 µg/mL). Immunostaining was examined under a Leica SP5 inverted confocal microscope (20x or 40x oil objective) using an argon laser (488 nm) and UV illumination (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Images were acquired and analyzed with LAS acquisition software (AF version 1.62, Leica Microsystems).

Preparation of microfluidic devices

Microfluidic devices were made from poly-(dimethylsiloxane) (PDMS) by standard soft lithography techniques [31]. An SU-8 Photoresist mould (MicroChemCorp., Newton, MA, USA) was formed on a 6-inch silicon wafer (Siltronix, Archamps, France) by UV exposure (MJB3 contact mask aligner; SUSSMicroTec, Garching, Germany) through a photolithography mask (SelbaSA, Versoix, Switzerland) using an SU-8 developer (MicroChemCorp.). Curing agent was mixed with the PDMS base (Sylgard 184 silicone elastomer kit; Dow Corning, Midland, MI, USA) to a final concentration of 10% (w/w) and the mixture was poured over the mould. After degassing for several minutes, the PDMS was cured at 90°C for about 15 min. The solidified PDMS was then removed from the wafer and holes were punched for the inlet and outlet of a perfusion chamber using a 0.75 mm diameter Harris Uni-Core biopsy punch (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Particles of PDMS were cleared from the ports with pressurized air and Scotch tape. The microfluidic device was attached to a 25 x 70 x 0.16 mm glass microscope coverslip (KnittelGlasser, Braunschweig, Germany) by exposure of both surfaces to an oxygen plasma (Plasma Femto RF UHP SN, Diener electronic, Ebhausen, Germany). We made a chamber containing rectangular channels of width 1 mm, height 0.1 mm and length 4 cm.

Characterization and *in vitro* mechanical stretching of fibronectins and flow-based experiments

Characterization of cFN and pFN by Western blotting (anti-FN antibody: ab23750; anti-EDA domain: ist9 (Abcam)) revealed that cFN, but not pFN, contained the EDA domain (data not shown). The purity of the proteins was confirmed by silver staining and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. The method of mechanical stretching of FN was adapted from a previously described technique[32]. Briefly, glass microcapillaries or microfluidic devices were coated with purified pFN or cFN (300 µg/mL) overnight at 4°C and blocked with phosphate buffered saline (PBS)-HSA (10 mg/mL) for 30 min at RT. Silicon tubes (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France) were connected to the inlet and outlet of each flow device. The inlet was then connected to a vacuum diaphragm pump (VWR International S.A.S) while the outlet was clamped. The pump was switched on and the clamp on the outlet tube was opened very slowly to apply a tensile force to the surface and allow the FN to multimerize through mechanical stretching. The fibers of the

fibronectin coat were examined by scanning electron microscopy (SEM) as previously described[33], or by differential interference contrast (DIC) or fluorescence microscopy after immunolabeling with ab23750 followed by a Cy3-coupled goat anti-rabbit secondary antibody (1 μg/mL). A Leica DMI 4000 B microscope (Leica Microsystems) was employed, with a Leica EL6000 fluorescent lamp and a 40x, 1.4 numerical aperture oil objective. Images were acquired with a Photometrics charge-coupled device (CCD) camera (CoolSNAP HQ Monochrome, Photometrics, Tucson, AZ, USA) and analyzed with ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Adhesion assays under flow were performed as previously described[34].

Measurement of the thrombus volume

Hirudinated (100 U/mL) mouse or human whole blood labeled with the fluorescent lipophilic dye $DiOC_6$ (1 μmol/L) was perfused through the flow devices at 37°C[35]. Platelet accumulation was observed under a Leica SP5 inverted confocal microscope using argon laser excitation (488 nm) and a 40x oil objective (Leica Microsystems). The light emitted from excited labeled platelets was filtered between 490 and 595 nm. Series of optical sections in xyz (z height) were taken from the base to the peak of the thrombi and the images were stacked and analyzed with ImageJ software (National Institute of Health) to determine the volume of the thrombi. 3D reconstructed images were obtained using Image surfer software (Center for Computer-Integrated Systems for Microscopy and Manipulation, Chapel Hill, NC).

SEM analysis of platelet shape change after adhesion of the cells to FN

Hirudinated (100 U/mL) whole blood was perfused for 5 min at 300 s^{-1} through glass microcapillaries coated with fibrillar cFN. The capillaries were then washed with PBS (Phosphate buffered saline) at 300 s^{-1} for 3 min and the adherent platelets were fixed with glutaraldhehyde (25 mg/mL) in cacodylate buffer (0.1 mol/L, pH 7.3) containing sucrose (20 mg/mL). Scanning electron microscopy (SEM) was performed as described elsewhere[33]. Platelet shape change 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.

Analysis of cytosolic Ca^{2+}

The platelet calcium flux was monitored as previously described[34]. In each experiment the Ca^{2+} signal of 20 platelets was analyzed.

Measurement of annexin V binding

Hirudinated (100 U/mL) whole blood was perfused for 35 min at 300 s^{-1} through glass microcapillaries coated with fibrillar cFN. After washing with PBS at 300 s^{-1} for 10 min, the capillaries were perfused with PBS containing Alexa 568-conjugated annexin V (1/10) for 10 min[36]. Activated annexin V-positive platelets were visualized by DIC or fluorescence microscopy under a Leica DMI 4000 B microscope (Leica Microsystems) using a Leica EL6000 fluorescent lamp and a 63x, 1.4 numerical aperture oil objective. Images were acquired with a Photometrics CCD camera (CoolSNAP HQ Monochrome).

Fibrin formation on fibrillar cFN under flow conditions

Citrated human blood labeled with CellTrace Calcein green-AM (10 µM) and recalcified with 7.5 mM calcium and 3.7 mM magnesium was perfused at 300 s^{-1} through flow devices coated with fibrillar cFN. Confocal microscopy was employed to detect fibrin formation using the Alexa 647-coupled anti-human fibrin antibody 59d8[37].

Statistical analyses

All values are reported as the mean±SEM unless otherwise indicated. Data were compared by the Mann-Whitney test. Differences were considered to be significant at $p<0.05$ and all tests were performed using Prism software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

RESULTS

Fibrillar cFN supports efficient thrombus formation under flow conditions

We first assessed the thrombogenic potential of pFN and cFN in their dimeric form and found that both FNs formed a very weak adhesive surface supporting only marginal platelet adhesion at 300 s^{-1} as compared to fibrinogen (Supplement figure 1A-B). However, it is well established that neither form of FN is dimeric in the vessel wall, but exists rather in a polymerized fibrillar conformation[38,39]. Consistent with these findings, epifluorescence images of a mouse carotid artery showed that FN was organized as a dense network within the vessel wall (Figure 1A). To assess the thrombogenic potential of the two fibrillar FNs, these glycoproteins were deposited on the walls of a flow chamber in their dimeric form and polymerized by inducing stretching of the layer through application of surface tension with a vacuum pump[40]. Observation of the flow channel by differential interference contrast (DIC), epifluorescence and scanning electron microscopy showed that both FNs formed a fibrillar network on the surface of the flow chamber (Figure 1B). Perfusion of hirudinated human whole blood at 300 s^{-1} through the flow channel led to efficient platelet adhesion on both protein networks (Figure 1C). At later stages, whereas large thrombi composed of tightly packed platelets formed on fibrillar cFN, its plasma counterpart was much less reactive and supported only the formation of small aggregates (Figure 1C-D). This observation was confirmed by confocal microscopy, which revealed an 87% larger thrombus volume on fibrillar cFN as compared to fibrillar pFN (Figure 1E). In view of this high reactivity of fibrillar cFN, we next investigated the impact of rheology on the thrombogenicity of this glycoprotein.

Importance of the wall shear rate in thrombus formation on fibrillar cFN

The velocity of the blood flow varies extensively across the vasculature with wall shear rates being low in the veins (<200 s^{-1}), intermediate in large arteries (300-800 s^{-1}) and elevated in arterioles and in the microcirculation (500-1,600 s^{-1})[41]. We therefore determined the range of wall shear rates in which fibrillar cFN supports thrombus formation. Three dimensional (3D) reconstructed confocal images showed that numerous small, mostly round-shaped thrombi formed at 150 s^{-1} (Figure 2A). The thrombi

became voluminous at 300 and 500 s^{-1}, while mainly individual adherent platelets and small elongated aggregates were observed at 750 s^{-1}. Maximal thrombus volumes were attained at 300 s^{-1} (12±1.0 x 10^5 μm^3) and 500 s^{-1} (12.8±1.0 x 10^5 μm^3), whereas almost no thrombi formed above 1,000 s^{-1} (0.9±0.4 x 10^5 μm^3) (Figure 2B). These results indicated that fibrillar cFN supports thrombus formation under rheological conditions ranging from 150 s^{-1} to 750 s^{-1}, found in veins, arteries and in the post-stenotic areas of atherosclerotic plaques

Integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ ensure the initial phase of platelet adhesion to fibrillar cFN

To obtain insight into the mechanism of thrombus formation on fibrillar cFN, we first attempted to identify the receptors involved in the initial platelet adhesion. Blocking antibodies against the α_5 or β_1 subunits reduced by 78±4% (n=8, p=0.047) and 67±7% (n=8, p=0.029) respectively the number of human platelets adhering to fibrillar cFN during the first three minutes of flow (300 s^{-1}) (Figure 3A). Blocking integrin α_2 or α_6 did not affect adhesion to the FN surface (Figure 3B-C). ReoPro, which targets $\alpha_{IIb}\beta_3$, decreased platelet adhesion by 61±12% (n=11, p=0.038) (Figure 3D). A combination of anti-β_1 and anti-β_3 blocking antibodies further reduced adhesion, suggesting complementary roles of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Figure 3E). AK2, a mAb against GPIbα, did not significantly reduce adhesion, indicating a minor role of this receptor (Figure 3F). Blockade or absence of GPVI, which has been reported to bind dimeric pFN[15], did not decrease adhesion of human or mouse platelets (Figure 3G-H). Altogether, these results suggested that integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ cooperate to ensure platelet adhesion to fibrillar cFN under flow conditions.

Investigation of platelet activation on fibrillar cFN and identification of the receptors involved

To determine whether fibrillar cFN could promote platelet activation, the morphological changes of adherent human platelets were studied, as a readout for activation, following their perfusion at 300 s^{-1} over the protein surface. Scanning electron microscopy images showed that the vast majority of adherent platelets became spherical and extended filopodia (Figure 4A-B). As calcium mobilization is required for this process, the degree of platelet activation was further evaluated using a dual-dye calcium assay. Most of the human platelets attaching to fibrillar cFN exhibited an increase in

intracellular calcium levels, with an average maximal concentration of about 419±29 nmol/L at 300 s^{-1}, as compared to 45±4 nmol/L (n=3, p<0.0001) for resting platelets settling on HSA (Figure 4C). Taken individually, these platelets displayed a sequence of repeated calcium spikes (Figure 4D). Blocking human integrin β_3, β_1 or α_5 reduced the maximal increase in intracellular calcium by 59% (n=6, p<0.0001), 56% (n=5, p<0.0001) and 54% (n=3, p<0.0001) respectively, as compared to the control, suggesting that $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ cooperate in initiating platelet activation on fibrillar cFN (Figure 4E). Moreover, treating human platelets with aspirin in combination with the $P2Y_1$ and $P2Y_{12}$ antagonists MRS2500 and ARC69931MX strongly reduced calcium signaling (by 46±8%; n=3, p=0.0006), highlighting an important role of the soluble agonists thromboxane A2 (TxA2) and ADP (Figure 4F). In contrast, blockade of GPVI with 9O12 or absence of this receptor in $GPVI^{-/-}$ platelets did not prevent calcium signaling (n=4, p=0.280; n=3, p=0.640, respectively), further indicating that GPVI is not a receptor for fibrillar cFN (Figure 4G-H).

Integrin $\alpha_5\beta_1$, but not integrin $\alpha_2\beta_1$ or $\alpha_6\beta_1$, is important for *in vitro* thrombus formation on fibrillar cFN

Once human or mouse platelets had adhered to fibrillar cFN and become activated, they progressively aggregated and formed large thrombi (Figure 1C). Integrin $\alpha_5\beta_1$ had been found to ensure the initial phase of platelet adhesion and activation on fibrillar cFN. To evaluate its role in thrombus growth, the aggregate volumes were measured by confocal microscopy after 30 minutes of blood perfusion at 300 s^{-1}. Blockade of human integrin β_1 reduced the thrombus volume by 58±4% as compared to the control (n=3, p<0.0001) (Figure 5A). Stronger inhibition was observed when perfusing blood from $\beta_1^{-/-}$ mice, with a 96±4% reduction in thrombus volume with respect to the control (n=3, p<0.0001) (Figure 5B). Use of further blocking antibodies revealed that human integrin $\alpha_5\beta_1$ (n=3, p=0.0001), but not integrin $\alpha_2\beta_1$ (n=5, p=0.130) or $\alpha_6\beta_1$ (n=6, p=0.231), played a critical role in thrombus growth (Figure 5C-E).

Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, the GPIb-IX complex and GPVI play key roles in *in vitro* thrombus growth on fibrillar cFN

Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, but not the GPIb-IX complex or GPVI, was found to be involved in platelet adhesion to cFN (Figure 3). ReoPro reduced the thrombus volume by 79±2% with respect to the control (n=3, p<0.0001) (Figure 6A). Similarly, there was a marked reduction in thrombus formation when perfusing blood from $\alpha_{IIb}^{-/-}$ as compared to WT mice (n=3, p<0.0001), confirming the key role of $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Figure 6B). To assess the involvement of the GPIb-IX complex, flow experiments were performed at 300 s^{-1} and 500 s^{-1}. The OS-1 peptide, which targets the VWF binding site on human GPIbα, decreased the thrombus volume by 34±2% (n=3, p=0.039) and 70±1% (n=3, p=0.0003) at 300 s^{-1} and 500 s^{-1}, respectively, as compared to a scrambled peptide (Figure 6C). AK2, which did not prevent platelet adhesion, reduced the thrombus volume by 46±7% (n=3, p=0.0007) and 92±1% (n=3, p=0.0002) at 300 s^{-1} and 500 s^{-1}, respectively (Figure 6D), confirming the role of GPIbα in thrombus growth as evidenced by its ability to recruit circulating platelets through its interaction with VWF immobilized at the surface of platelet thrombi[42]. Similarly, the anti-human GPVI agent 9O12, which had no effect on platelet adhesion or activation on cFN, dramatically decreased thrombus growth as compared to a Fab control (88±1% reduction; n=5, p<0.0001) (Figure 6E). This result was confirmed in $GPVI^{-/-}$ mice, with a 95±1% reduction in thrombus volume with respect to WT animals (n=3, p<0.0001), highlighting an unexpected role of GPVI in the process of platelet/platelet interaction (Figure 6F).

TLR4, an EDA binding receptor, supports thrombus growth on fibrillar cFN, but not on fibrillar pFN

The striking difference of thrombogenicity between the two forms of fibrillar FNs (Figure 1), could have its origin in the inclusion of few alternatively spliced regions in cFN. We hypothesized that the EDA region, a known ligand of TLR4, could explain the differences, since this receptor is expressed at the platelet surface. Blockade of TLR4 with two distinct anti-TLR4 antibodies reduced the thrombus volume by 69±3% (n=8, p<0.0001) and 67±2% (n=3, p<0.0001) on fibrillar cFN, highlighting a novel role for this receptor in thrombus growth (Figure 6G). Conversely they did not significantly reduce the volume of the thrombi formed on fibrillar pFN, which lacks EDA (n=5, p>0.05) (Figure 6G). Moreover, anti- TLR4 antibodies did not prevent thrombus growth on collagen indicating specificity

towards FN (data not shown). Blockade of TLR4 did not directly affect recruitment of individual platelets to fibrillar cFN (n=6, p>0.05) (Supplement figure 2), but impaired the initial phase of thrombus growth as evidenced by the reduced slope of platelet accumulation in the presence of an anti-TLR4 antibody (Figure 6 H-I). Altogether, these findings indicated that thrombus growth on fibrillar cFN is controlled by a number of different receptors including integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, the GPIb-IX complex, GPVI and TLR4.

Role of fibrillar cFN in regulating the procoagulant activity of platelets and fibrin formation

Platelets adhering to collagen expose phosphatidylserine at their surface and become procoagulant [43]. We assessed the procoagulant potential of fibrillar cFN by monitoring annexin-V binding. Epifluorescence images showed that many of the human platelets adhering to this surface at 300 s^{-1} became positive for annexin-V (Figure 7A). Such cells were mainly observed at the periphery of aggregates and exhibited the typical smooth, round-shaped morphology of SCIP or COAT platelets [36,43]. Under these conditions, fibrin fibers were observed attached to the back of the thrombi and elongating downstream (Figure 7B). These results provide evidence that fibrillar cFN promotes platelet procoagulant activity, resulting in fibrin formation.

DISCUSSION

The main finding of this study is that fibrillar cFN represents a potent thrombogenic component of the subendothelium. cFN supports efficient platelet adhesion and activation under arterial flow conditions, which results in thrombus formation and platelet procoagulant activity. The initial phase of platelet adhesion and activation is mediated by integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$. These integrins, together with the GPIb-IX complex, GPVI and TLR4, also contribute to subsequent platelet aggregation and thrombus growth.

The adhesive proteins of the vessel wall are commonly subdivided into two groups according to their reactivity. To date, only fibrillar collagens have been considered to be highly thrombogenic. On the other hand, VWF, fibrinogen, laminins, thrombospondins and pFN are considered to be weakly reactive, allowing only single platelet adhesion[12,44-46]. Our data provide evidence that cFN in its fibrillar form is also thrombogenic. This is probably a consequence of its fibrillar structure, since it supported only marginal platelet adhesion in its dimeric form. The importance of the multimeric structure of certain platelet ligands for their reactivity has been well described for collagens, IgGs, venom proteins and even synthetic peptides such as CRP[47-49]. One explanation for this higher reactivity of the fibrillar form is that multimerization enhances the avidity of the ligands, providing stronger platelet interaction and recruitment of signaling partners.

Interestingly, pFN in its fibrillar form was much less reactive than fibrillar cFN. Since this difference in reactivity does not appear to be due to the structure or the number of fibers formed, which are very similar in both types of FN, we hypothesized that the difference could lie at the molecular level, in the nature of the glycoproteins themselves. cFN differs from pFN by the inclusion of alternatively spliced EDA and EDB domains and the type III homology connecting segment. The EDA and EDB domains contain integrin β_1 binding motifs, but they do not interact with $\alpha_5\beta_1$, the only β_1 integrin supporting platelet adhesion to FN[7], and can therefore not account for the increased adhesion. In contrast, blockade of TLR4, which binds to EDA, significantly reduced thrombus formation on fibrillar cFN, suggesting that this receptor can at least in part, explain the differences in

thrombogenicity between fibrillar cFN and pFN[50,51]. The TLR4/EDA effect is further supported by the fact that TLR4 blocking mAbs do not reduce thrombus growth on fibrillar pFN and on collagen. These results highlight a novel role for TLR4 in thrombus growth, independent of its known ability to modulate platelet-dependent immune responses in conditions of infection and sepsis such as promotion of procoagulant activity[52-55].

Our results indicate that platelets only marginally adhere to dimeric pFN, which contrasts with several reports in the literature[12,13,15,56]. The reason for this discrepancy is unclear but could arise from differences in experimental conditions, notably in the method used to coat surfaces with FN. Some groups employed a spray-based technique, which could promote a certain degree of polymerization, thereby increasing the reactivity of the protein[12,13]. Similarly as in these latter studies, we found that initial platelet adhesion to fibrillar cFN depended on integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$. Conversely, the GPIb-IX complex did not seem to be required for platelet tethering to fibrillar cFN[13]. This could be explained by a higher affinity and/or avidity of integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ for fibrillar cFN, which might hide a potential role of GPIb. A second difference in the mechanism of platelet interaction with pFN as compared to fibrillar cFN lies in the importance of GPVI. Whereas Bultmann and co-workers reported an important role of GPVI in platelet adhesion to pFN under flow conditions[15], our data indicated that this receptor was not necessary for adhesion to fibrillar cFN. Interestingly, we found that GPVI was essential for thrombus growth on fibrillar cFN. This finding is in agreement with a previous *in vivo* observation showing that GPVI-deficient mice exhibit a defect during the later stages of thrombus growth rather than in the initial step[29]. Further studies will be needed to precisely define the role of GPVI in platelet-platelet interaction during thrombus growth and identify its counter receptor or the plasma protein involved in this process.

Once they had adhered to fibrillar cFN, platelets became activated as evidenced by their cytoskeletal reorganization and a rise in intracellular calcium levels. The calcium increases in platelets reached values recorded for other adhesive proteins such as fibrinogen, laminins and tenascin-C[34,57]. These signals were mediated by integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ but did not require GPVI. Since our experiments were performed in the absence of plasma VWF, the role of GPIb-IX was not assessed.

Whether GPIb, which induces a calcium signal after VWF binding[33], could cooperate and/or synergize with $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ to enhance the calcium responses of platelets adherent to fibrillar cFN will need to be further investigated. Finally, blockade of ADP and TxA2 strongly inhibited calcium signals, suggesting that $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ activate intracellular pathways leading to the amplification of cFN-induced calcium responses through release of these two agonists.

Thrombus growth on fibrillar cFN was efficient at wall shear rates between 300 s^{-1} and 500 s^{-1}, as can be found in large arteries like the carotid or coronary vessels, or in the post-stenotic region of advanced atherosclerotic plaques where recirculation occurs[58]. Therefore, one may hypothesize that exposure of cFN to flowing blood is likely to contribute to the hemostatic response under normal conditions, and to the growth of a thrombus in a pathological setting. To date, only fibrillar collagens have been described to promote such a range of platelet responses. Histological studies nevertheless indicated that fibrillar collagens are mainly located in the deeper layers of the vessel wall and would be exposed exclusively after severe damage[59]. More superficial layers contain non fibrillar collagens like type IV collagen, but the reactivity of these molecules is relatively low[56,60]. cFN is found in all layers of the vessel wall, which also contain FN derived from plasma[61], and both are in a reactive fibrillar form[61,62]. FNs therefore represent interesting alternative matrices for the efficient adhesion and activation of platelets after a superficial injury and the formation of a hemostatic plug. A role of FN in arterial thrombosis after plaque erosion or rupture is also highly probable in view of its strong expression in atherosclerotic plaques[63].

In conclusion, this study provides evidence that the fibrillar cFN present in the vessel wall is a thrombogenic matrix promoting a range of platelet responses including adhesion, activation, release of soluble agonists, aggregation and procoagulant activity. Hence its exposure to blood after injury of the vessel wall is likely to contribute to hemostasis, thereby helping to prevent blood loss, but also to the thrombotic process after erosion or rupture of an atherosclerotic plaque.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

PHM conceived and designed the research, interpreted the data, wrote the manuscript and handled funding and supervision. CG interpreted the data, contributed to writing the manuscript and handled funding and supervision. FL contributed to writing the manuscript. EM conceived and designed the research, acquired, analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript. AB, CB, NR and MS acquired, analyzed and interpreted the data. BN, CD and MJP provided essential tools.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Simone Schuhler, Catherine Ravanat, Fabienne Proamer and Jean-Yves Rinckel for technical assistance, Monique Freund for animal care and Juliette Mulvihill (Salzburg, Austria) for reviewing the English of the manuscript. This work was supported by INSERM, EFS, ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique), the Fondation de France (grant 2011-00020448) and a European FP7 grant (PRESTIGE 260309). Mathieu Schaff was supported by a "Contrat doctoral" from the French government and Eric Maurer by an "INSERM-Région Alsace" fellowship.

DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

None

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Fibrillar FN supports efficient platelet adhesion and thrombus formation. A, Representative confocal immunofluorescence image of a WT mouse carotid stained with an anti-fibronectin antibody (green) and nuclear DAPI (red). Scale bar 50 µm. **B**, Representative DIC (top), epifluorescence (middle) and scanning electron (bottom) microscopy images of pFN or cFN coated on the inside of flow devices and made fibrillar by application of surface tension with a vacuum pump. The fibers were stained with an anti-FN antibody followed by a Cy3-coupled goat anti-rabbit secondary antibody (green). The white arrows indicate the flow direction. For DIC, epifluorescence and scanning electron microscopy the scale bars represent 40 µm, 40 µm and 2 µm, respectively. **C-E**, Hirudinated human whole blood was perfused at 300 s^{-1} over fibrillar pFN (300 µg/mL) or fibrillar cFN (300 µg/mL). **C**, Representative DIC microscopy images depicting platelet accumulation on fibrillar pFN or fibrillar cFN after 30 min of blood perfusion. The black arrow indicates the flow direction. Scale bar 20 µm. **D**, Left: representative scanning electron microscopy image showing the thrombi formed on fibrillar cFN (1,250x). Right: closer view of a thrombus containing tightly packed platelets (4,000x). Scale bars 10 µm. **E**, Bar graphs represent the total volume of the platelet thrombi after 30 min of perfusion as measured by confocal microscopy. The thrombus volumes are the mean ±SEM in 8 random fields, in 5 separate experiments performed with different blood donors (***P<0.0001).

Figure 2: Shear-dependent thrombus formation on fibrillar cFN. A-B, Hirudinated human blood incubated with the fluorescent dye $DIOC_6$ (1 µmol/L) was perfused for 30 min over fibrillar cFN (300 µg/mL) at various wall shear rates. **A,** Representative 3D reconstructions from confocal images of platelet thrombi obtained after 30 min of blood perfusion at 150, 300, 500 and 750 s^{-1}. **B,** Bar graphs represent the volume of the platelet thrombi as a function of the wall shear rate (mean ±SEM in 8 random fields, in 6 separate experiments performed with different blood donors).

Figure 3: Integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ ensure the initial phase of platelet adhesion to fibrillar cFN. **A-G**, Hirudinated human blood was pretreated with blocking antibodies against integrin β_1 (anti-β_1: 10 µg/mL) (**A**), integrin α_5 (anti-α_5: 10 µg/mL) (**A**), integrin α_2 (anti-α_2: 10 µg/mL) (**B**), integrin α_6 (anti-α_6: 10 µg/mL) (**C**), integrin β_3 (anti-β_3: 40 µg/mL) (**D**), integrins β_1 and β_3 (anti-β_1 + anti-β_3: 10 µg/mL and 40 µg/mL, respectively) (**E**), GPIbα (anti-GPIbα: 10 µg/mL) (**F**) or GPVI (anti-GPVI: 50 µg/mL) (**G**), or with irrelevant mouse IgG (Control: 10 µg/mL) (**A-F**) or Fab fragments (Control) (50 µg/mL) (**G**) and perfused through flow chambers coated with fibrillar cFN at 300 s^{-1}. **H**, Hirudinated blood from WT (WT) or GPVI-null ($GPVI^{-/-}$) mice was perfused over fibrillar cFN at 300 s^{-1}. **A-H**, Platelet adhesion was visualized in real time in one random field by DIC microscopy and the number of adherent platelets was calculated over a 3 min period. Data are the mean ± SEM in 5-12 separate experiments (**P*<0.05; ***P*<0.01 and ns: *P*>0.05).

Figure 4: Platelet adhesion to fibrillar cFN leads to morphological changes and an increase in intracellular calcium levels. **A-B**, Hirudinated human whole blood was perfused over fibrillar cFN at 300 s^{-1} for 5 min. The flow chambers were washed for 3 min with PBS and the adherent platelets were fixed and examined by scanning electron microscopy. **A**, Representative scanning electron microscopy image. Scale bars 5 µm. **B**, The number of platelets extending 0, 1, 2, 3, 4 or >5 filopodia was counted in at least ten fields and expressed as the percentage of the total adherent cells. Results are the mean ± SEM in 3 independent experiments. **C-H**, Washed platelets loaded with Oregon-green BAPTA-AM and Calcein red orange were reconstituted with 50% (vol/vol) autologous washed red blood cells at a final concentration of 250 x 10^6 platelets/mL and perfused over fibrillar cFN at 300 s^{-1}. The changes in fluorescence of individual adherent platelets were monitored for 5 min by confocal microscopy and Ca^{2+} concentrations were determined. **C**, **E-H**, Dot plot distributions of the maximal increase in cytosolic intracellular Ca^{2+} concentration in individual platelets adhering to fibrillar cFN. **C-D**, HSA refers to washed platelets allowed to adhere to coverslips coated with non-reactive HSA (10 mg/mL). **D**, Typical time-course Ca^{2+} profile of one representative platelet adhering to fibrillar cFN or deposited on HSA. Experiments were performed in the presence of blocking antibodies against integrins β_3 (anti-

β_3: 40 µg/mL), β_1 (anti-β_1: 10 µg/mL) and α_5 (anti-α_5: 10 µg/mL) (**E**), a combination of aspirin (1 mmol/L), MRS2500 (10 µmol/L) and ARC69931MX (10 µmol/L) (**F**) or an antibody blocking GPVI (anti-GPVI: 50 µg/mL) (**G**). Controls corresponded to an irrelevant mouse IgG (Control: 10 µg/mL) (**E**) or to saline (**F**) or Fab fragments (Control: 50 µg/mL) (**G**). **H**, Dot plot distribution of the maximal increase in cytosolic Ca^{2+} in individual platelets from WT or GPVI-null ($GPVI^{-/-}$) mice. The results are presented as the mean ± SEM in 3 to 5 independent experiments for each condition (***P<0.0001 and ns: P>0.05).

Figure 5: Integrin $\alpha_5\beta_1$ mediates thrombus growth on fibrillar cFN. A, C-E, Hirudinated human whole blood incubated with $DIOC_6$ (1 µmol/L) was pretreated with blocking antibodies (10 µg/mL) against integrin β_1 (anti-β_1) (**A**), integrin α_2 (anti-α_2) (**C**), integrin α_5 (anti-α_5) (**D**) integrin α_6 (anti-α_6) (**E**) or with an irrelevant mouse IgG (Control: 10 µg/mL) (**A, C-E**) and perfused through flow devices coated with fibrillar cFN (300 µg/mL) at 300 s^{-1} for 30 min. **B**, Hirudinated whole blood from WT or β_1-null ($\beta_1^{-/-}$) mice labeled with $DIOC_6$ (1 µmol/L) was perfused through microcapillaries coated with fibrillar cFN (300 µg/mL) at 300 s^{-1} for 15 min. **A-E**, Bar graphs represent the total volume of the platelet thrombi as measured by confocal microscopy. The thrombus volumes are the mean ±SEM in 8 random fields, in 3 to 4 separate experiments (***P<0.0001 and ns: P>0.05).

Figure 6: Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, the GPIb-IX complex, GPVI and TLR4 mediate thrombus growth on fibrillar cFN. A, C-E, G-I, Hirudinated human whole blood incubated with $DIOC_6$ (1 µmol/L) was perfused through flow devices coated with fibrillar cFN (300 µg/mL) or fibrillar pFN (300 µg/mL) at 300 or 500 s^{-1} for 30 min, after pretreatment with an integrin β_3 blocker (anti-β_3: 40 µg/mL) (**A**), the anti-human GPIbα peptide OS-1 (500 nM) (**C**), an anti-human GPIbα antibody (anti-GPIbα: 10 µg/mL) (**D**), the anti-human GPVI antibody (anti-GPVI: 50 µg/mL) (**E**) or with a two distinct TLR4 blocking antibodies (Anti-TLR4: 10 µg/mL) (**G-I**). Controls were performed with saline (**A**), a scrambled peptide (Scramble: 500 nM) (**C**) or an irrelevant mouse IgG (Control or Ctl: 10 µg/mL) (**D, G-I**) or a Fab fragments (Control: 50 µg/mL) (**E**). **B, F,** Hirudinated whole blood from WT, α_{IIb}-null ($\alpha_{IIb}^{-/-}$) (**B**) or GPVI-null ($GPVI^{-/-}$) (**F**) mice incubated with $DIOC_6$ (1 µmol/L) was perfused over

fibrillar cFN (300 µg/mL) at 300 s^{-1} for 15 min. **A-G, I,** Bar graphs represent the total volume of the platelet thrombi as measured by confocal microscopy. The thrombus volumes are the mean ±SEM in 8 random fields, in 3 to 5 separate experiments (**P*<0.05; ****P*<0.0001 and ns: *P*>0.05). **H**, Representative curves and slopes of the thrombus volume measured in real time in one random field by confocal microscopy. **I**, Bar graphs represent the mean slope (±SEM) of platelet accumulation in one random field, in 3 separate experiments (**P*<0.05).

Figure 7: Fibrillar cFN supports the procoagulant activity of platelets and fibrin formation. A, Hirudinated human whole blood was perfused over fibrillar cFN at 300 s^{-1} for 30 min. The flow devices were rinsed with PBS for 10 min and perfused with Alexa 568-conjugated annexin-V (1/10) for 10 min at 300 s^{-1}. Procoagulant platelets were detected by their annexin-V positivity (green platelets) using epifluorescence microscopy. **B**, Recalcified citrated human whole blood loaded with Calcein green-AM (10 µM) was perfused over fibrillar cFN at 300 s^{-1}, in the presence of the specific Alexa 647-coupled anti human fibrin antibody 59d8 (5 µg/mL). Representative confocal microscopy images depicting platelet accumulation (green) and fibrin formation (red) on fibrillar cFN after 30 s and 240 s of blood perfusion. **A-B**, Images are representative of at least 3 independent experiments and the white arrows indicate the flow direction. Scale bar 10 µm.

Supplementary figure 1: Dimeric pFN and cFN are weak adhesive proteins. A-B, Hirudinated human whole blood was perfused at various wall shear rates over FGN (300 µg/mL), dimeric pFN (300 µg/mL) or dimeric cFN (300 µg/mL). Platelet adhesion was observed in real time using DIC microscopy. **A,** Representative DIC microscopy images illustrating platelets adhering to FGN, dimeric pFN and dimeric cFN after 3 min of perfusion at 300 s^{-1}. The white and the black arrows indicate respectively the direction of blood flow and the adherent platelets. Scale bar 10 µm. **B,** The total number of adherent platelets was counted in one random field after 3 min of perfusion and was expressed as a function of the wall shear rate. The results are presented as the mean ± SEM in 3 independent experiments for each condition.

Supplementary figure 2: Blockade of TLR4 did not reduce platelet adhesion to fibrillar cFN. Hirudinated human blood was pretreated with a blocking antibody against TLR4 (anti-TLR4: 10 µg/mL) or with an irrelevant mouse IgG (Control: 10 µg/mL) was perfused through flow chambers coated with fibrillar cFN at 300 s^{-1}. The results are presented as the mean ± SEM in 10 independent experiments for each condition (ns: P>0.05).

REFERENCES

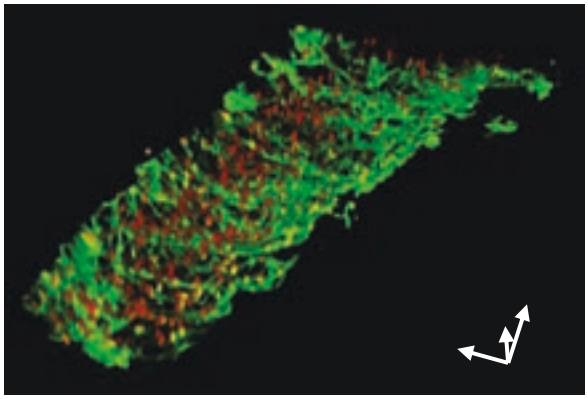
1. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013;93(1):327-358.
2. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011;17(11):1423-1436.
3. Bergmeier W, Hynes RO. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(2).
4. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 20):3861-3863.
5. George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*. 1993;119(4):1079-1091.
6. Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol*. 2010;87(6):989-999.
7. Liao YF, Gotwals PJ, Koteliansky VE, Sheppard D, Van De Water L. The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1 providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. *J Biol Chem*. 2002;277(17):14467-14474.
8. Zerlauth G, Wolf G. Plasma fibronectin as a marker for cancer and other diseases. *Am J Med*. 1984;77(4):685-689.
9. Peters JH, Sporn LA, Ginsberg MH, Wagner DD. Human endothelial cells synthesize, process, and secrete fibronectin molecules bearing an alternatively spliced type III homology (ED1). *Blood*. 1990;75(9):1801-1808.
10. Glukhova MA, Frid MG, Shekhonin BV, et al. Expression of extra domain A fibronectin sequence in vascular smooth muscle cells is phenotype dependent. *J Cell Biol*. 1989;109(1):357-366.
11. van Keulen JK, de Kleijn DP, Nijhuis MM, et al. Levels of extra domain A containing fibronectin in human atherosclerotic plaques are associated with a stable plaque phenotype. *Atherosclerosis*. 2007;195(1):e83-91.
12. Beumer S, MJ IJ, de Groot PG, Sixma JJ. 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*. 1994;84(11):3724-3733.
13. Beumer S, Heijnen HF, MJ IJ, Orlando E, de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion to fibronectin in flow: the importance of von Willebrand factor and glycoprotein Ib. *Blood*. 1995;86(9):3452-3460.
14. McCarty OJ, Zhao Y, Andrew N, et al. Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion. *J Thromb Haemost*. 2004;2(10):1823-1833.
15. Bultmann A, Li Z, Wagner S, et al. Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis--a possible role of fibronectin. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49(3):532-542.
16. Bastida E, Escolar G, Ordinas A, Sixma JJ. Fibronectin is required for platelet adhesion and for thrombus formation on subendothelium and collagen surfaces. *Blood*. 1987;70(5):1437-1442.
17. Nievelstein PF, D'Alessio PA, Sixma JJ. Fibronectin in platelet adhesion to human collagen types I and III. Use of nonfibrillar and fibrillar collagen in flowing blood studies. *Arteriosclerosis*. 1988;8(2):200-206.
18. Cho J, Mosher DF. Enhancement of thrombogenesis by plasma fibronectin cross-linked to fibrin and assembled in platelet thrombi. *Blood*. 2006;107(9):3555-3563.
19. Ni H, Yuen PS, Papalia JM, et al. Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2415-2419.
20. Matuskova J, Chauhan AK, Cambien B, et al. Decreased plasma fibronectin leads to delayed thrombus growth in injured arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(6):1391-1396.
21. Santoro SA. Inhibition of platelet aggregation by fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;116(1):135-140.
22. Moon DG, Kaplan JE, Mazurkewicz JE. The inhibitory effect of plasma fibronectin on collagen-induced platelet aggregation. *Blood*. 1986;67(2):450-457.
23. Tanabe J, Fujita H, Iwamatsu A, Mohri H, Ohkubo T. Fibronectin inhibits platelet aggregation independently of RGD sequence. *J Biol Chem*. 1993;268(36):27143-27147.

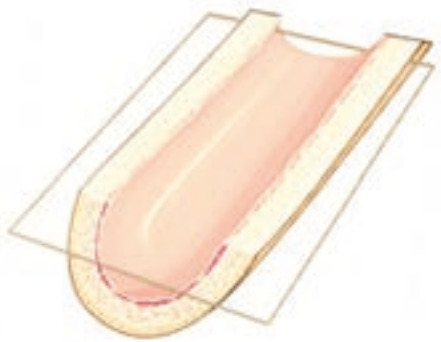
24. Reheman A, Yang H, Zhu G, et al. Plasma fibronectin depletion enhances platelet aggregation and thrombus formation in mice lacking fibrinogen and von Willebrand factor. *Blood*. 2009;113(8):1809-1817.
25. Chopek MW, Girma JP, Fujikawa K, Davie EW, Titani K. Human von Willebrand factor: a multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry*. 1986;25(11):3146-3155.
26. Miekka SI, Ingham KC, Menache D. Rapid methods for isolation of human plasma fibronectin. *Thromb Res*. 1982;27(1):1-14.
27. Tronik-Le Roux D, Roullot V, Schweitzer A, Berthier R, Marguerie G. Suppression of erythro-megakaryocytopoiesis and the induction of reversible thrombocytopenia in mice transgenic for the thymidine kinase gene targeted by the platelet glycoprotein alpha IIb promoter. *J Exp Med*. 1995;181(6):2141-2151.
28. Fassler R, Meyer M. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev*. 1995;9(15):1896-1908.
29. Bender M, Hagedorn I, Nieswandt B. Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl(3) -induced thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011;9(7):1423-1426.
30. Takaku T, Malide D, Chen J, Calado RT, Kajigaya S, Young NS. Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy. *Blood*. 2010;116(15):e41-55.
31. McDonald JC, Duffy DC, Anderson JR, et al. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*. 2000;21(1):27-40.
32. Steward RL, Jr., Cheng CM, Ye JD, Bellin RM, LeDuc PR. Mechanical stretch and shear flow induced reorganization and recruitment of fibronectin in fibroblasts. *Sci Rep*. 2011;1:147.
33. 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(35):32880-32891.
34. 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(1):117-124.
35. Maurer E, Tang C, Schaff M, et al. Targeting Platelet GPIbbeta Reduces Platelet Adhesion, GPIb Signaling, and Thrombin Generation and Prevents Arterial Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013.
36. Kulkarni S, Jackson SP. Platelet factor XIII and calpain negatively regulate integrin alphaIIbbeta3 adhesive function and thrombus growth. *J Biol Chem*. 2004;279(29):30697-30706.
37. Hui KY, Haber E, Matsueda GR. Monoclonal antibodies to a synthetic fibrin-like peptide bind to human fibrin but not fibrinogen. *Science*. 1983;222(4628):1129-1132.
38. Hocking DC, Titus PA, Sumagin R, Sarelius IH. Extracellular matrix fibronectin mechanically couples skeletal muscle contraction with local vasodilation. *Circ Res*. 2008;102(3):372-379.
39. To WS, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011;4:21.
40. Lemmon CA, Chen CS, Romer LH. Cell traction forces direct fibronectin matrix assembly. *Biophys J*. 2009;96(2):729-738.
41. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood*. 1996;88(5):1525-1541.
42. Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, et al. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest*. 2000;105(6):783-791.
43. Heemskerk JW, Vuist WM, Feijge MA, Reutelingsperger CP, Lindhout T. Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca2+ responses. *Blood*. 1997;90(7):2615-2625.
44. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996;84(2):289-297.
45. Schaff M, Tang C, Maurer E, et al. Integrin alpha6beta1 is the Main Receptor for Vascular Laminins and Plays a Role in Platelet Adhesion, Activation and Arterial Thrombosis. *Circulation*. 2013.

46. Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, et al. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *FASEB J*. 2003;17(11):1490-1492.
47. Savage B, Ginsberg MH, Ruggeri ZM. Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow. *Blood*. 1999;94(8):2704-2715.
48. Morton LF, Peachey AR, Zijenah LS, Goodall AH, Humphries MJ, Barnes MJ. 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*. 1994;299 (Pt 3):791-797.
49. Luo Y, Lu Z, Raso SW, Entrican C, Tangarone B. Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher in vitro binding affinities to Fcgamma receptors. *MAbs*. 2009;1(5):491-504.
50. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001;276(13):10229-10233.
51. Zhang G, Han J, Welch EJ, et al. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol*. 2009;182(12):7997-8004.
52. Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, et al. Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol*. 2012;145(3):189-200.
53. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol*. 2005;83(2):196-198.
54. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, et al. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*. 2011;118(7):1952-1961.
55. Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1beta autocrine loop. *J Immunol*. 2013;191(10):5196-5203.
56. Polanowska-Grabowska R, Simon CG, Jr., Gear AR. Platelet adhesion to collagen type I, collagen type IV, von Willebrand factor, fibronectin, laminin and fibrinogen: rapid kinetics under shear. *Thromb Haemost*. 1999;81(1):118-123.
57. Schaff M, Tang C, Maurer E, et al. Integrin alpha6beta1 is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation*. 2013;128(5):541-552.
58. Nesbitt WS, Westein E, Tovar-Lopez FJ, et al. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation. *Nat Med*. 2009;15(6):665-673.
59. Farquharson C, Robins SP. Immunolocalization of collagen types I and III in the arterial wall of the rat. *Histochem J*. 1989;21(3):172-178.
60. Parsons TJ, Haycraft DL, Hoak JC, Sage H. Interaction of platelets and purified collagens in a laminar flow model. *Thromb Res*. 1986;43(4):435-443.
61. Moretti FA, Chauhan AK, Iaconcig A, Porro F, Baralle FE, Muro AF. A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J Biol Chem*. 2007;282(38):28057-28062.
62. Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010;26:397-419.
63. Matter CM, Schuler PK, Alessi P, et al. Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin. *Circ Res*. 2004;95(12):1225-1233.

Figure 1

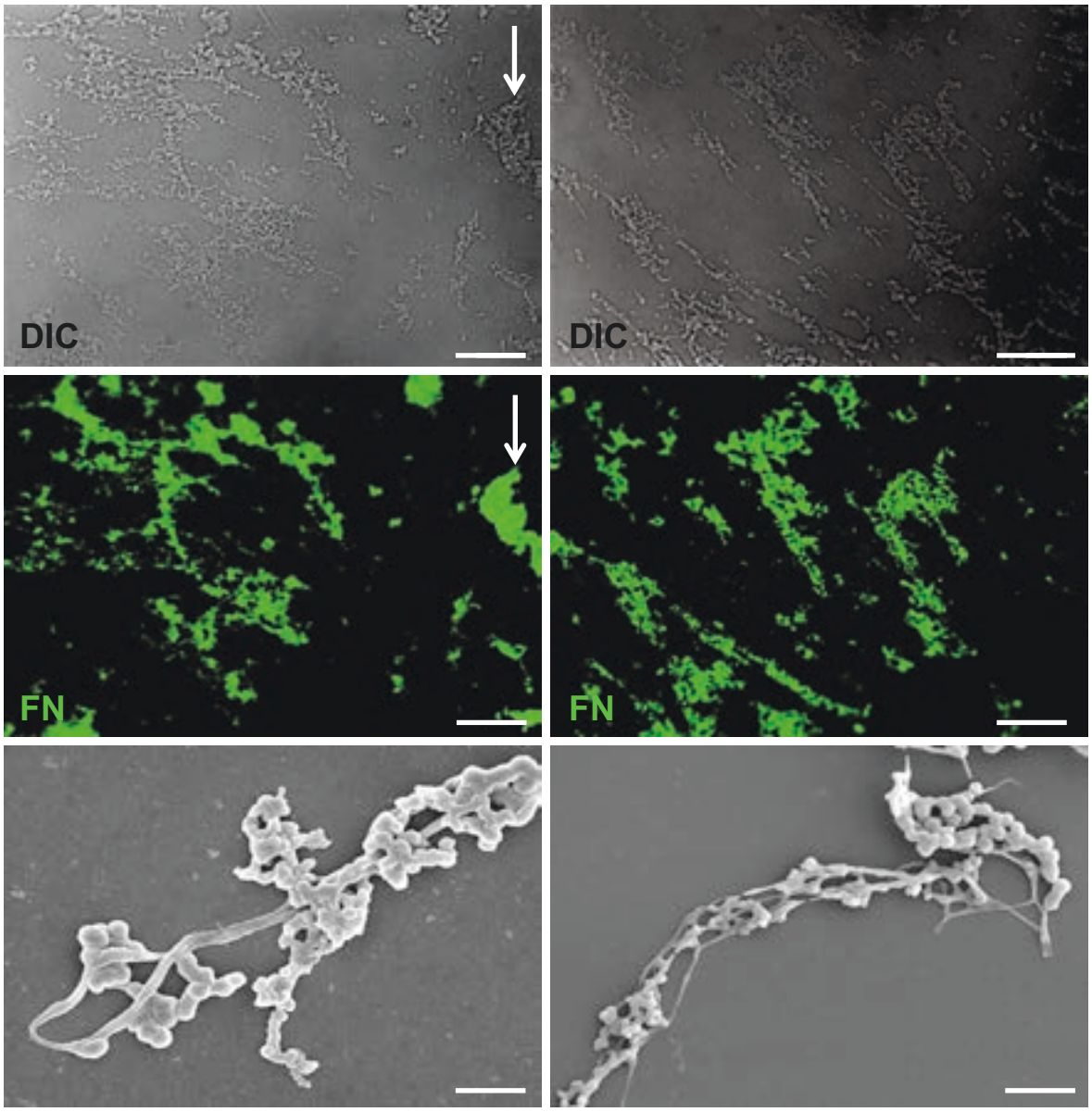
A.



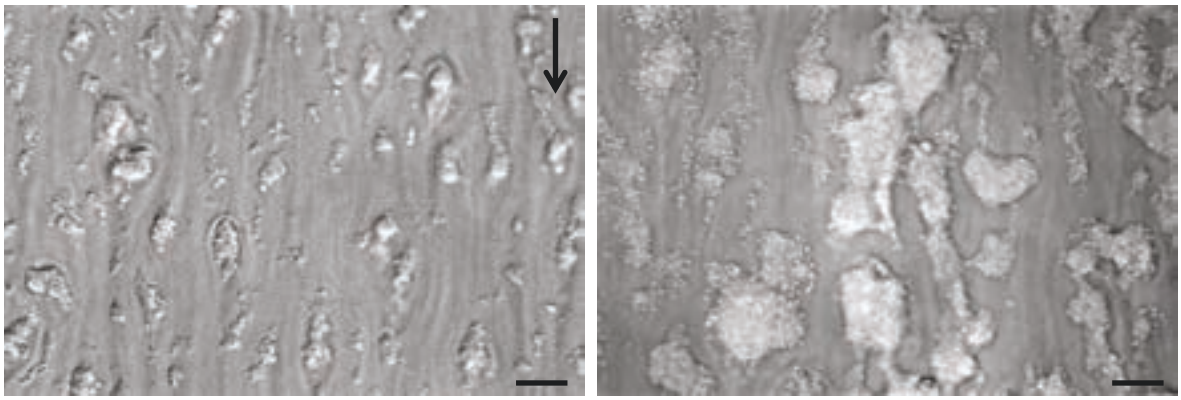


B.

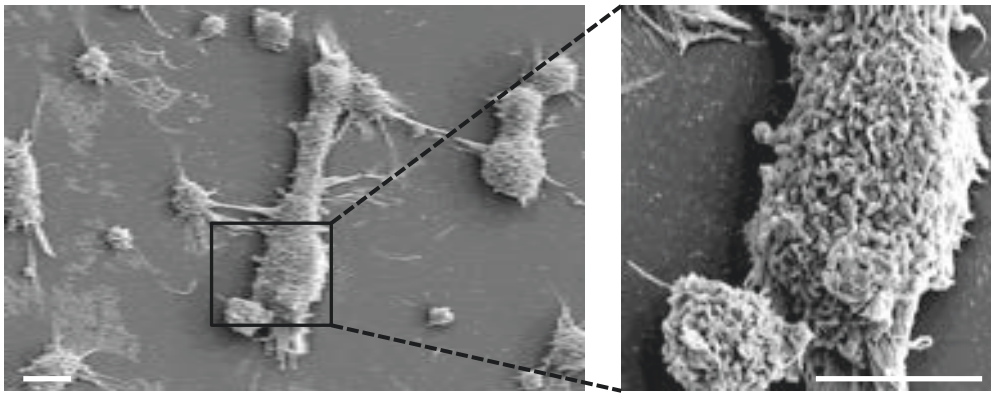
Fibrillar pFN **Fibrillar cFN**



C.


Fibrillar pFN
Fibrillar cFN

D.



E.

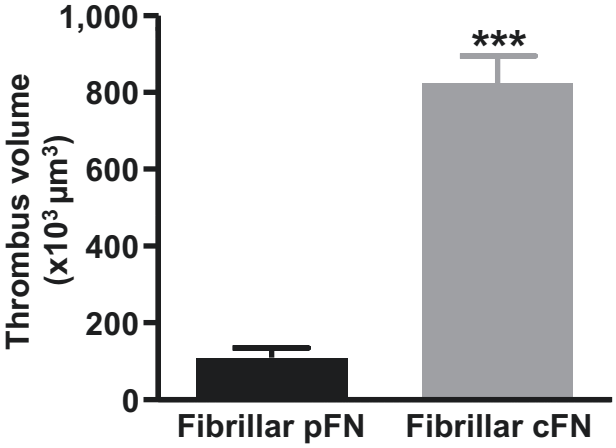
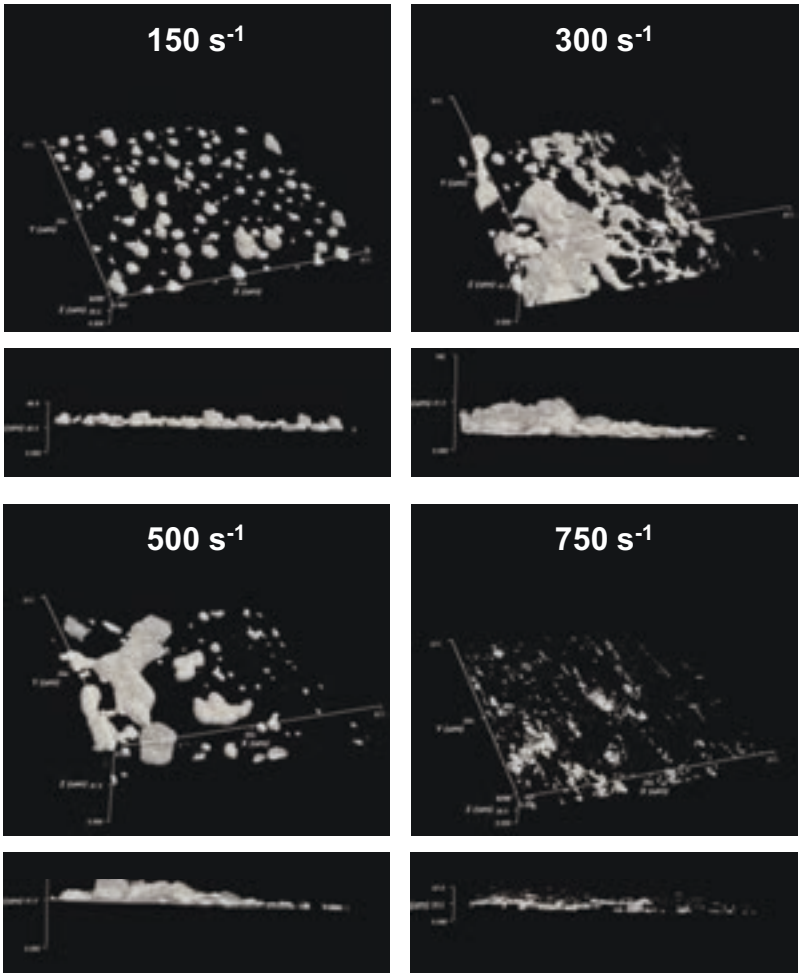

1,000
800
600
400
200
0
Thrombus volume
(x10³ µm³)
***
Fibrillar pFN
Fibrillar cFN

Figure 2

A.


150 s-1
300 s-1
500 s-1
750 s-1

B.

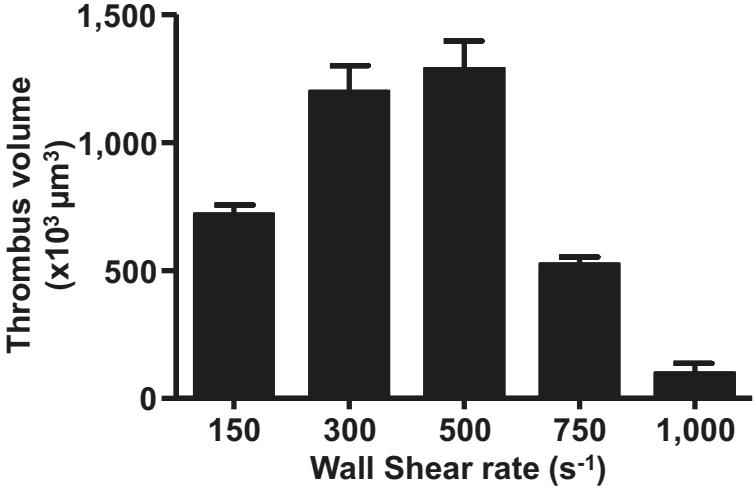
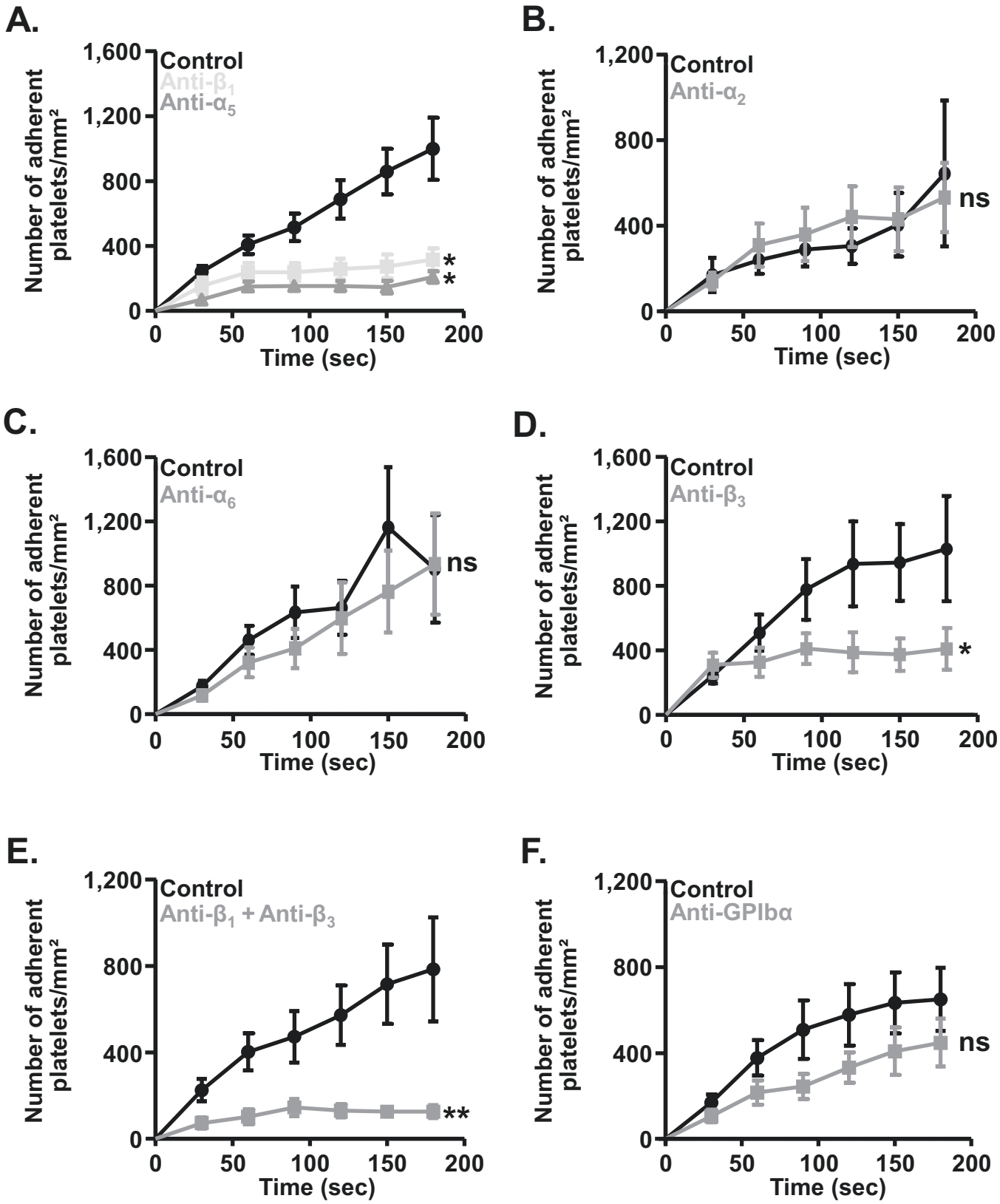
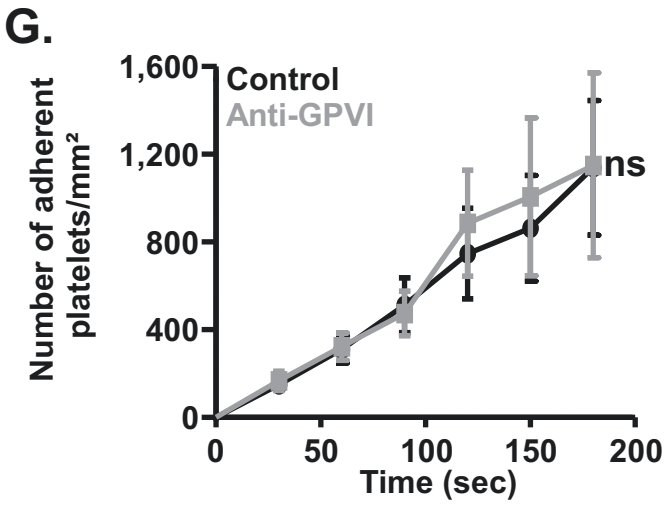

1,500
1,000
500
0
Thrombus volume
(x10³ µm³)
150
300
500
750
1,000
Wall Shear rate (s-1)

Figure 3


A.
Control
Anti-β1
Anti-α5
Number of adherent platelets/mm²
Time (sec)
*
*
B.
Control
Anti-α2
ns
C.
Control
Anti-α6
ns
D.
Control
Anti-β3
*
E.
Control
Anti-β1 + Anti-β3
**
F.
Control
Anti-GPIbα
ns


G.
Control
Anti-GPVI
ns
Number of adherent platelets/mm²
1,600
1,200
800
400
0
0
50
100
150
200
Time (sec)

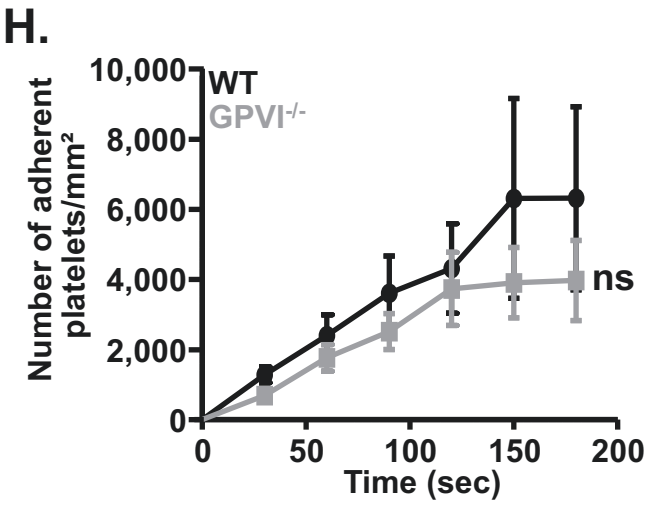
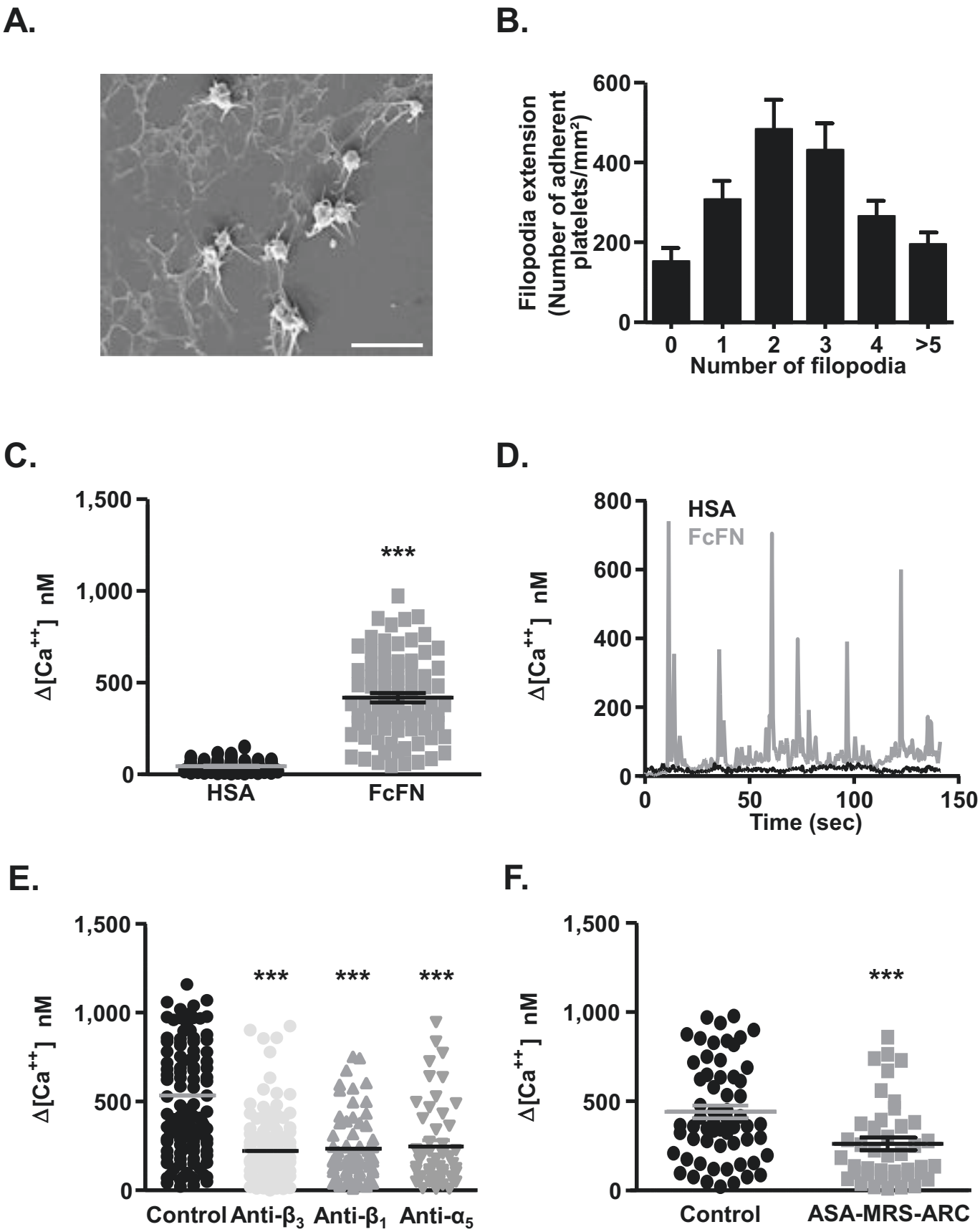

H.
WT
GPVI-/-
ns
Number of adherent platelets/mm²
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
0
50
100
150
200
Time (sec)

Figure 4


A.
B.
Filopodia extension (Number of adherent platelets/mm²)
600
400
200
0
0
1
2
3
4
>5
Number of filopodia
C.
1,500
1,000
500
0
Δ[Ca++] nM
***
HSA
FcFN
D.
800
600
400
200
0
Δ[Ca++] nM
HSA
FcFN
0
50
100
150
Time (sec)
E.
1,500
1,000
500
0
Δ[Ca++] nM
***
***
***
Control
Anti-β3
Anti-β1
Anti-α5
F.
1,500
1,000
500
0
Δ[Ca++] nM
***
Control
ASA-MRS-ARC

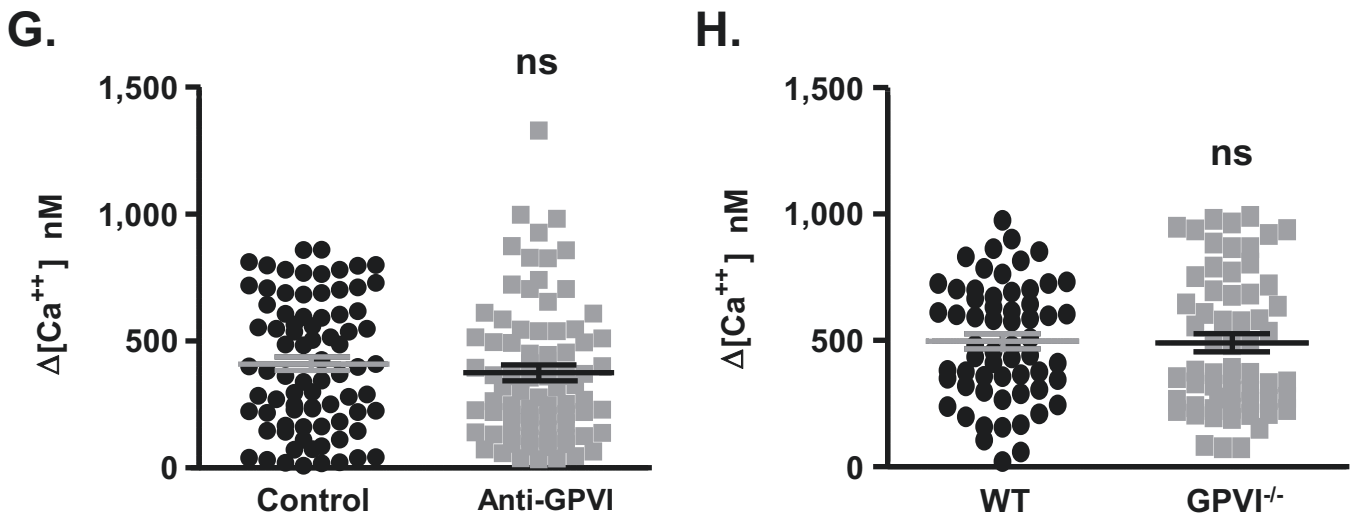

G.
ns
1,500
1,000
500
0
Δ[Ca++] nM
Control
Anti-GPVI
H.
ns
1,500
1,000
500
0
Δ[Ca++] nM
WT
GPVI-/-

Figure 5

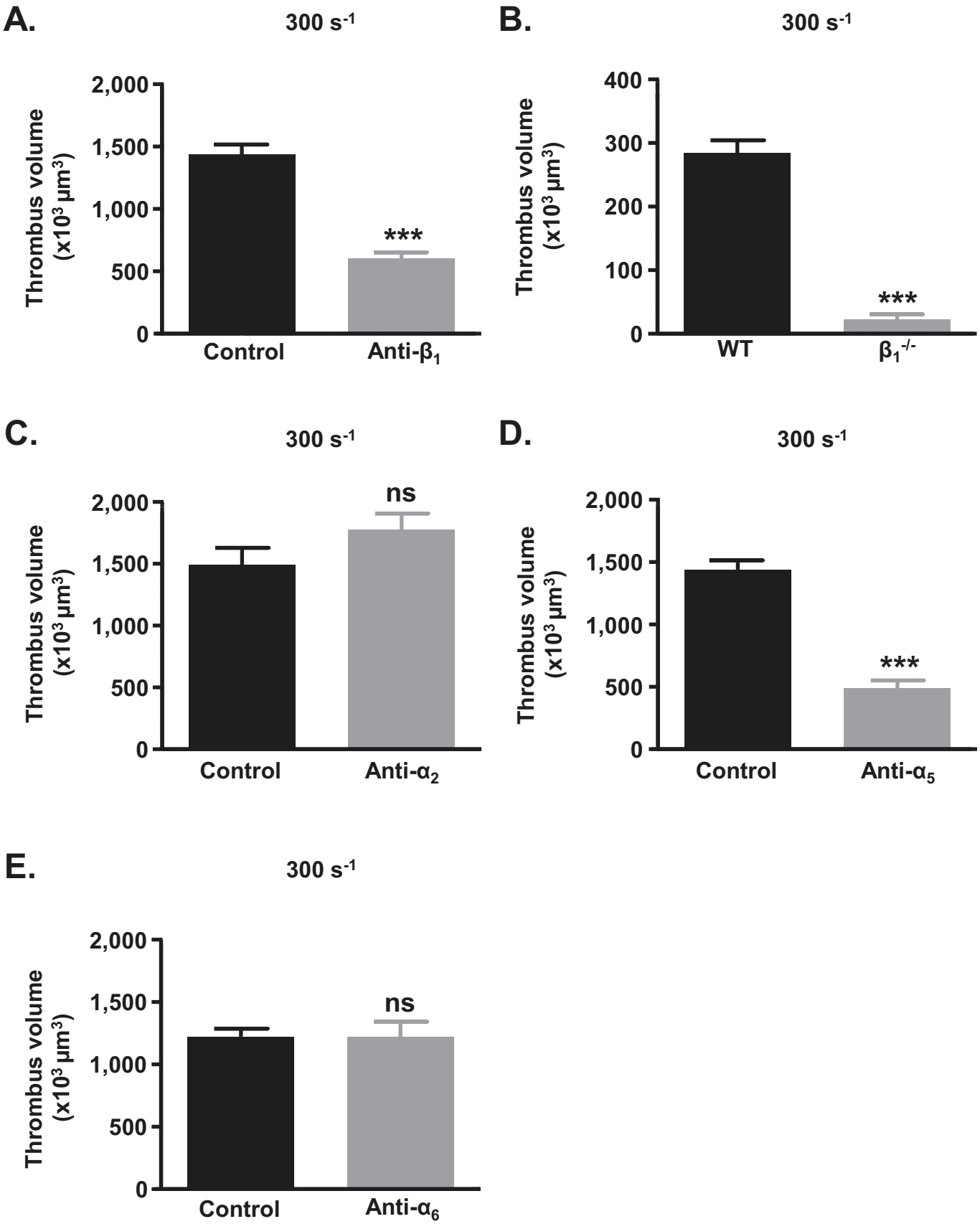
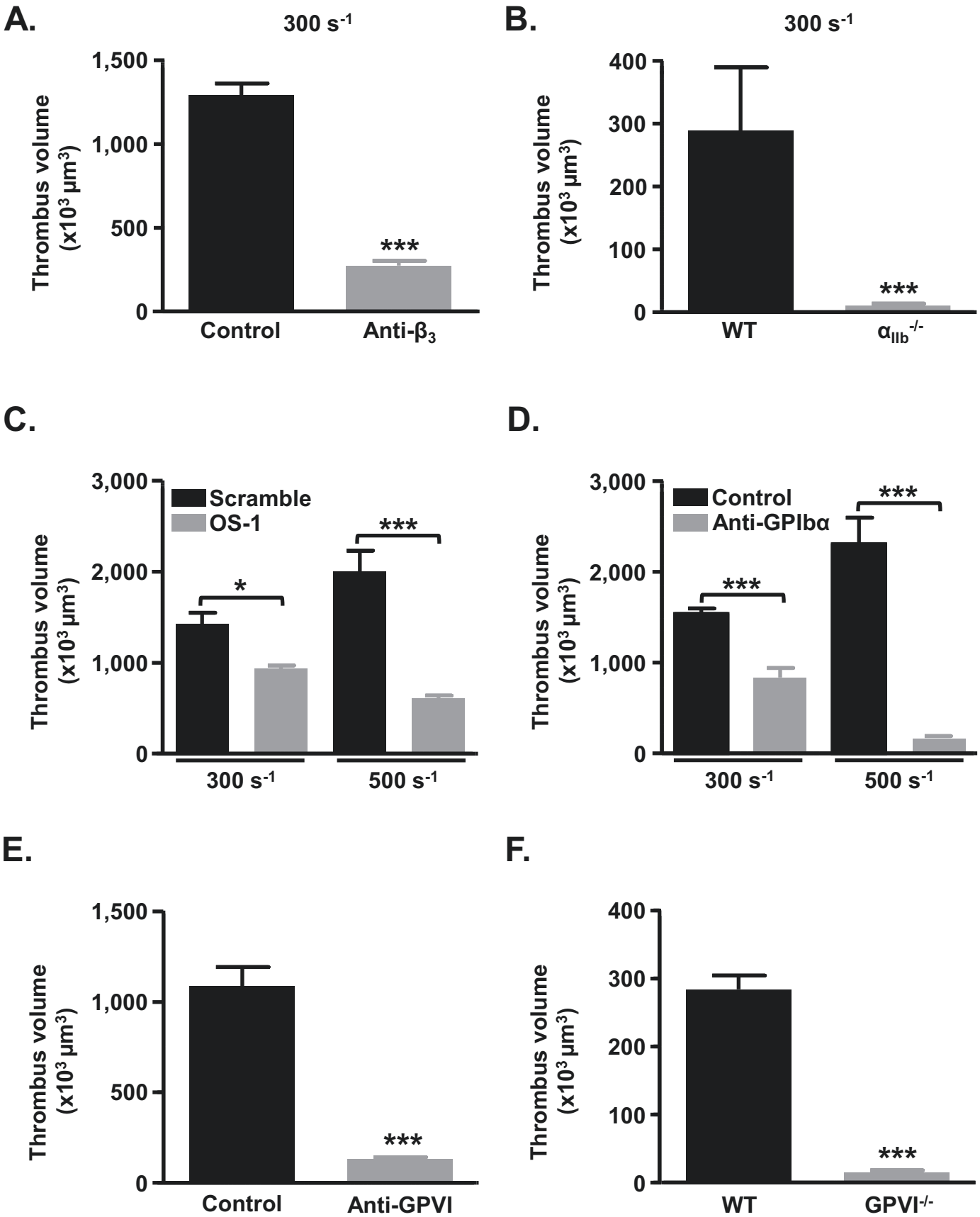
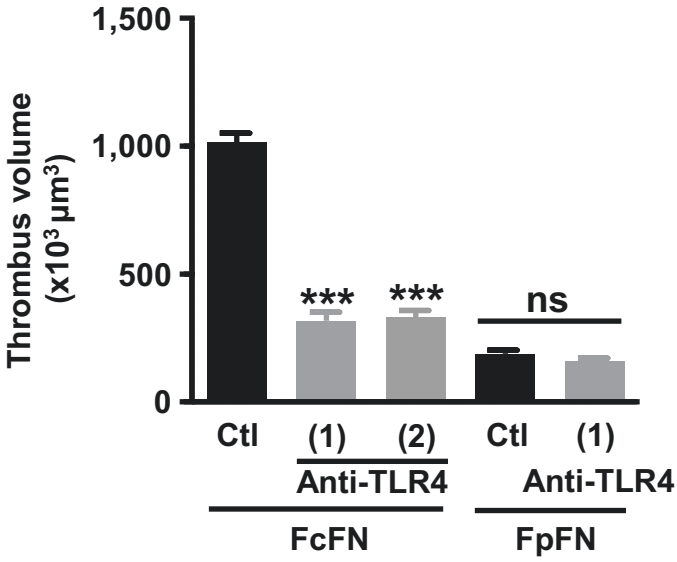
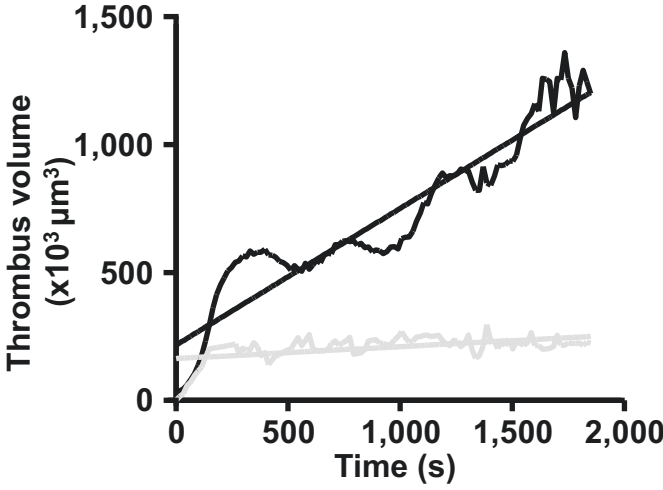

A.
300 s-1
Thrombus volume (x10³ µm³)
2,000
1,500
1,000
500
0
***
Control
Anti-β1
B.
300 s-1
Thrombus volume (x10³ µm³)
400
300
200
100
0
***
WT
β1-/-
C.
300 s-1
Thrombus volume (x10³ µm³)
2,000
1,500
1,000
500
0
ns
Control
Anti-α2
D.
300 s-1
Thrombus volume (x10³ µm³)
2,000
1,500
1,000
500
0
***
Control
Anti-α5
E.
300 s-1
Thrombus volume (x10³ µm³)
2,000
1,500
1,000
500
0
ns
Control
Anti-α6

Figure 6


A.
300 s-1
Thrombus volume (x10³ µm³)
1,500
1,000
500
0
***
Control
Anti-β3
B.
300 s-1
Thrombus volume (x10³ µm³)
400
300
200
100
0
***
WT
αIIb-/-
C.
Scramble
OS-1
Thrombus volume (x10³ µm³)
3,000
2,000
1,000
0
*
***
300 s-1
500 s-1
D.
Control
Anti-GPIbα
Thrombus volume (x10³ µm³)
3,000
2,000
1,000
0
***
***
300 s-1
500 s-1
E.
Thrombus volume (x10³ µm³)
1,500
1,000
500
0
***
Control
Anti-GPVI
F.
Thrombus volume (x10³ µm³)
400
300
200
100
0
***
WT
GPVI-/-


G.
300 s-1
Thrombus volume (x10³ µm³)
1,500
1,000
500
0
***
***
ns
Ctl
(1)
(2)
Ctl
(1)
Anti-TLR4
Anti-TLR4
FcFN
FpFN


H.
Thrombus volume (x10³ µm³)
1,500
1,000
500
0
0
500
1,000
1,500
2,000
Time (s)

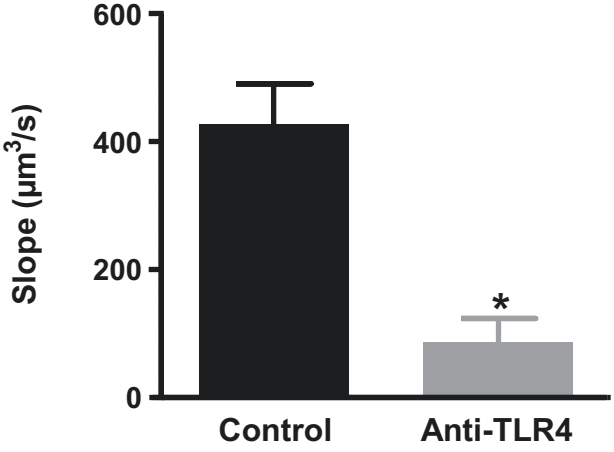
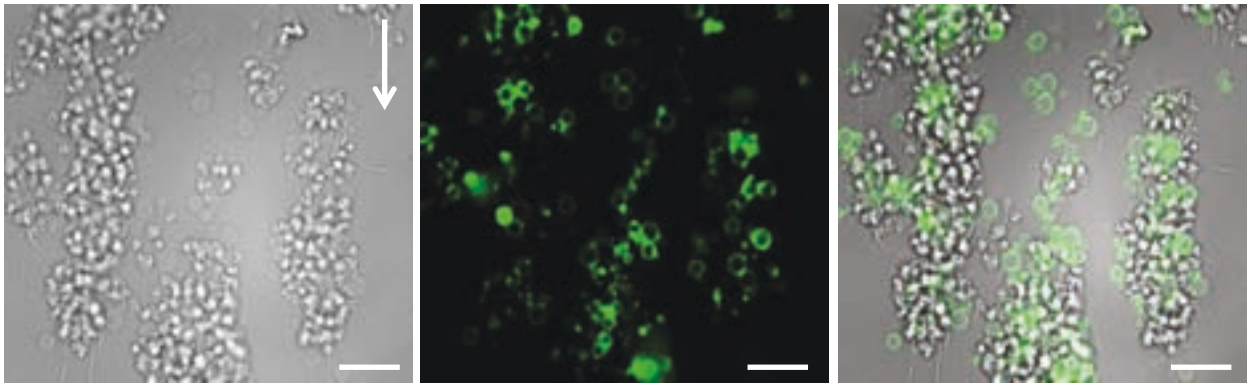
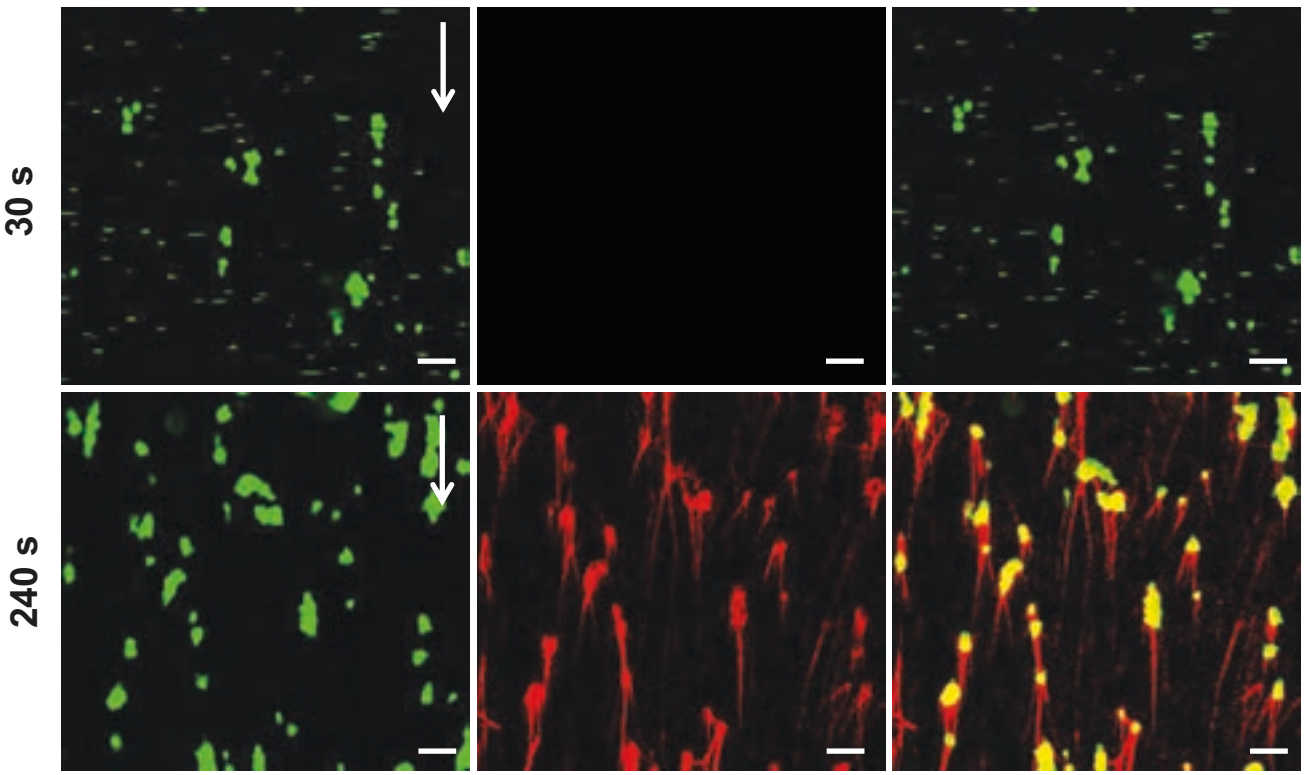

I.
Slope (µm³/s)
600
400
200
0
*
Control
Anti-TLR4

Figure 7

A.

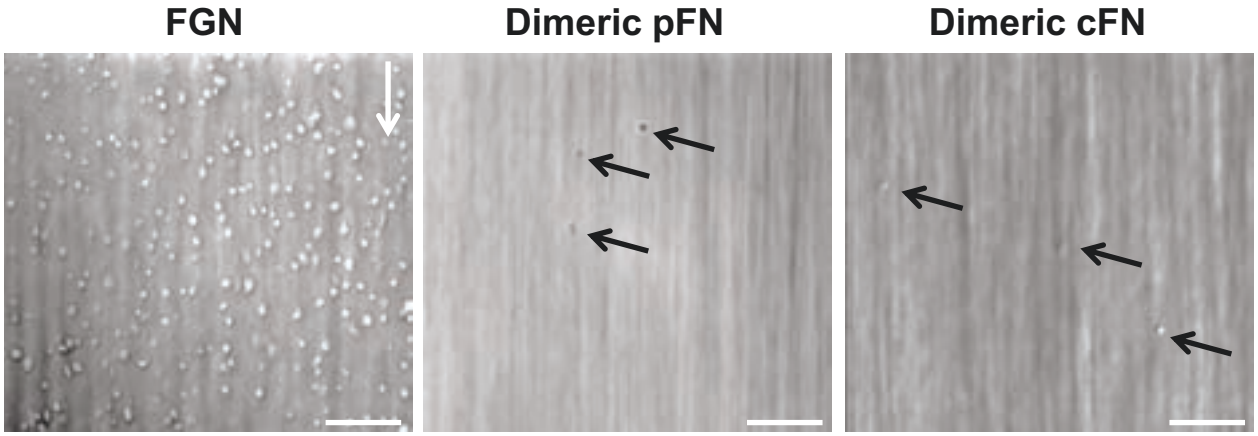


B.

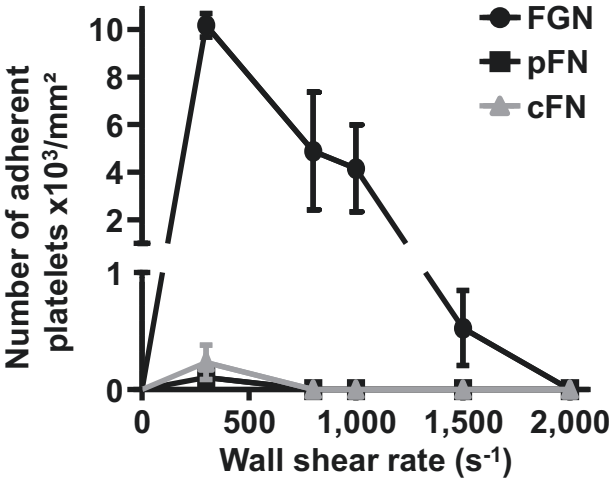


Supplementary Figure 1

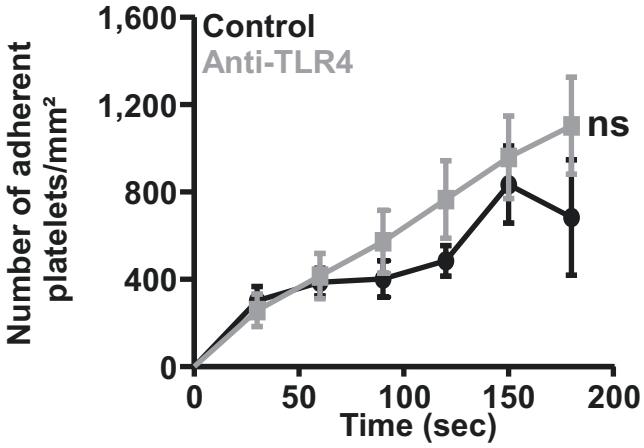
A.



B.



Supplementary Figure 2



Conclusion

Nos résultats montrent que les fibronectines cellulaires et plasmatiques sous leur forme fibrillaire mais pas dimérique, permettent dans des conditions de flux retrouvés au niveau des artères, une adhérence efficace des plaquettes menant à la formation de thrombi. L'étape initiale d'adhérence dépend des intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$. Une fois qu'elles ont adhéré, les plaquettes passent d'une forme discoïde à sphérique, émettent des filopodes et présentent une augmentation du niveau de calcium intracellulaire, traduisant leur activation. Cette activation dépend également des intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$. La formation des thrombi est médiée par ces mêmes intégrines ainsi que par le complexe GPIb-V-IX, la GPVI et le TLR4. Une observation intéressante de ce travail est que les thrombi se formant sur fibronectine cellulaire fibrillaire sont de plus grandes tailles que ceux sur fibronectine plasmatique fibrillaire. Cette différence de réactivité s'explique probablement par la capacité du TLR4 à lier la région EDA, qui est présente dans la fibronectine cellulaire, mais pas dans la fibronectine plasmatique. Enfin, un certain nombre de plaquettes adhérentes sur fibronectine cellulaire fibrillaire deviennent pro-coagulante, comme le révèle l'exposition de phosphatidylsérine et la génération de fibrine en aval des thrombi. En conclusion, ce travail apporte la preuve que la fibronectine cellulaire fibrillaire est une surface thrombogène qui soutient de manière efficace l'adhérence, l'activation, l'agrégation plaquettaire et l'activité pro-coagulante par le jeu d'une série de récepteurs, comprenant les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$, la GPVI, le TLR4 et le complexe GPIb-V-IX. En ce qui concerne le TLR4, nos résultats ont également mis en évidence un nouveau rôle de ce récepteur, dans la croissance d'un thrombus, indépendamment de son implication dans la réponse immune des plaquettes. Ce travail a été soumis pour publication.

3. Etude de l'effet de flux sanguins complexes sur l'agrégation plaquettaire

Publication 3 :

"Inverse role of pulsatile arterial flow on thrombus growth under physiological and pathological conditions found in the post-stenotic area"

Eric Maurer[1,2,3] *et al*.

[1]Inserm U949, Strasbourg, F-67065, France; [2]Université de Strasbourg, UMR-S949, Strasbourg, F-67081, France; [3]Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), Strasbourg, F-67035, France;

En préparation

Introduction

L'importance du flux sanguin dans la régulation des fonctions plaquettaires, en hémostase et en thrombose est reconnue depuis plus de 150 ans. Le flux et les forces qu'il exerce, régulent directement les interactions récepteurs/ligands modulant ainsi l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes. Le flux sanguin dans l'arbre artériel, en raison de l'activité cardiaque, est de nature pulsatile. A ce jour l'importance du flux pulsatile dans l'agrégation des plaquettes reste mal connue. Trois études ayant évalué l'effet d'un flux pulsatile, ont conclu à une augmentation, une diminution ou une absence d'effet sur l'agrégation plaquettaire **(Sakariassen 1980, Van Breugel 1988, Zhao 2008)**. De plus, une limite de ces études est que les variations de flux utilisées ne reflètent pas la pulsatilité que l'on retrouve dans la circulation sanguine (**Nesbitt et al, 2006; Gay et al., 2008**). D'autre part, il a été proposé que les flux perturbés que l'on retrouve dans un vaisseau sténosé épaissi par une plaque d'athérosclérose augmentent la formation d'un thrombus, par un processus qui reste mal compris. Le troisième objectif de ma thèse a été d'évaluer *in vitro* l'effet de la pulsatilité sur la formation de thrombi en condition de flux physiologique et pathologique. Pour ce travail, nous avons utilisé un système expérimental dans lequel du sang anticoagulé est perfusé à l'aide d'une pompe programmable, sur une surface de collagène, une protéine sous-endothéliale au contact de laquelle les plaquettes agrègent. La pompe était programmée pour reproduire le plus fidèlement possible les variations de flux retrouvées au niveau des artères carotides ou coronaires. Pour étudier l'effet du flux pulsatile en condition pathologique, j'ai développé en collaboration avec l'ISIS (Institut de science et d'ingénierie supramoléculaires) une chambre microfluidique présentant un rétrécissement de 90% qui a pour but de mimer une sténose artérielle sévère. L'agrégation des plaquettes a été quantifiée en mesurant le volume des thrombi par microscopie confocale. Par ailleurs, nous avons évalué l'importance des agonistes solubles dans a formation de thrombi au niveau post-sténotique.

Inverse role of pulsatile arterial flow on thrombus growth under physiological and pathological conditions found in the post-stenotic area

Eric Maurer[1,2,3] *et al*.

[1]Inserm U949, Strasbourg, F-67065, France; [2]Université de Strasbourg, UMR-S949, Strasbourg, F-67081, France; [3]Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), Strasbourg, F-67035, France;

Correspondence: P. H. Mangin, Inserm UMR-S949, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), 10, rue Spielmann, BP 36, 67065 Strasbourg Cedex, France, phone: +33 3 88 21 25 25, fax : +33 3 88 21 25 21, e-mail: pierre.mangin@efs-alsace.fr

Total word count of the manuscript: 6922

Word count in the abstract : 197

Abstract

The role of the pulsatile component of arterial blood flow on platelet aggregation is poorly appreciated. We determined the effect of pulsatility on platelet aggregation: i) under physiological flows using straight microcapillaries and ii) under pathological flows with a microfluidic flow chamber presenting a 90% stenosis. The flow variations encountered in the left coronary artery and in the common carotid were mimicked with a programmable pump. Following perfusion of blood over collagen, aggregate volumes were smaller under pulsatile versus steady flows. Interestingly, pulsatility did not affect platelet recruitment to the growing aggregate, but rather favored platelet detachment during acceleration phases. Micro-particle imaging velocimetry showed a laminar flow in all regions of the stenosed chamber. Platelet adhesion and aggregation were increased in the pre-stenotic region and at the stenosis throat, and were maximal in the post-stenotic area where thrombus growth led to the occlusion of the chamber. Surprisingly, in this region pulsatility enhanced thrombosis by 36%. Interestingly, aspirin and ARC-69931MX provided a greater inhibitory effect on platelet aggregation in the post-stenotic area compared to a control region. When combined to aspirin, targeting $P2Y_1$ was more effective than $P2Y_{12}$, reaching a similar level of inhibition than an $\alpha_{IIb}\beta_3$ blocker.

INTRODUCTION

The rhythmic heart contractions generate cyclic pressure fluctuations in arteries resulting in pulsatility of the blood flow. The pulsatile flow propagates as a wave through the arterial system and becomes nearly steady in the venous branch. Pulsatility has long been regarded as a key physiological factor for optimal tissue and organ perfusion, however, its importance with regards to blood cell function, particularly for platelets remains largely unknown (Konno 2005, Vasku, Wotke et al. 2007).

Under physiological conditions, vessel injury leads to platelet recruitment to the site of lesion to form a plug that stops blood loss. In the last four decades, platelet responses under flow conditions have been extensively investigated through the development of various *in vitro* and *ex vivo* perfusion systems (Cazenave, Packham et al. 1975, Baumgartner, Muggli et al. 1976, Sakariassen, Aarts et al. 1983). However, most of these experiments have been performed under non-pulsatile flow conditions which precluded an understanding of the influence of pulsatility in platelet aggregation. The role of pulsatile regimen has been explored in three studies where anticoagulated whole blood was perfused over collagen or subendothelium. These studies reached different conclusions and indicated either a decrease, no difference or an increase in platelet deposition between steady and pulsatile conditions (Sakariassen, Bolhuis et al. 1980, van Breugel, Sixma et al. 1988, Zhao, Wu et al. 2008). It should be mentioned that all of these experiments were performed using flow that did not reproduce physiological conditions such as found in coronary and carotid vessels.

Arterial thrombosis usually occurs upon the rupture of an atherosclerotic plaque in diseased arteries, such as the left coronary and the common carotid. Atheromatous lesions induce a narrowing of the vessel lumen which results in local hemodynamic disturbances. A 60% stenosis is considered as clinically significant and the risk of cardiovascular events increases with stenosis severity to become critical around 90%, where surgery is strongly recommended (Biller, Feinberg et al. 1998). Several case reports of patients suffering from ischemic events indicated that thrombus formation was maximal in the post-stenotic area (Houdart, Mounayer et al. 2001, Arabi, Vellody et al. 2011) where the flow was proposed to be disturbed and contain regions of recirculation (Nesbitt, Mangin et al. 2006, Gay and Zhang 2009). This is in agreement with a recent study describing the formation of rheology-driven discoid platelet thrombi in the post-stenotic region (Nesbitt, Westein et al. 2009). The current

standard of care for vascular ischemic diseases is the dual antiplatelet therapy composed of a combination of aspirin with a $P2Y_{12}$ antagonist. This treatment has greatly improved the outcome in patients with atherothrombotic diseases, however, notably because $P2Y_{12}$ cannot be completely blocked to avoid severe bleeding, several patients continue to experience recurrent ischemic events (Cattaneo 2004). Therefore more effective antithrombotic therapies with minor effect on bleeding are needed.

The purpose of the current study was to address the effect of flow pulsatility on platelet aggregation in an *in vitro* model based on blood perfusion over collagen surfaces. We investigated the influence of pulsatility (i) in a "physiological" setting using straight microcapillaries, and (ii) in "pathological" disturbed conditions of a stenosed perfusion chamber; (iii) finally we evaluated the effect of anti-platelet agents on thrombus formation under the combined effects of pulsatility and pathological blood flow found in the post-stenotic region.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Human VWF was isolated from factor VIII concentrates (EFS-Alsace, Strasbourg, France) as previously described (Chopek, Girma et al. 1986). Human fibrinogen was obtained from Fresenius Kabi (Bad Homburg, Germany). Acid-soluble type I fibrillar collagen (ASC) solution was prepared from bovine Achilles' tendon as previously described (Cazenave, Packham et al. 1973). Fatty acid-free human serum albumin (HSA) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and the lipophilic dye $DiOC_6$ (3, 3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) was from Invitrogen (Carlsbad, NM). 1-paraformaldehyde (PFA) was from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA), hirudin from Transgene (Illkirch-Graffenstaden, France) and polydimethylsiloxane (PDMS) and curing agent from Dow Corning (Midland, MI). The integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonist, abciximab (ReoPro®), was purchased from Lilly (Indianapolis, IN). AR-C69931MX (Cangrelor), a selective ADP $P2Y_{12}$ receptor antagonist was provided by the Medicines Co (Parsippany, NJ) and aspirin from Sanofi-Aventis (Paris, France). The selective $P2Y_1$ receptor antagonist MRS2500 was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK).

In Vitro flow-based studies

Human blood was collected from healthy volunteers who had not taken any antiplatelet or anti-inflammatory medications in the preceding two weeks. Flow-based assays were performed as previously described (Schaff, Receveur et al. 2011). Briefly, rectangular glass microcapillaries (VitroCom, Mountains Lakes, NJ) or microfluidic channels were coated with 20 µg/mL VWF, 300 µg/mL fibrinogen or 200 µg/mL type-I collagen overnight at 4°C and blocked with PBS-HSA (1%) for 30 minutes at RT. Hirudinated (100 U/mL) whole blood was perfused over the coated surfaces with a programmable syringe pump (PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA) at 37°C. To generate pulsatility, we programmed sequential multi-step aspiration profiles based on *in vivo* measurements of flow rates in the left coronary artery (Berne and Levy 2001), the common carotid (Holdsworth, Norley et al. 1999) and in the portal vein, that presents only minor perturbations attributed to residual cardiac activity and breathing (Pozniak 2009). A control steady wall shear rate was applied for each rheological condition to match the corresponding volume of perfused blood.

Measurement of platelet attachment and detachment

Quantification of platelet attachment to VWF, fibrinogen and collagen and of platelet detachment from preformed thrombi were performed using differential interference contrast (DIC) sequence images obtained with an inverted Leica DMI 4000 B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany: 63x, 1.4 numerical aperture oil objective) coupled to a charge-coupled device (CCD) camera (CoolSNAP HQ Monochrome, Photometrics, Tucson, AZ). For quantification of platelet attachment to aggregates, whole blood was labeled with 1 µmol/L $DiOC_6$ for 15 minutes at 37°C, followed by perfusion over preformed thrombi and monitoring using epifluorescence and DIC combination microscopy. Platelet thrombi were preformed by perfusing whole blood over collagen at 300 s^{-1} during 5 minutes, followed by perfusion under appropriate conditionss (steady, pulsatile). In all studies, tethering was determined frame by frame as the number of platelets forming a contact to a thrombus, VWF or fibrinogen (15 frames/s).

Measurement of thrombus volume

Thrombus growth was studied by perfusing $DiOC_6$ (1 µmol/L)-labeled whole blood over collagen. Emitted fluorescence was detected within 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 at indicated time points. Images were then stacked and analyzed with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) to determine the volume of the thrombi. 3D reconstructed images were obtained using using ImageSurfer (Center for Computer-Integrated Systems for Microscopy and Manipulation, Chapel Hill, NC).

Fabrication of microfluidic devices

The microchannels were fabricated in PDMS according to published methods (McDonald, Duffy et al. 2000). Briefly, a patterned photoresist-based mould was realized by standard soft lithography techniques. The liquid prepolymer PDMS and its curing agent were mixed thoroughly at a volumetric ratio of 10:1, placed in a vacuum chamber to degas and poured

onto the mould followed by curing at 65°C for 2 hours. The polymerized PDMS channels were then carefully peeled away from the mould and holes were punched at both extremities. Finally, the irreversible bonding of PDMS to glass coverslips was performed upon exposure of both surfaces to an oxygen plasma (Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires, Strasbourg, France).

Micro-article image velocimetry (micro-PIV)

The velocities in the different regions of the microfluidic flow chamber were measured using a micro-PIV system. This system is hosted by a IX71 inverted episcopic microscope (Olympus, France) equipped with a specific filter cube. In order to perform micro-PIV experiments, a PBS-glycerol mixture containing 41% glycerol, with a constant viscosity of 3.93 cP was prepared. This working fluid was seeded with nile red fluorescent (535/575) 1 µm carboxylate-modifed FluoSpheres® beads from Invitrogen which match the specificities of the filter cube. The fluid was feeded to the flow chamber under the same conditions than for the in vitro flow-based studies with blood. The particles were illuminated using a double pulsed mini Yag laser (NewWave, 120 mJ) at 532-nm. The time elapsing between two laser pulses ranged from 30 to 500µs, depending on the magnitude of the velocity field. Laser pulse synchronized images pairs were captured using a 1,376 x 1,024 pixel^2, 12bit depth CCD camera (Sensicam qe, PCO, Germany) side mounted on the microscope. Observations of the flow chamber with a UPLFLN 10x microscope objective combined with the specific optical camera mounts resulted in a 1.26 µm/pixel magnification allowing for a 1.2 x 1.7 mm^2 field of view with a depth of field of about 18 µm. To obtain good statistical convergence, 50 pairs of images were recorded at each instant. Image pairs were pre-processed by a substraction of the background noise defined by the minimum intensity image compute from the full set of image acquired at a location in the flow chamber. A 2 pass recursive (with no windows modification) average cross-correlation algorithm was applied to determine the displacement of the fluorescing particles. This algorithm was applied on 50% overlapping interrogation window 32 x 32 pixels in size (32 x 16 pixels in the narrow region of the stenosis). Such an analysis resulted in an average spatial resolution of about 20 x 20 µm (resp. 20 x 10 µm) based on the distance between two neighboring velocity vectors. Any obviously wrong vectors were eliminated by a local median filter. Here the velocity vector at a point is compared to the median velocity vector computed from the 8 neighboring vectors weighted

by a tolerance: any vector outside the interval is removed and replaced by the local median velocity vector.

In vivo experiments

A laser injury was induced to arterioles of 3-week old C57BL/6J mice (Charles River, Wilmington, MA) as previously described (Hechler, Nonne et al. 2010). Emboli detachment from a growing thrombus was observed in real time with a DIC technique, under an inverted Leica DM/IRB microscope using a 63x air objective. Images were acquired with a fast Photometrics CCD camera (CoolSNAP EZ Monochrome) and analysed off-line using Metamorph.

Statistical analysis

All values are reported as mean ± S.E.M. unless otherwise indicated. Data were compared by two-tailed paired Student's *t*-tests (Figures: 1-6). Data in Figure 7 were analyzed by 2-way ANOVA followed by the Bonferroni posthoc test. Differences were considered to be statistically significant at $p<0.05$ and all tests were performed using Prism software (GraphPad, La Jolla, CA).

RESULTS

Pulsatile flows found in coronary and carotid arteries limit aggregate formation on collagen

The effect of pulsatility on platelet aggregation was evaluated using a programmable syringe pump that closely reproduces flow profiles found in two arteries, the left coronary and the common carotid (Figure 1A). Tridimensional reconstructed images obtained by fast-scanning confocal microscopy showed that upon perfusion of hirudinated whole blood over type I-collagen for 12 min, the coronary pulsatile flow generated smaller aggregates than the steady control flow (Figure 1B), presenting a 36% decrease in volume (n=5, $p<0.01$) (Figure 1C). Similar results were obtained using the rheological conditions of a carotid artery, with a 16% (n=5, $p<0.01$) volume reduction compared to the steady condition (Figure 1C). We next asked whether this decrease also occurred under a venous flow that is no longer pulsatile, but presents minor rheological perturbations, due to residual cardiac activity and to the respiratory system (Gorg, Wollenberg et al. 2001). When perfusion was performed to mimic the modest flow fluctuations of the portal vein (Figure 1A), no difference in aggregate volumes was observed when compared to steady flow (Figure 1C). Together, these results suggest that pulsatility found in large arteries dampens aggregate formation.

The frequency and amplitude components regulate platelet aggregation

A pulsatile flow can be modeled as a periodic waveform presenting oscillations characterized notably by a frequency, i.e. the number of cycles per minute (cpm), and an amplitude, defined as the peak deviation from the mean shear value. To investigate the role of the first parameter, blood perfusions were performed at various physiological frequencies from 40 to 100 cpm. For this assay, the amplitude was set to oscillate between 10 s^{-1} and 960 s^{-1}, like in the carotid artery. As shown in figure 2A, the total aggregate volume was reduced by 32% at 70 cpm and by 25% at 100 cpm (n=5, $P<0.001$ and $P<0.01$ respectively), whereas it was not significantly modified at 40 cpm (n=5, $P=0.3430$). We next evaluated the effect of different amplitudes encountered physiologically with a frequency that was set at 70 cpm. Interestingly, the difference in aggregate volume between steady and pulsatile regimen became more important as a function of the amplitude, with a decrease of 16% (n=3, $P<0.05$), 22 % (n=3, $P<0.002$) and 35 % (n=4, $P<0.0001$), at $\Delta 440$ s^{-1}, $\Delta 950$ s^{-1} and $\Delta 1{,}240$ s^{-1}, respectively (Figure 2B).

Overall, these results indicated that the frequency and amplitude components of a pulse wave both contribute to the decreased aggregate formation observed under pulsatile flow.

Platelet attachment to preformed aggregates is unaffected under pulsatile flow

To gain better insight into the mechanism by which pulsatile flow negatively influences platelet aggregation, which represents the net result of platelet attachment and detachment, we evaluated these two variables in separate assays. Platelet recruitment to an aggregate under steady and pulsatile flow conditions was first evaluated using high-speed DIC/fluorescence switch microscopy. Tethering of platelets to a preformed aggregate was unchanged under coronary (6,900±500 platelets/mm^2/min; n=3) and carotid (6,700±800 platelets/mm^2/min; n=3) pulsatile regimen when compared to their steady control flows (6,600±700 and 6,300±1,500 platelets/mm^2/min, respectively; n=3) (Figure 3A). Platelet recruitment to a growing aggregate occurs mainly through VWF and fibrinogen that are exposed by activated platelets. We confirmed that pulsatility does not affect platelet recruitment, since no significant difference in tethering was observed over immobilized VWF (Figure 3B) and fibrinogen (Figure 3C) between carotid and coronary pulsatile flows and their steady controls.

Pulsatile flow promotes platelet detachment from thrombi

Since pulsatility does not modulate platelet attachement, we hypothesized that platelet detachment could be affected. To investigate this, we quantified the number of platelets detaching from preformed aggregates (Figure 3D). Coronary pulsatile regimen led to a 146±31% (n=4, $P<0.05$) increase in the detachment of single platelets and small aggregates relative to steady flow (Figure 3E). Similarly, a 79±20% (n=4, $P<0.05$) rise in platelet extraction was observed when a carotid pulsatile flow was applied. These results suggested that the reduced size of the aggregates observed over collagen under pulsatile flows, resulted from an increased platelet embolization.

Flow acceleration promotes platelet detachment from aggregates

A pulsatile flow is characterized by cycles of flow acceleration and deceleration. To evaluate the effect of each phase, we set up a simplified pulsatile regimen characterized by regular steps which presents the advantage to allow an easy delineation of acceleration and deceleration phases (Figure 4A. insert). We first confirmed that the number of platelets detaching from a preformed aggregate under pulsatile condition (4,290 plt/mm^2/min; n=3)

was 2.9 fold more important when compared to steady control flow (451 s^{-1}) (1,495 plt/mm²/min; $P<0.0001$, n=3) (Figure 4A). Detailed video-microscopic analysis demonstrated that platelet detachment occurred primarily during flow accelerations that stretched the aggregate, pushing the platelets in direction of the flow, ultimately resulting in their detachment (Figure 4B; Supplemental Video 1). Similar observations were made *in vivo*, during real-time visualization of thrombus formation occurring upon laser-injury of mouse mesenteric arterioles (Figure 4C; Supplemental Video 2). Emboli detachment preferentially occurred during the acceleration phase as attested by the mean surface area of the small aggregates detaching from the growing thrombus, that was more important during acceleration (66.5±8.3 μm^2; n=5) than deceleration (17.5±2.5 μm^2; $P<0.0001$, n=4) (Figure 4D). Altogether, these findings suggested that the reduced aggregate size observed in a pulsatile regimen is the result of an increased platelet extraction linked to important tensile forces occurring during flow acceleration.

Thrombus formation under pathological flows in a perfusion chamber

The above studies have been performed in microcapillaries with a constant section mimicking rheological conditions in healthy vessels. We next evaluated the impact of more complex hemodynamic disturbances encountered in stenosed vessels. A PDMS-based flow chamber containing a progressive 90% reduction in cross-sectional area, as encountered in severely-stenosed arteries *in vivo* was developed (Biller, Feinberg et al. 1998) (Figure 5A). It has been reported that sharp acceleration of blood flow occurs in the upstream contraction region of a stenosis, reaching a peak shear at the throat, followed by a complex zone of flow deceleration and turbulences at the outlet expansion (Nesbitt, Mangin et al. 2006, Gay and Zhang 2009). Micro-PIV experiments showed that the flows were laminar in all regions of the chamber with an acceleration in the pre-stenotic region going from 300 s^{-1} to 3,000 s^{-1}, elevated velocities in the stenotic throat (3,000 s^{-1}) and a region of deceleration in the post-stenotic area going from 3,000 s^{-1} to 300 s^{-1} (Figure 5B). After perfusion of whole blood over collagen at 300 s^{-1}, the 90% stenosed channel occluded repeatedly after around 1,533±39 s (n=5), whereas this never occurred in a control chamber presenting no narrowing (>3,600 s, n=5) (Figure 5C). A video-microscopy observation revealed that the occlusion occurred at the entry of the post-stenotic area where thrombus formation appeared to be particularly active (Supplemental Video 3). Confocal microscopy measurements confirmed that the thrombi grew much larger in the post-stenotic region (ROI 4: 2,226±134 x 10^3 $\mu m^{3/}\mu m^2$, n=4, $P<0,0001$) compared to those in the

straight zone (ROI 1: 427±164 x 10^3 $\mu m^{3/}\mu m^2$, n=4) (Figure 5D and E). It is also noteworthy that the thrombus volume was increased in the pre-stenotic region (ROI 2: 1,328±270 x 10^3 $\mu m^{3/}\mu m^2$, n=4) and at the stenosis throat (ROI 3: 1,243±270 x 10^3 $\mu m^{3/}\mu m^2$, n=4) where the frequency of embolization events was particularly elevated (Figure 5D, E and Supplemental Fig 1). Video-microscopy observation indicated that the increased platelet accumulation observed in the different ROI was already taking place during the first steps of platelet attachment to collagen in the ROI 4 and to a lesser extent ROI 2 and 3 presenting an increased number of tethered platelets when compared to ROI 1 (Figure 5F).

Pulsatile flow increases thrombus formation in the post-stenotic area

We next evaluated the effect of pulsatility in the stenosed flow chamber. Surprisingly, we observed that coronary (1,023±101 s) and carotid (843±146 s) regimens markedly reduced the occlusion time compared to steady flows (1,608±93 s and 1,522±49 s, n=4), suggesting that in the presence of a severe stenosis, pulsatility led to an apparent paradoxical effect on thrombus growth (Figure 6A and B). Tridimensional reconstructed images obtained by confocal microscopy showed that upon perfusion of hirudinated whole blood over type I-collagen for 2 min, the carotid pulsatile flow led to the formation of bigger aggregates than the steady control flow (Figure 6C). This was confirmed by confocal microscopy showing that coronary and carotid flows resulted in 22±4% (n=4, P<0,05) and 21±11% (n=6, P<0,005) increase in aggregate volumes in the post-stenotic area (ROI 4) when compared to steady flows (Figure 6D and E). We controlled that in agreement with our previous observations made in microcapillaries, coronary and carotid regimens diminished the thrombi volumes by 21±8% (n=4, P<0,05) and 22±4% (n=6, P<0,05) respectively, in the straight region (ROI 1) when compared to steady flows (Figure 6D and E). In contrast, pulsatility did not modify the thrombus volume found in the pre-stenotic region and at the stenosis throat (data not shown).

Effect of antiplatelet agents on thrombus growth in the stenosed flow chamber

The role of the main clinically used anti-platelet agents, namely aspirin, $P2Y_{12}$ antagonists and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ blockers was evaluated in the stenosed flow chamber under pulsatile flow. Interestingly, aspirin and AR-C69931MX ($P2Y_{12}$ antagonist) used at doses providing maximal effect reduced the thrombus volume more efficiently in the post-stenotic region (ROI 4: 52±6% and 49±8%, respectively) than in the control region (ROI 1: 36±4% a 37±4%, respectively; n=6, P<0.05) (Figure 7 A and B). These results suggested that the enhanced

thrombus formation occurring in the post-stenotic area is particularly dependent on the soluble agonists, ADP and TxA2. A combination of aspirin with AR-C69931MX, which represent the current standard of care for patient suffering from ischemic events, further inhibited thrombus formation resulting in a 69% reduction of the thrombus volume (Figure 7 C). In addition to $P2Y_{12}$, released ADP also activates platelets through the $P2Y_1$ receptor that has been proposed as a promising antithrombotic target. Interestingly, blockade of $P2Y_1$ combined with aspirin was much more effective than the combination aspirin/AR-C69931MX abolishing thrombus formation and allowing only single platelet adhesion similarly to the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ blocker ReoPro (Figure 7 D-F).

DISCUSSION

The present study provides evidence that under hemodynamic conditions mimicking those found in large healthy arteries, a pulsatile regimen reduces aggregate formation compared to a steady flow. The critical parameter that limits the aggregate growth is the acceleration rather than deceleration phase of the flow cycle. This translates into an enhanced detachment of single platelets or small aggregates rather than a limitation of platelet recruitment. On the contrary, in a pathological setting found in the expansion area of a stenotic vessel where thrombus growth is markedly enhanced, a pulsatile flow resulted in an apparently paradoxical effect and further increased thrombosis compared to constant regimen. Under pulsatile conditions, a treatment with aspirin or the $P2Y_{12}$ antagonist AR-C69931MX, alone or in combination reduced more efficiently thrombus growth in the post-stenotic region compared to a straight control zone. Aspirin combined with the blockade of $P2Y_1$, was more effective than a co-treatment with aspirin and AR-C69931MX, abolishing thrombus formation and allowing only the formation of a single platelet monolayer.

Most studies to date have been performed in chambers or microcapillaries with steady flow regimens and have therefore not addressed the role of pulsatility found in arteries on platelet function and thrombus growth. Our results suggest that pulsatile flows encountered in large healthy arteries formed smaller aggregates than steady flows. This is in agreement with a work from Sakariassen and coworkers studying *ex vivo* platelet adhesion to subendothelial human arteries and with a recent *in silico* study based on computational fluid dynamics that both described larger thrombus formation in steady than in pulsatile flow (Sakariassen, Bolhuis et al. 1980, Xu 2009). However, our results contrast with two other publications reporting no effect or an increased platelet recruitment under pulsatile conditions (van Breugel, Sixma et al. 1988, Zhao, Wu et al. 2008). A major limit of the four above mentioned studies is that the flow profiles utilized far differ from pulsatile regimen encountered *in vivo*. Based on *in vitro* and *in vivo* experiments, we showed that the reduction of the thrombus volume under pulsatile flow relies on an enhanced platelet detachment. This is in agreement with a recent biomechanical study highlighting that high flow acceleration was responsible for the detachment of preadherent cell (Cheung, Zheng et al. 2009). At a molecular level, our findings suggest that the forces applied during the acceleration phases of a physiological cyclic flow would overcome the tensile strength of the loosely bound platelets with discoid

shape at the outer layer of a growing thrombus, which present only a low degree of activation (Eckly, Hechler et al. 2011).

Our study indicates that thrombus growth was enhanced in all regions around the narrowing of a severe 90% stenosed flow chamber. In the pre-stenotic area micro-PIV indicated that the flow remains laminar with the presence of a sharp acceleration. Platelet recruitment and thrombus volume were increased about three times when compared to control. The thrombi were stable and presented an extended morphology in the flow direction which appears to be linked to the acceleration process since such shapes do not occur with steady flow at equivalent values of wall shear rate. The importance of flow acceleration on platelet function remains poorly defined, but it has been reported that temporal flow gradients activate platelets through a signaling mechanism involving integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and the ADP receptor $P2Y_1$ (Goncalves, Nesbitt et al. 2005). Our study extends this finding suggesting that shear acceleration also increases platelet recruitment and thrombus growth. This phenomenon appears to critically rely on the GPIb-V-IX complex, since its blockade abolished thrombus growth in the contraction region without measurable effects in the straight control zone (Maurer *et al.*, unpublished results).

At the stenosis throat, where the flow was laminar and shear rate was estimated around 3,000 s^{-1}, the rate of thrombus growth was particularly elevated. This observation is in agreement with the well-recognized role of high versus low shear on platelet activation and aggregation (Peterson, Stathopoulos et al. 1987, Moake, Turner et al. 1988). Interestingly the formed thrombi were unstable and rapidly embolized, a phenomenon that could be explained by the high velocity of the flow in the stenosis throat that generated elevated shear forces applied on the thrombi during their growth. This unstable thrombus formation is in apparent contradiction with a pioneer study showing that in an 80% stenosed flow device, the throat is the major region of platelet accumulation (Badimon and Badimon 1989). However, our results are in agreement with this report since lowering the degree of narrowing displaced the region of maximal platelet accumulation from the post-stenotic zone to the stenosis throat (Maurer *et al.*, unpublished results). This indicates that the stenosis degree directly affects the location and extent of the thrombotic process and it will be interesting to determine its link to vessel occlusion.

We found that thrombus growth was maximal in the post-stenotic area. Interestingly the thrombi forming in this region grow in all x, y and z directions, covering rapidly the entire space and occluding the channel. Our results are in agreement with several medical reports of

patients showing that the thrombus size was maximal in the post-stenotic area (Houdart, Mounayer et al. 2001, Arabi, Vellody et al. 2011). A recent publication suggested that this increased thrombosis is explained by disturbed flow (Nesbitt, Westein et al. 2009). We observed by video-microscopy that once the thrombi are formed in the expansion zone the flow becomes disturbed and recirculation zones appear (video 5). Such events reduce the flow velocity and maintain platelets much longer in the close environment thereby increasing their chances to adhere to a thrombus. Therefore, this is likely to be an important mechanism responsible for the enhanced thrombosis observed in the post-stenotic zone, but could not be the only one. Indeed, platelet attachment was already maximal during the initial events of thrombus formation when micro-PIV indicated that the presence of a laminar flow deceleration without apparent flow disturbances. This suggests that deceleration events could also play a role in the enhanced thrombosis in the expansion region and would be in accordance with a report describing priming events of platelets once they move from high to low shear stress regions (Sheriff, Bluestein et al. 2010). While pulsatility reduces the size of aggregates in flow conditions mimicking a healthy vessel, our results show that it increases the thrombus volumes in pathological conditions. The mechanism involved is unclear, but could be related to the ability of the pulsatility to increase the margination of platelets (Xu and Wootton 2004). This process is known to push platelets against to the vessel wall, facilitating their adhesion (Tangelder, Teirlinck et al. 1985, Goldsmith and Turitto 1986, Aarts, van den Broek et al. 1988).

Our study provides evidence for a critical role of the soluble agonists, ADP and TxA2 in thrombus growth in the post-stenotic area. The reason why these agonists are of paramount importance in this region is likely to rely on the local rheological conditions, where vortices and recirculation regions were visualized. These events allow maintaining circulating platelets and soluble agonists much longer in the vicinity of the thrombus compared to a straight region, and therefore enhance the thrombotic process. From a pharmacological stand point, combining aspirin with a $P2Y_1$ blocker was more effective than aspirin with a $P2Y_{12}$ antagonist, reaching a similar level of inhibition than a $\alpha_{IIb}\beta_3$ blocker. This result confirmed the observation of the complementary inhibitory effect of ASA with a $P2Y_1$ antagonist on *in vitro* thrombus growth under arterial shear rates (Labarthe, Babin et al. 2012). These data also extend our previous findings of a complete inhibition of shape change together with a profound decrease in aggregation and secretion when platelets treated with ASA and

MRS2179 were stimulated with collagen (Mangin, Ohlmann et al. 2004). These findings further highlight an important role for the $P2Y_1$ receptor in arterial thrombosis.

In conclusion, this study suggests that the pulsatility of the blood flow differentially affects platelet aggregation depending on the hemodynamic conditions. While it would provide a protective effect towards excessive platelet accumulation under undisturbed flow, it could enhance the thrombotic process under disturbed conditions found downstream of stenosed arteries. Overall, these results provide a better understanding of the effect of blood flow on platelet function and thrombosis. This previously unrecognized role of pulsatility on platelet aggregation could provide an interesting base, to evaluate novel pharmacological targets.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Pulsatile flow reduces thrombus growth on collagen. Hirudinated human whole blood incubated with the fluorescent dye $DIOC_6$ (1 µmol/L) was perfused over type I fibrillar collagen under steady or pulsatile flow conditions. **A,** The programmed pulsatile flow profiles (black lines) were adapted from *in vivo* measures of the left coronary, the common carotid arteries and the portal vein blood flows (black curves), as described in methods. The corresponding steady control flows (gray lines) were determined experimentally as the mean shear rates of the pulsatile flows. **B,** Representative 3D reconstructed images of platelet thrombi obtained after 12 minutes of blood perfusion under steady or pulsatile coronary flow conditions. **C,** The bar graphs represent the total volume of platelet thrombi obtained after 12 minutes of perfusion under steady or pulsatile coronary, carotid and portal venous blood flow conditions. Thrombi volumes represent the mean ±SEM in 1 random field in 3 to 5 separate experiments performed with different blood donors (**$P<0.01$ and ns: $P>0.05$)

Figure 2. Pulse frequency and amplitude of the shear rate affect thrombus growth on collagen. Human whole blood anticoagulated with hirudin was perfused over type I fibrillar collagen under steady or pulsatile flow conditions. Platelet thrombi were fixed, labeled with $DIOC_6$ (1 µmol/L) and their volume was quantified by confocal microscopy. **A-B,** Top insets: schematics of modeled pulsatile flow profiles (black and grey lines) and of the corresponding steady control flows (dotted lines) that were programmed in the pump. **A,** Bottom: Effect of a 2-step pulsatile flow ranging from 10 to 960 s^{-1} and applied at 4 different frequencies, defined as the number of cycles per minute (cpm). The bar graph represents the total volume of the thrombi after 5 minutes of perfusion. **B,** Bottom: Effect of a 2-step pulsatile flow set at a frequency of 70 cpm and applied at 4 different shear rate amplitudes above a baseline shear rate of 10 s^{-1}. The bar graph represents the total volume of the thrombi after 5 minutes of perfusion. Data represent the mean ±SEM in 8 random fields in 3 to 5 independent experiments obtained with different blood donors (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$ and ns: $P>0.05$).

Figure 3. Pulsatility does not affect platelet attachment to a thrombus, Fibrinogen and Von Willebrand Factor, but promotes platelet detachment from a thrombus. $DIOC_6$-

labeled whole blood was perfused under steady or pulsatile coronary and carotid flow conditions over preformed thrombi **(A)**, VWF **(B)** and FGN **(C)** coated capillaries, as expanded in methods. Video-microscopy was used to determine the number of platelets attaching to the surface per minute. **A-C**, Bar graphs represent the number of platelet attaching respectively to the thrombi (**A**), to VWF (**B**) and FGN (**C**). **D-E**, Platelet thrombi were pre-formed by perfusing human hirudinated whole blood over type I collagen for 5 min at 300 s^{-1}. After a washing step with PBS, pulsatile coronary or carotid flows or their corresponding steady flows were applied and platelet detachment from thrombi was monitored with high-speed DIC microscopy (22 frames/s). **D,** Representative DIC images depicting platelet detachment (white arrows) under carotid flows. Bars equal 30 µm. The black arrows represent the direction of blood flow. **E,** The bar graph represents the total number of platelets detaching from a thrombus in the field over a 2 minute period. Results are given as the mean ±SEM in 1 random field in 3 to 4 independent experiments with different blood donnors (**P*<0.05, ***P*<0.01 and ns: *P*>0.05).

Figure 4. Flow acceleration promotes platelet detachment from thrombi. A-B, Platelet thrombi were pre-formed by perfusing human hirudinated blood over type I collagen for 5 minutes at 300 s^{-1}. After washing with PBS, a 2-step pulsatile flow ranging from 10 to 960 s^{-1} at 30 cpm or its corresponding steady flow were applied and platelet detachment from thrombi was monitored. **A,** Total number of platelets detaching from a thrombus in the field during a 90-second period. **B,** Video-microscopy analysis of platelet detachment as a function of flow acceleration and deceleration phases. Data are from 1 random field of 4 independent experiments performed with different blood donors. **C-D,** A laser-induced injury of the wall of mesenteric arterioles was produced in 3-week-old anesthetized C57BL/6J mice and thrombus growth was visualized by video-microscopy using a DIC technique. **C**, High magnification images of platelet aggregates detaching from a thrombus during the acceleration (Ac) and deceleration (De) phases of a pulsatile flow. Bars equal 10 µm. The arrow represents the direction of blood flow. **D**, Surface area of platelet emboli detaching from a thrombus during the acceleration and deceleration phases. Results are given as the mean ±SEM of 5 independent experiments performed in different mice (***P*<0.01 and ****P*<0.001).

Figure 5. Enhanced thrombus formation occurs in a flow chamber containing a severe narrowing. A, Schematic views of the PDMS-based flow chambers containing or not a narrowing. The stenosed channel was designed to present a 90% reduction at the apex with contraction-expansion angles of 10%. The numbers in the input straight region (1), the pre-stenotic (2), the stenosis throat (3) and the post-stenotic expansion zone (4) indicate the regions of interest. **B**, Representation of the local shear rates found in the different ROI of the stenosed chamber calculated after micro-PIV measurements of the flow velocities during perfusion of a glycerol solution (3.93 cp) at 300 s^{-1}. **C-F** Hirudinated human whole blood labeled or not with $DIOC_6$ (1 µmol/L*)* was perfused for 2 minutes at a constant rate of 300 s^{-1} through type I collagen-coated flow chambers containing a 90% stenosis. Platelet adhesion was visualized in real time using differential interference contrast (DIC) microscopy and thrombus growth was monitored by confocal microscopy. **C,** The time to thrombotic occlusion of the straight and stenosed channel were determined after blood perfusion at $300s^{-1}$. Each symbol represents one experiment. **D**, Representative 3D reconstructed images of platelet thrombi obtained after 30, 60, 90 and 120 s perfusion at 300 s^{-1}. **E**, Total volume of platelet thrombi obtained after 2 minutes of perfusion at 300 s^{-1}. **F,** The number of adherent platelets at $300s^{-1}$ in the different ROI were determined every 2 s during the initial 10 second-period. Data are the mean ±SEM in specified ROI in 3 to 5 separate experiments (**P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001).

Figure 6. Platelet accumulation to collagen in a post-stenotic region is enhanced under pulsatile regimen. A-E Hirudinated human whole blood labeled with $DIOC_6$ (1 µmol/L*)* was perfused under control steady or pulsatile flow conditions through type I collagen-coated flow chamber containing a 90% stenosis. **A-B,** Representations of the time to channel occlusion under steady or pulsatile coronary **(A)** or carotid **(B)** blood flow. **C,** Representative 3D reconstructed images of platelet thrombi formed 2 min after blood perfusion under steady or carotid pulsatile flow conditions. **D-E,** The bar graphs represent the total volume of platelet thrombi in ROI 1 and ROI 4 obtained 2 minutes after blood perfusion under steady and coronary **(D)** or carotid **(E)** pulsatile conditions Data are the mean ±SEM in specified ROI in 3-4 separate experiments (**P*<0.05, ***P*<0.01).

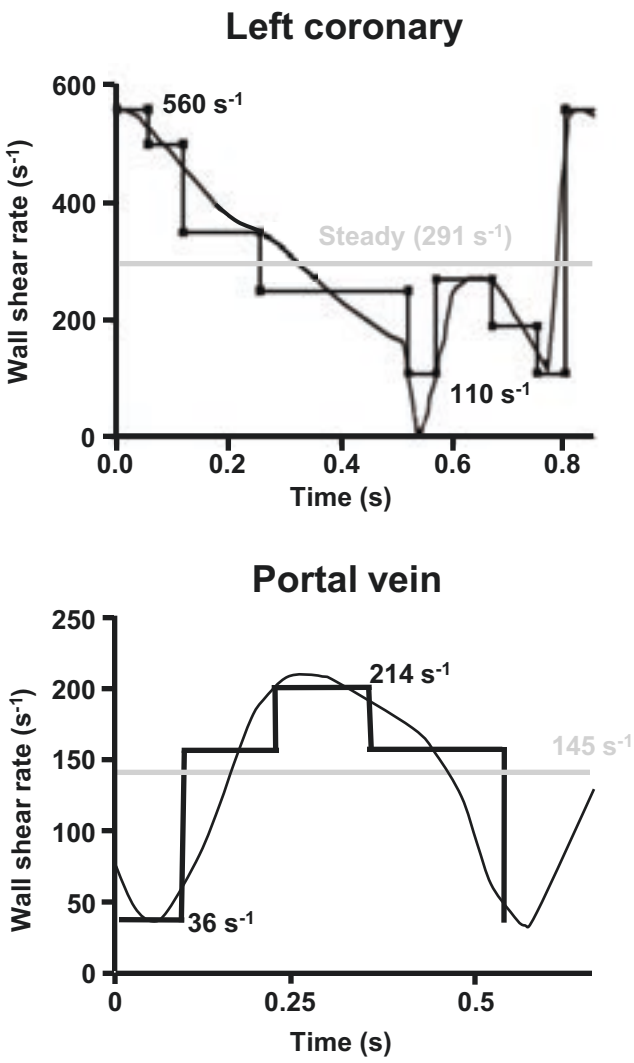
Figure 7. Effect of anti-platelet agents on thrombus growth under pathological flow. A-F, $DIOC_6$-labeled whole blood was perfused under pulsatile carotid flow conditions over type I collagen. The bar graphs represent the total volume of platelet thrombi measured by confocal microscopy in 8 random fields 2 minutes after perfusion of blood that was treated with of 1 mmol/L aspirin (**A**), 10 µmol/L AR-C69931MX (**B**), or with 1 mmol/L aspirin combined to 10 µmol/L AR-C69931MX (**C**) or to 10 µmol/L MRS 2500, (**D**) or with 40 µg/mL of ReoPro (**E**). **F,** Representative 3D reconstructed images of platelet thrombi formed 2 min after perfusion of blood treated or not with aspirin combined to AR-C69931MX or MRS 2500, or treated with ReoPro. Data are the mean ±SEM in specified ROI of 4 to 5 separate experiments (**P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001).

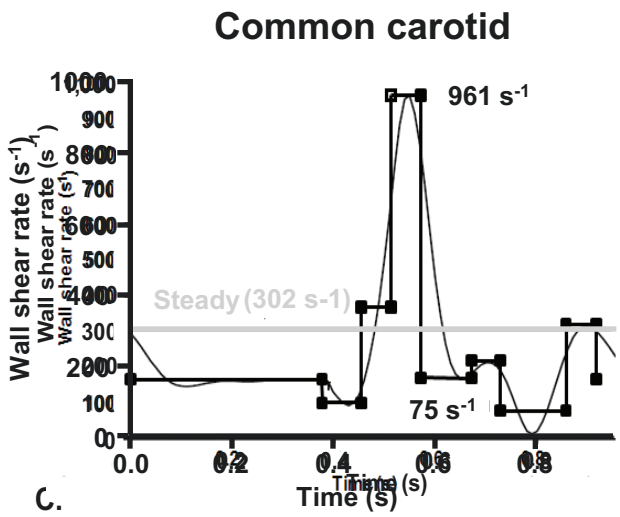
Aarts, P. A., S. A. van den Broek, G. W. Prins, G. D. Kuiken, J. J. Sixma and R. M. Heethaar (1988). "Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood." Arteriosclerosis **8**(6): 819-824.
Arabi, M., R. Vellody and K. Cho (2011). "Acute Renal Artery Occlusion with Prolonged Renal Ischemia: A Case of Successful Treatment with Stent Placement and Catheter-directed Thrombolysis." J Clin Imaging Sci **1**(11): 2156-7514.
Badimon, L. and J. J. Badimon (1989). "Mechanisms of arterial thrombosis in nonparallel streamlines: platelet thrombi grow on the apex of stenotic severely injured vessel wall. Experimental study in the pig model." J Clin Invest **84**(4): 1134-1144.
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." Thromb Haemost **35**(1): 124-138.
Berne, M. and N. Levy (2001). Cardiovascular Physiology.
Biller, J., W. M. Feinberg, J. E. Castaldo, A. D. Whittemore, R. E. Harbaugh, R. J. Dempsey, L. R. Caplan, T. F. Kresowik, D. B. Matchar, J. F. Toole, J. D. Easton, H. P. Adams, Jr., L. M. Brass, R. W. Hobson, 2nd, T. G. Brott and L. Sternau (1998). "Guidelines for carotid endarterectomy: a statement for healthcare professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association." Circulation **97**(5): 501-509.
Cattaneo, M. (2004). "Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(11): 1980-1987.
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**(4): 551-563.
Cazenave, J. P., M. A. Packham and J. F. Mustard (1973). "Adherence of platelets to a collagen-coated surface: development of a quantitative method." J Lab Clin Med **82**(6): 978-990.
Cheung, L. S., X. Zheng, A. Stopa, J. C. Baygents, R. Guzman, J. A. Schroeder, R. L. Heimark and Y. Zohar (2009). "Detachment of captured cancer cells under flow acceleration in a bio-functionalized microchannel." Lab Chip **9**(12): 1721-1731.
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**(11): 3146-3155.
Eckly, A., B. Hechler, M. Freund, M. Zerr, J. P. Cazenave, F. Lanza, P. H. Mangin and C. Gachet (2011). "Mechanisms underlying FeCl3-induced arterial thrombosis." J Thromb Haemost **9**(4): 779-789.
Gay, M. and L. T. Zhang (2009). "Numerical studies of blood flow in healthy, stenosed, and stented carotid arteries." International Journal for Numerical Methods in Fluids **61**(4): 453-472.
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." Thromb Haemost **55**(3): 415-435.
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." J Biol Chem **280**(15): 15430-15437.
Gorg, C., B. Wollenberg and J. Beyer (2001). "Reversed portal vein pulsatility on Doppler ultrasound secondary to an iatrogenic mediastinal haematoma." Br J Radiol **74**(886): 962-964.
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**(1): 173-184.
Holdsworth, D. W., C. J. Norley, R. Frayne, D. A. Steinman and B. K. Rutt (1999). "Characterization of common carotid artery blood-flow waveforms in normal human subjects." Physiol Meas **20**(3): 219-240.
Houdart, E., C. Mounayer, R. Chapot, J. P. Saint-Maurice and J. J. Merland (2001). "Carotid stenting for radiation-induced stenoses: A report of 7 cases." Stroke **32**(1): 118-121.

Konno, S. (2005). Influence of blod flow waveform created by upvad on endocardial viability ratio and myocardial tissue perfusion. Artif Organs. **29:** 777.
Labarthe, B., J. Babin, M. Bryckaert, P. Theroux and A. Bonnefoy (2012). "Effects of P2Y(1) receptor antagonism on the reactivity of platelets from patients with stable coronary artery disease using aspirin and clopidogrel." Br J Pharmacol **166**(1): 221-231.
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**(6): 969-977.
McDonald, J. C., D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. Schueller and G. M. Whitesides (2000). "Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)." Electrophoresis **21**(1): 27-40.
Moake, J. L., N. A. Turner, N. A. Stathopoulos, L. Nolasco and J. D. Hellums (1988). "Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin." Blood **71**(5): 1366-1374.
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**(12): 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." Nat Med **15**(6): 665-673.
Peterson, D. M., N. A. Stathopoulos, T. D. Giorgio, J. D. Hellums and J. L. Moake (1987). "Shear-induced platelet aggregation requires von Willebrand factor and platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa." Blood **69**(2): 625-628.
Pozniak, M. A. (2009). "Spectral Doppler tracing of the main portal vein just before its junction with the TIPS.".
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**(4): 522-535.
Sakariassen, K. S., P. A. Bolhuis and J. J. Sixma (1980). "Platelet adherence to subendothelium of human arteries in pulsatile and steady flow." Thromb Res **19**(4-5): 547-559.
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." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(1): 117-124.
Sheriff, J., D. Bluestein, G. Girdhar and J. Jesty (2010). "High-shear stress sensitizes platelets to subsequent low-shear conditions." Ann Biomed Eng **38**(4): 1442-1450.
Tangelder, G. J., H. C. Teirlinck, D. W. Slaaf and R. S. Reneman (1985). "Distribution of blood platelets flowing in arterioles." Am J Physiol **248**(3 Pt 2): H318-323.
van Breugel, H. H., J. J. Sixma and R. M. Heethaar (1988). "Effects of flow pulsatility on platelet adhesion to subendothelium." Arteriosclerosis **8**(3): 332-335.
Vasku, J., J. Wotke, P. Dobsak, A. Baba, A. Rejthar, S. Kuchtickova, K. Imachi, Y. Abe, I. Saito, T. Isoyama, S. Nitta and T. Yambe (2007). "Acute and chronic consequences of non-pulsatile blood flow pattern in long-term total artificial heart experiment." Pathophysiology **14**(2): 87-95.
Xu, C. and D. M. Wootton (2004). "Platelet near-wall excess in porcine whole blood in artery-sized tubes under steady and pulsatile flow conditions." Biorheology **41**(2): 113-125.
Xu, Z., Nan Chen, Shawn C. Shadden, Jerrold E. Marsden, Malgorzata M. Kamocka, Elliot D. Rosen and Mark Alber (2009). "Study of blood flow impact on growth of thrombi using a multiscale model " Soft Matter **5**: 769-779.
Zhao, X. M., Y. P. Wu, H. X. Cai, R. Wei, T. Lisman, J. J. Han, Z. L. Xia and P. G. de Groot (2008). "The influence of the pulsatility of the blood flow on the extent of platelet adhesion." Thromb Res **121**(6): 821-825.

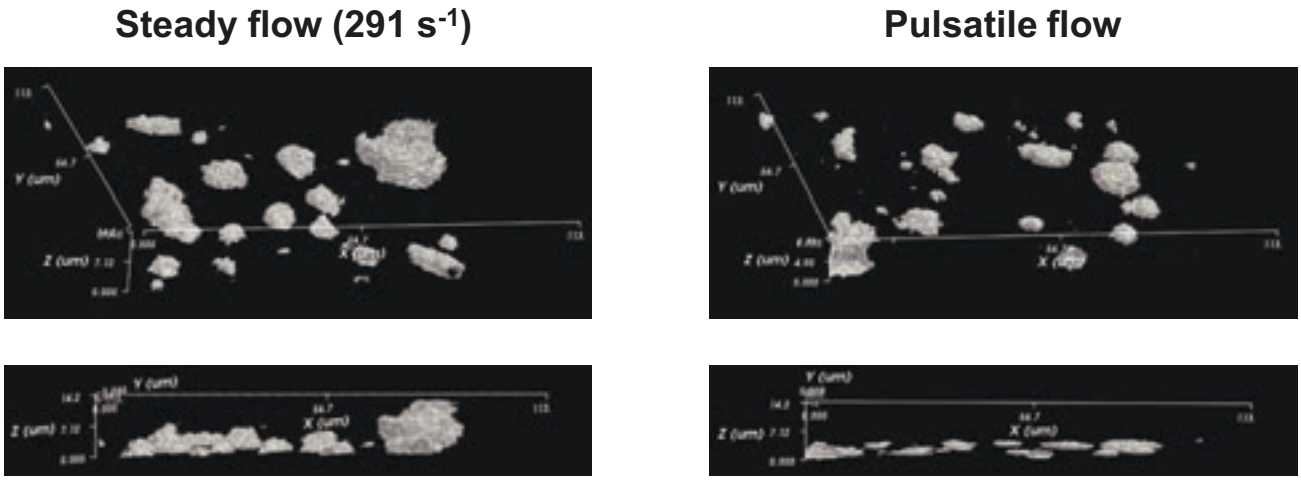
Figure 1

A.





B. Left coronary



C.

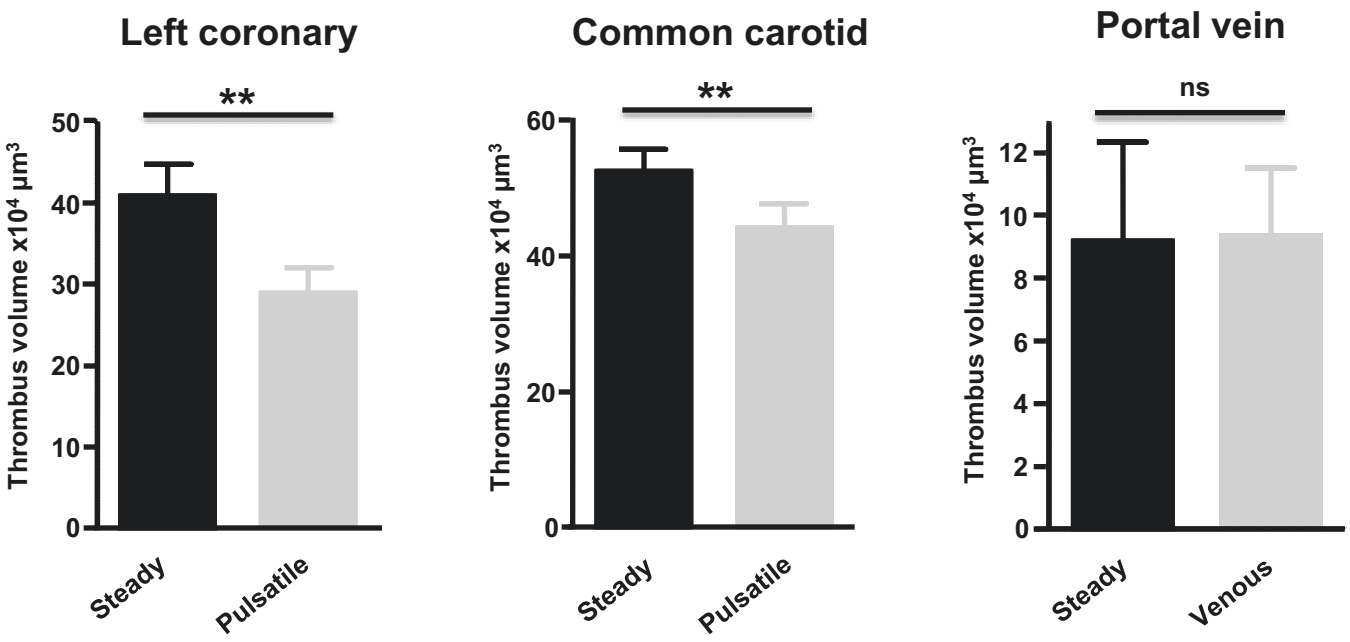

Left coronary
**
Thrombus volume x10⁴ µm³
50
40
30
20
10
0
Steady
Pulsatile
Common carotid
**
Thrombus volume x10⁴ µm³
60
40
20
0
Steady
Pulsatile
Portal vein
ns
Thrombus volume x10⁴ µm³
12
10
8
6
4
2
0
Steady
Venous

Figure 2

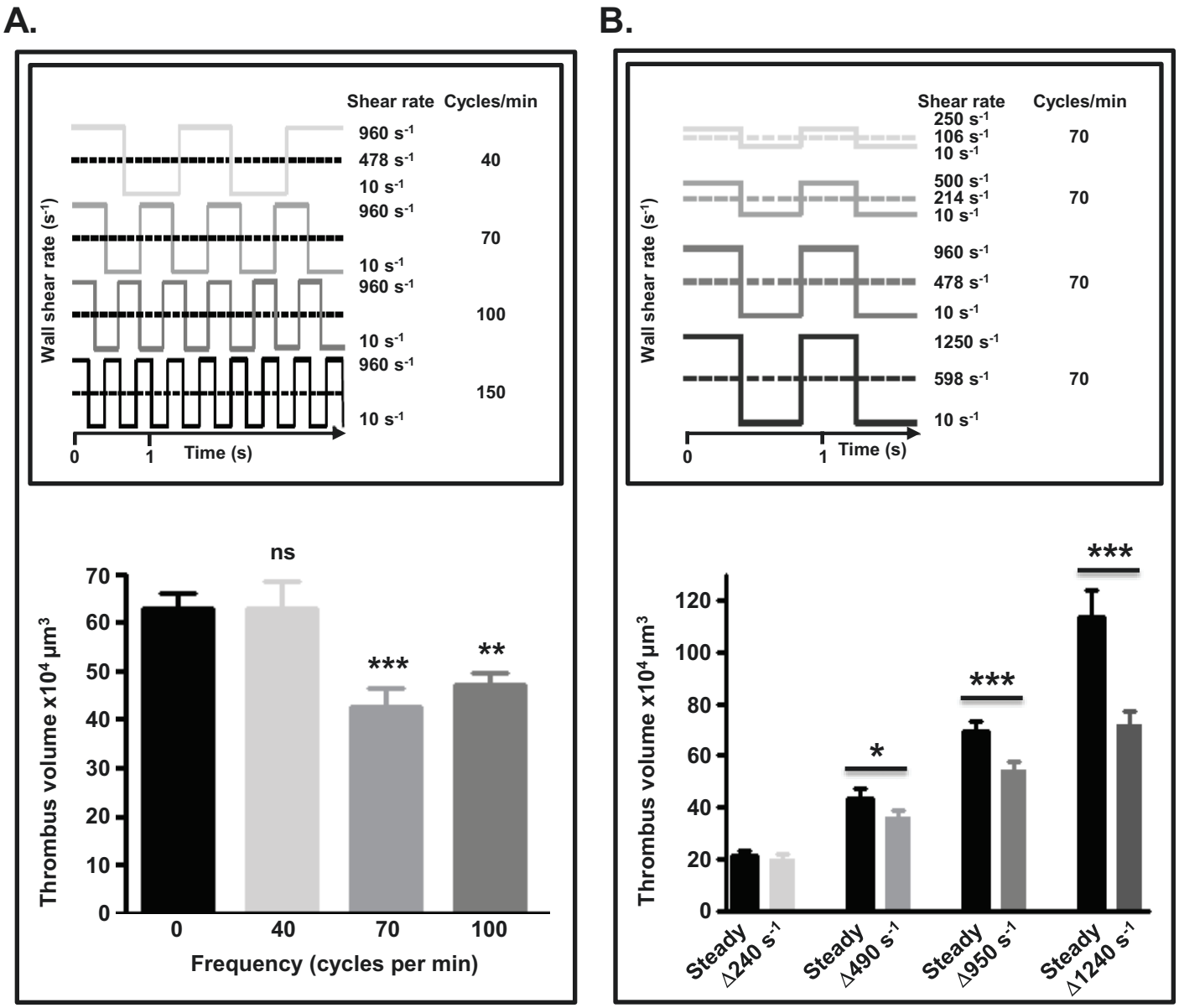
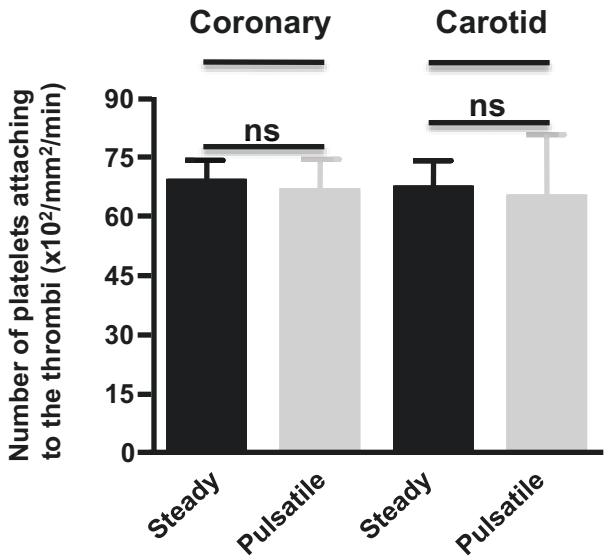
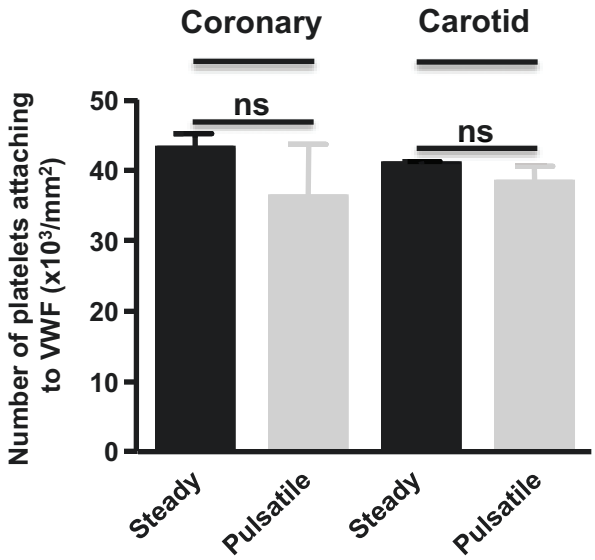
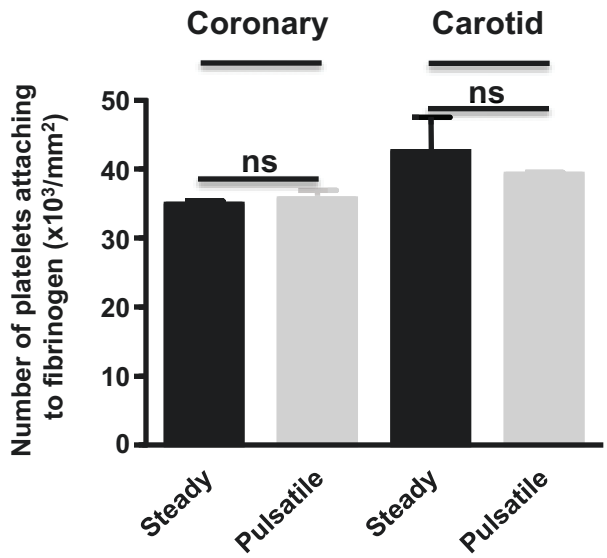
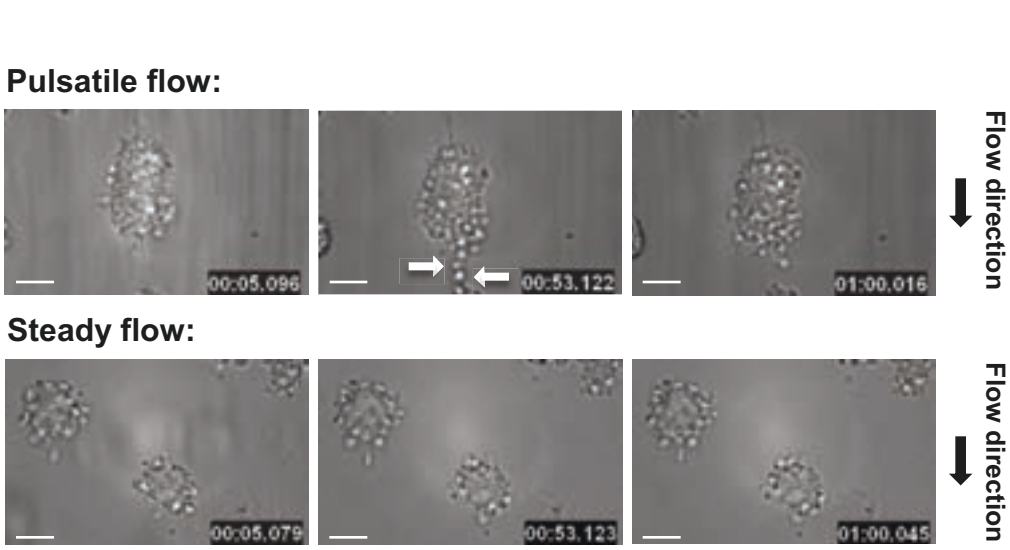

A.
Shear rate
Cycles/min
960 s-1
478 s-1
40
10 s-1
960 s-1
70
10 s-1
960 s-1
100
10 s-1
960 s-1
150
10 s-1
Wall shear rate (s-1)
0
1
Time (s)
ns
***
**
Thrombus volume x10^4 µm^3
0
40
70
100
Frequency (cycles per min)
B.
Shear rate
Cycles/min
250 s-1
106 s-1
10 s-1
70
500 s-1
214 s-1
10 s-1
70
960 s-1
478 s-1
10 s-1
70
1250 s-1
598 s-1
10 s-1
70
Wall shear rate (s-1)
0
1
Time (s)
*
***
***
Thrombus volume x10^4 µm^3
Steady
Δ240 s-1
Steady
Δ490 s-1
Steady
Δ950 s-1
Steady
Δ1240 s-1

Figure 3


A.
Coronary
Carotid
ns
ns
Number of platelets attaching to the thrombi (x10²/mm²/min)
90
75
60
45
30
15
0
Steady
Pulsatile
Steady
Pulsatile


B.
Coronary
Carotid
ns
ns
Number of platelets attaching to VWF (x10³/mm²)
50
40
30
20
10
0
Steady
Pulsatile
Steady
Pulsatile


C.
Coronary
Carotid
ns
ns
Number of platelets attaching to fibrinogen (x10³/mm²)
50
40
30
20
10
0
Steady
Pulsatile
Steady
Pulsatile


D.
Pulsatile flow:
00:05.096
00:53.122
01:00.016
Flow direction
Steady flow:
00:05.079
00:53.123
01:00.045
Flow direction

E.

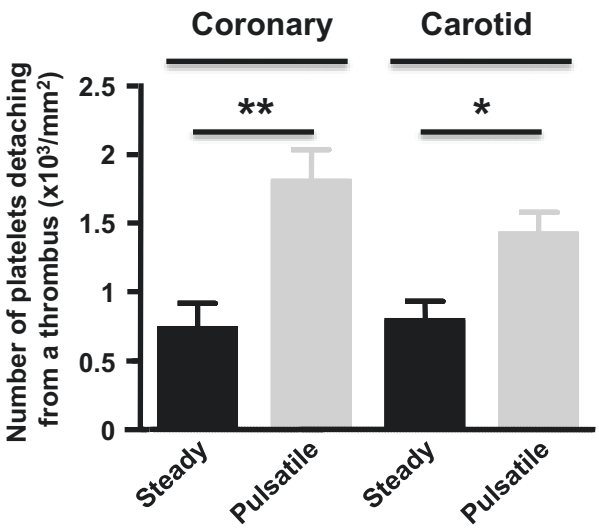

Coronary
Carotid
**
*
Number of platelets detaching from a thrombus (x10³/mm²)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Steady
Pulsatile
Steady
Pulsatile

Figure 4

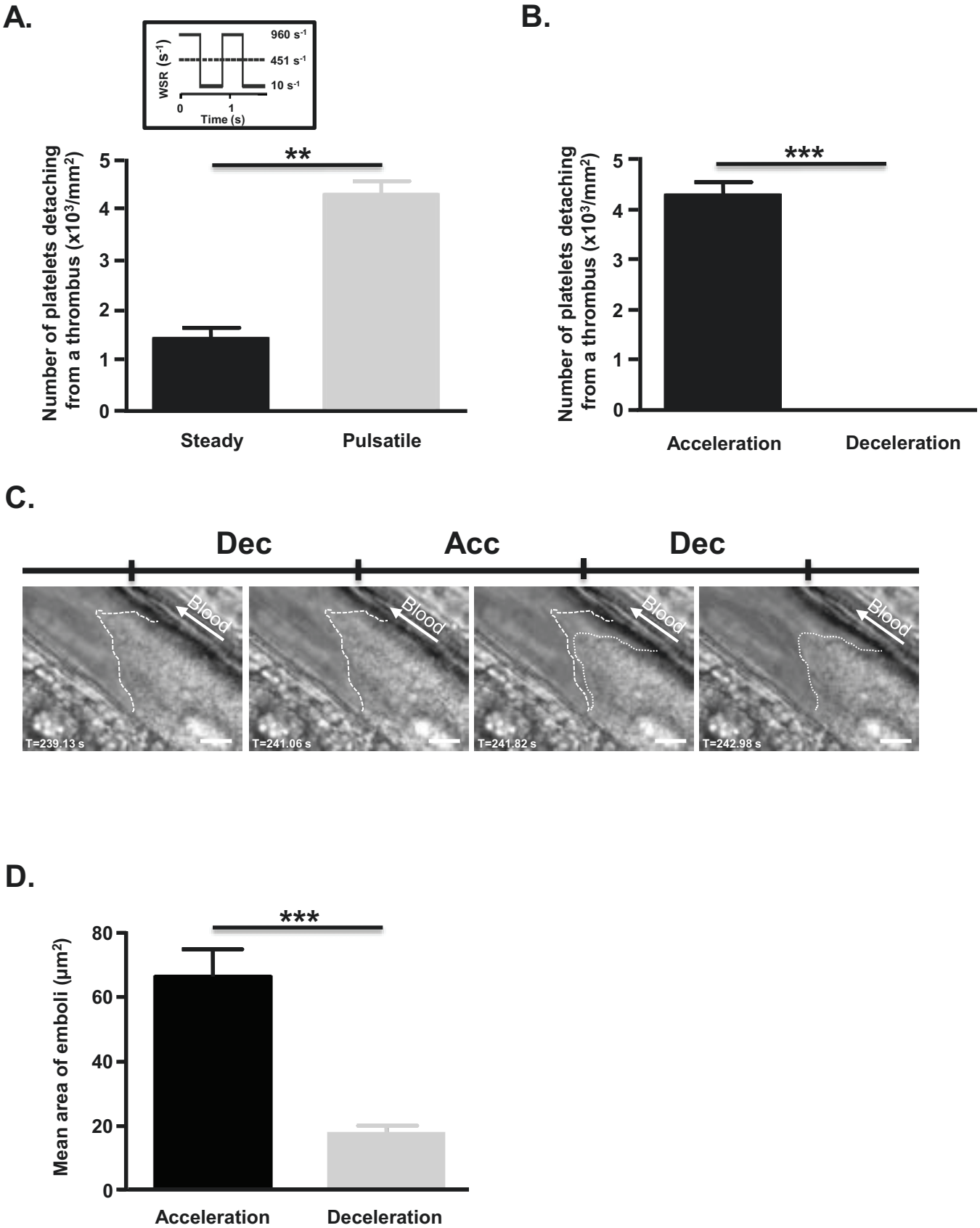

A.
960 s-1
451 s-1
10 s-1
WSR (s-1)
0
1
Time (s)
**
Number of platelets detaching from a thrombus (x10³/mm²)
0
1
2
3
4
5
Steady
Pulsatile
B.
***
Number of platelets detaching from a thrombus (x10³/mm²)
Acceleration
Deceleration
C.
Dec
Acc
Dec
Blood
T=239.13 s
T=241.06 s
T=241.82 s
T=242.98 s
D.
***
Mean area of emboli (µm²)
0
20
40
60
80
Acceleration
Deceleration

Figure 5

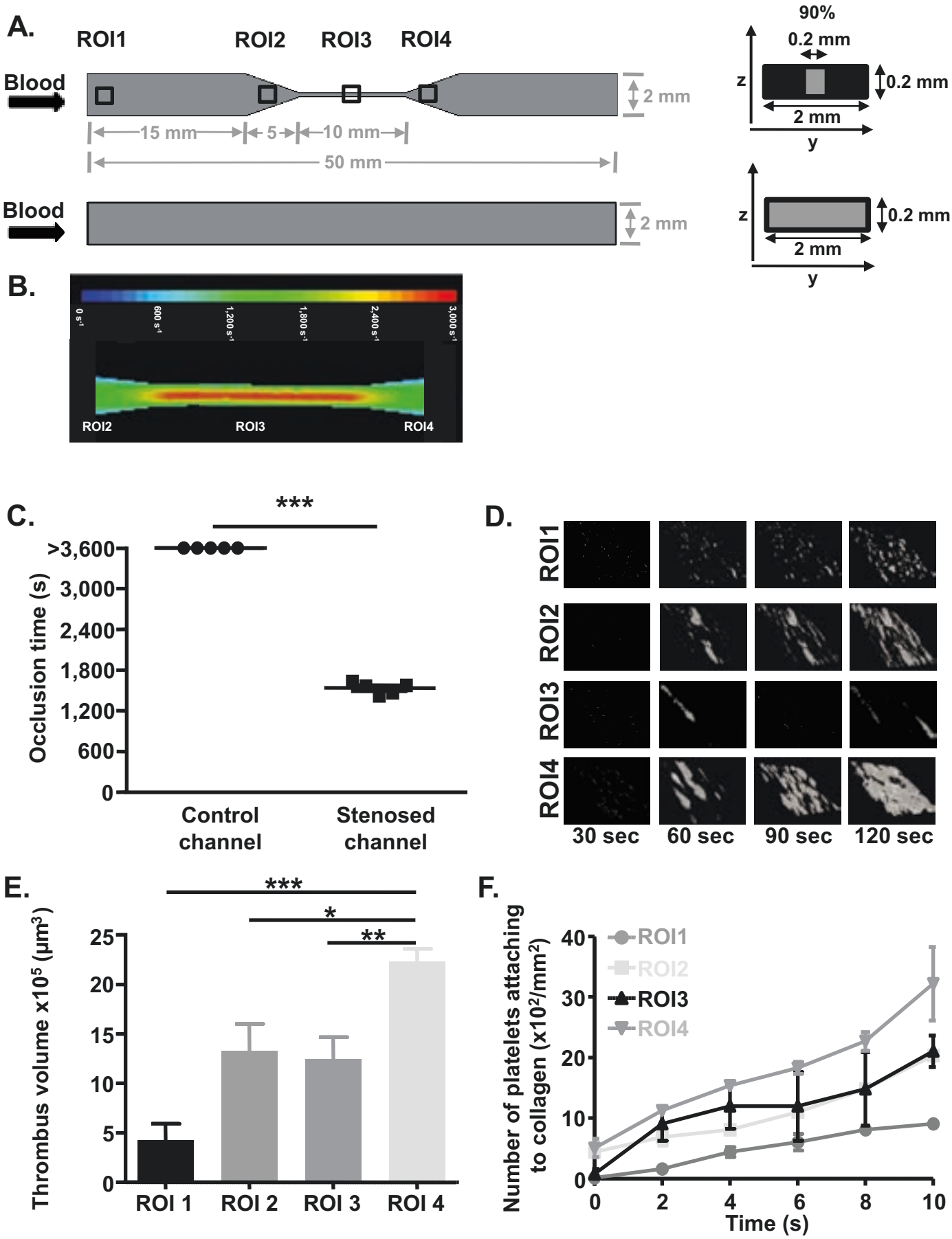

A.
ROI1
ROI2
ROI3
ROI4
Blood
2 mm
15 mm
5
10 mm
50 mm
Blood
2 mm
90%
0.2 mm
z
0.2 mm
2 mm
y
z
0.2 mm
2 mm
y
B.
0 s-1
600 s-1
1,200 s-1
1,800 s-1
2,400 s-1
3,000 s-1
ROI2
ROI3
ROI4
C.
***
>3,600
3,000
2,400
1,800
1,200
600
0
Occlusion time (s)
Control channel
Stenosed channel
D.
ROI1
ROI2
ROI3
ROI4
30 sec
60 sec
90 sec
120 sec
E.
***
*
**
25
20
15
10
5
0
Thrombus volume x10^5 (µm^3)
ROI 1
ROI 2
ROI 3
ROI 4
F.
ROI1
ROI2
ROI3
ROI4
40
30
20
10
0
Number of platelets attaching to collagen (x10^2/mm^2)
0
2
4
6
8
10
Time (s)

Figure 6

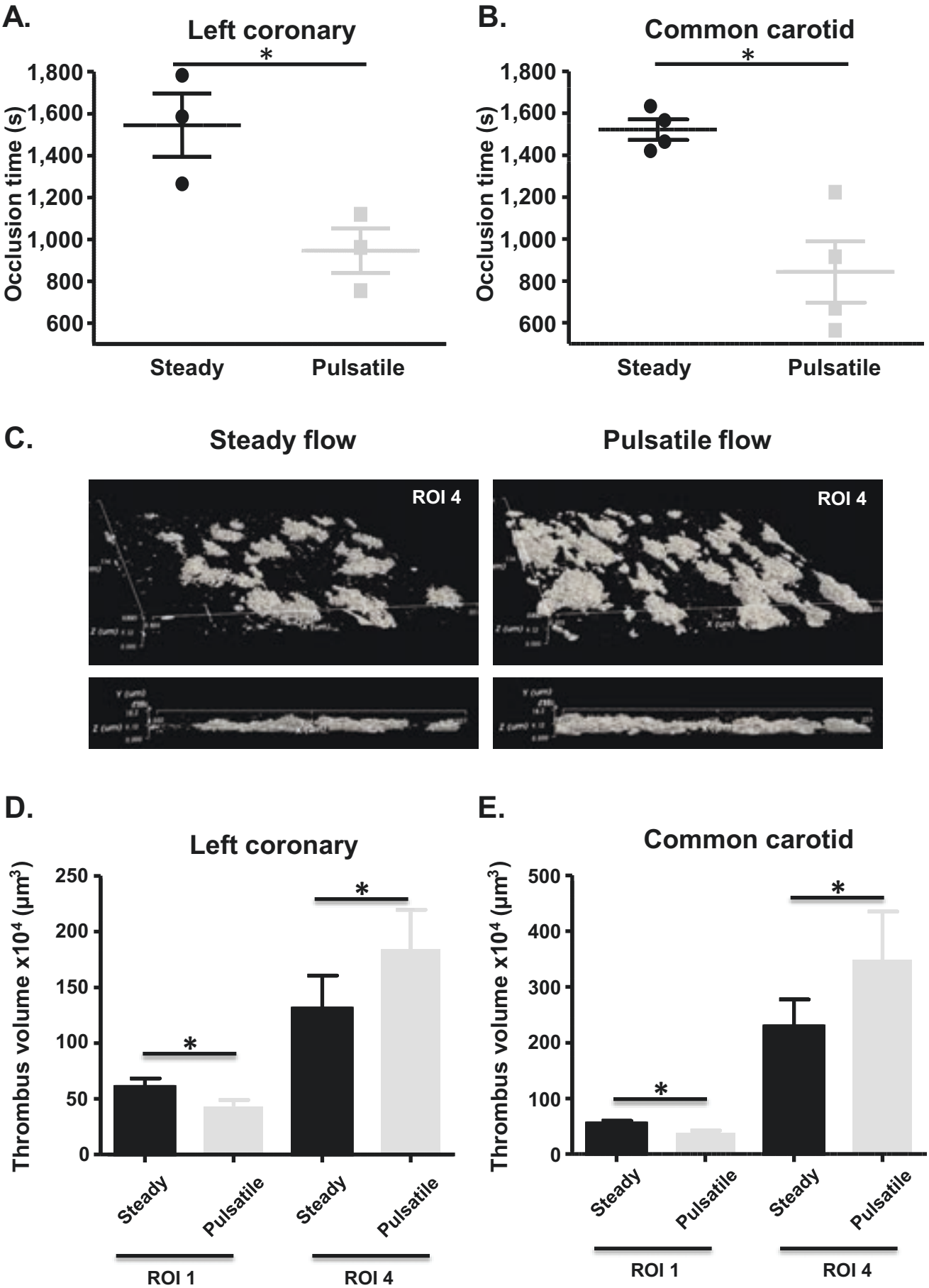
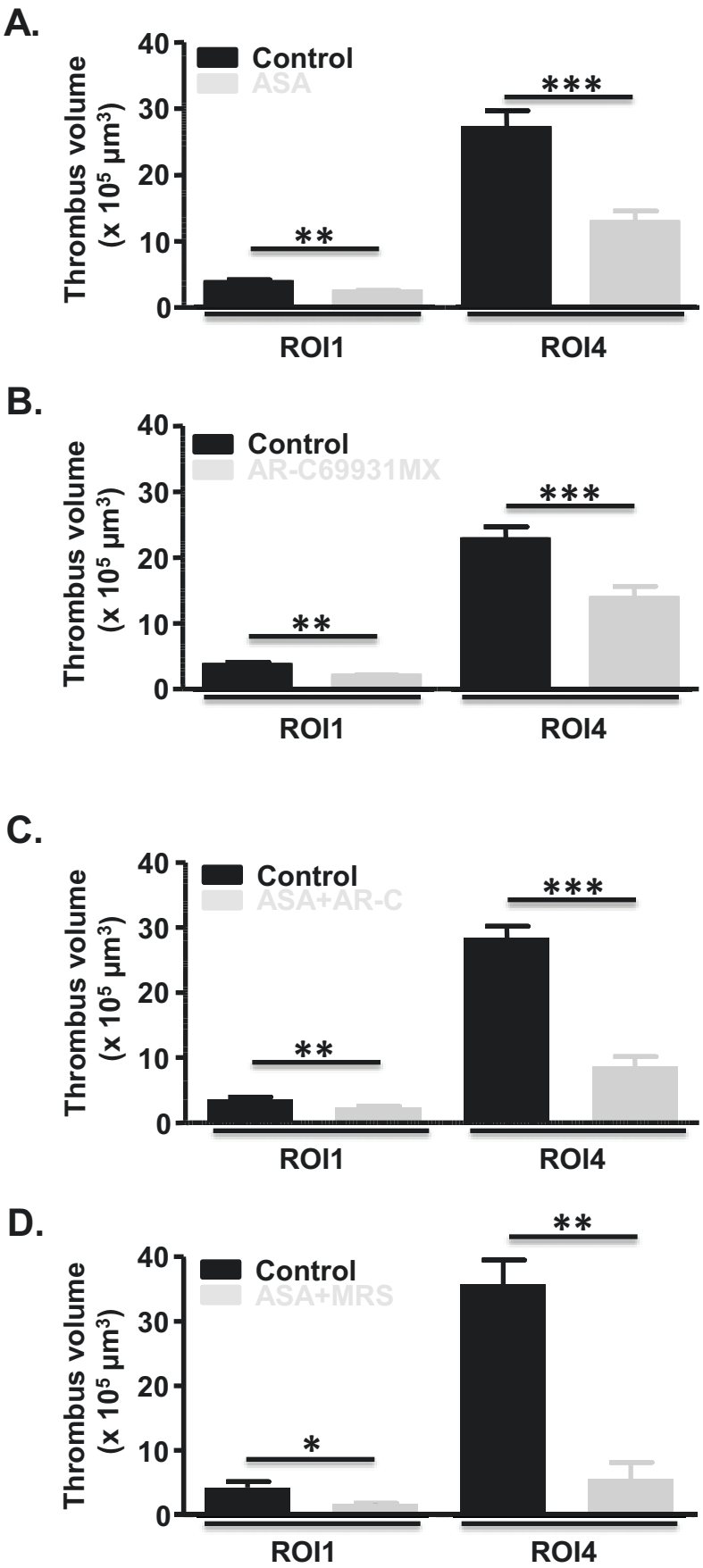
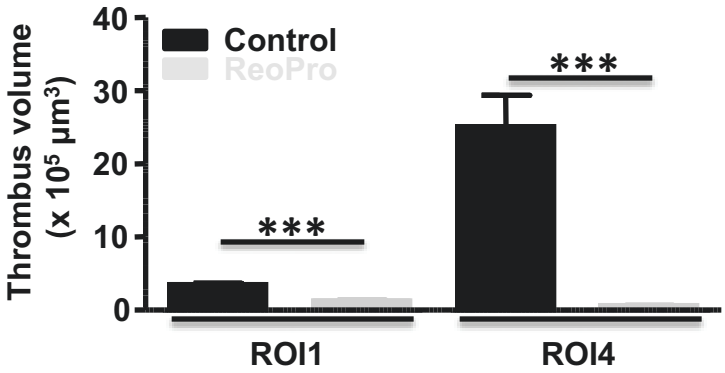

A.
Left coronary
*
Occlusion time (s)
1,800
1,600
1,400
1,200
1,000
800
600
Steady
Pulsatile
B.
Common carotid
*
Occlusion time (s)
1,800
1,600
1,400
1,200
1,000
800
600
Steady
Pulsatile
C.
Steady flow
Pulsatile flow
ROI 4
ROI 4
D.
Left coronary
Thrombus volume x10⁴ (µm³)
250
200
150
100
50
0
*
*
Steady
Pulsatile
Steady
Pulsatile
ROI 1
ROI 4
E.
Common carotid
Thrombus volume x10⁴ (µm³)
500
400
300
200
100
0
*
*
Steady
Pulsatile
Steady
Pulsatile
ROI 1
ROI 4

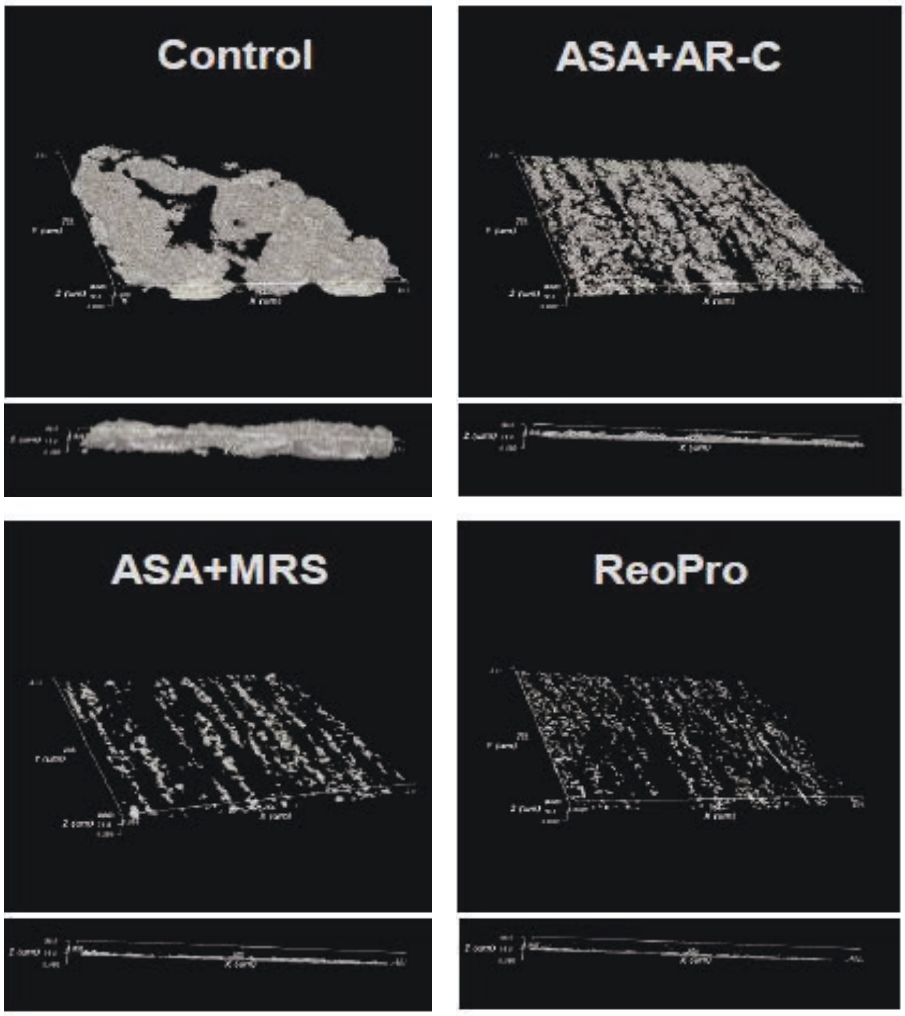
Figure 7


A.
Control
ASA
Thrombus volume
(x 10⁵ µm³)
40
30
20
10
0
**
***
ROI1
ROI4
B.
Control
AR-C69931MX
Thrombus volume
(x 10⁵ µm³)
40
30
20
10
0
**
***
ROI1
ROI4
C.
Control
ASA+AR-C
Thrombus volume
(x 10⁵ µm³)
40
30
20
10
0
**
***
ROI1
ROI4
D.
Control
ASA+MRS
Thrombus volume
(x 10⁵ µm³)
40
30
20
10
0
*
**
ROI1
ROI4

E.


Thrombus volume
(x 10⁵ µm³)
40
30
20
10
0
Control
ReoPro
***
***
ROI1
ROI4

F.


Control
ASA+AR-C
ASA+MRS
ReoPro

Conclusion

Les résultats indiquent qu'un régime de flux pulsatile carotidien ou coronarien réduit le volume des thrombi formés en comparaison d'un flux constant contrôle. Une analyse par vidéo-microscopie a montré que la pulsatilité n'influence pas le recrutement des plaquettes, mais favorise leur détachement qui survient préférentiellement durant les phases d'accélération du flux. L'utilisation de la chambre sténosée a montré qu'à flux constant, le volume des agrégats était fortement augmenté au niveau de la zone post-sténotique par rapport à une région droite. De manière surprenante, l'application d'un flux pulsatile ne diminue pas mais au contraire augmente le volume des agrégats dans cette région. De plus la combinaison de l'aspirine et de l'ARC-39931MX réduit plus efficacement la thrombose dans la région post-sténotique en comparaison de la région contrôle. En combinaison à l'aspirine, un anti-$P2Y_1$ inhibe d'avantage la thrombose qu'un anti-$P2Y_{12}$. Ces résultats suggèrent un rôle inverse de la pulsatilité du flux sanguin sur la croissance des thrombi en conditions physiologiques et pathologiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Suite à une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent, s'activent puis agrègent pour former un clou plaquettaire qui stoppe les saignements **(Versteeg, Heemskerk et al. 2013)**. Les plaquettes jouent également un rôle clef lors de la thrombose artérielle, qui survient suite à l'érosion ou à la rupture d'une plaque d'athérosclérose et qui mène à la formation d'un thrombus. Dans des conditions où le flux sanguin est altéré par la présence d'une sténose, le thrombus formé peut devenir occlusif et entrainer des complications ischémiques graves comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral, qui constituent la première cause de mortalité dans le monde **(OMS 2011)**. Les traitements actuels ciblent les phases d'activation et d'agrégation plaquettaires. Ils ont permis de réduire de manière significative la mortalité cardiovasculaire au cours des vingt dernières années, mais présentent des limites, telles que la récurrence d'événements vasculaires ischémiques et le risque de saignement **(Michelson 2010, Yousuf and Bhatt 2011)**. Un certain nombre d'études indiquent que le ciblage des étapes initiales d'adhérence et d'activation des plaquettes pourrait constituer une stratégie anti-thrombotique intéressante **(Kiefer and Becker 2009)**. Notamment, il a été montré que l'absence ou l'inhibition du complexe GPIb-V-IX, de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ ou de la GPVI diminuent la formation d'agrégats *in vivo* dans différents modèles expérimentaux de thrombose artérielle et ceci sans impacter les temps de saignement **(Wu, Meiring et al. 2002, Massberg, Konrad et al. 2004, Kuijpers, Pozgajova et al. 2007)**. D'autres études indiquent que le blocage de GPIb-V-IX ou de la GPVI réduit la taille des zones infarcies dans un modèle d'accident vasculaire cérébral, sans entrainer d'hémorragies intracrâniennes **(Kleinschnitz, Pozgajova et al. 2007, Goebel, Li et al. 2013)**. Ces données soulignant l'importance de la GPVI et de l'axe GPIbα/FW en thrombose ont mené au développement d'agents pharmacologiques qui font l'objet d'études cliniques **(Markus, McCollum et al. 2011, National Institutes of Health 2012)**. Des études de phase II ont montré que l'ARC1179, un aptamère qui bloque l'interaction GPIbα/FW, réduit la fréquence de formation d'emboles cérébraux après endarterectomie carotidienne **(Markus, McCollum et al. 2011)**.

Mon travail de thèse s'est focalisé sur les étapes initiales d'adhérence et d'activation des plaquettes pour évaluer la pertinence de leur ciblage. Je me suis intéressé : i) au ciblage de la GPIbβ du complexe GPIb-V-IX, ii) aux propriétés adhésives et activatrices de la fibronectine cellulaire fibrillaire, présente dans la paroi artérielle saine et malade et enfin iii)

au rôle de flux sanguins complexes sur la formation d'un thrombus, qu'ils soient pulsatiles ou altérées par une sténose.

Les résultats obtenus indiquent : i) que le ciblage de GPIbβ pourrait prévenir une thrombose en n'affectant que modérément l'hémostase, ii) que la forme cellulaire de la fibronectine pariétale constitue sous sa forme fibrillaire, une surface thrombogène entrainant l'activation, l'agrégation et l'activité pro-coagulante des plaquettes et iii) un rôle inverse du flux sanguin pulsatile, qui réduit le volume des agrégats dans des conditions mimant un vaisseau sain, et qui l'augmente dans la région post-sténotique. J'ai également observé le rôle important joué par les agonistes solubles, comme l'ADP et le TxA_2, dans la formation d'un thrombus au niveau d'une zone post-sténotique.

La première étude de ma thèse s'est focalisée sur l'étude du rôle du complexe GPIb-V-IX en thrombose artérielle. De nombreuses études basées sur des agents qui ciblent l'interaction entre la GPIbα et le FW, ont mis en lumière un rôle du complexe en thrombose artérielle **(Wu, Meiring et al. 2002)**. Un inconvénient de cette approche est que le blocage de l'axe GPIbα/FW entraine un risque de saignement **(Markus, McCollum et al. 2011)**. L'originalité de notre approche a consisté à cibler une autre sous-unité du complexe, la GPIbβ, dont le rôle est encore mal connu. Notre étude s'est appuyée sur un réactif unique développé au sein du laboratoire, l'anticorps RAM.1, dirigé contre le domaine extracellulaire de la GPIbβ **(Perrault, Moog et al. 2001)**. Nos résultats indiquent que RAM.1 inhibe efficacement la signalisation du complexe, la génération de thrombine et réduit la thrombose expérimentale chez la souris, sans prolonger le temps de saignement.

Le mécanisme par lequel RAM.1 inhibe la signalisation du complexe GPIb-V-IX résulte potentiellement de deux mécanismes qui pourraient coopérer. Le premier est lié à sa capacité à inhiber la liaison du FW à la GPIbα, et donc à réduire le déclenchement de signaux intracellulaires **(Perrault, Moog et al. 2001, Lanza, Gachet et al. 2008)**. Un second mécanisme pourrait résulter de la capacité de RAM.1 à lier directement le domaine extracellulaire de la GPIbβ, une sous-unité décrite pour participer à la signalisation du complexe **(David, Strassel et al. 2010)**. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la liaison de RAM.1 réduit la phosphorylation de la sérine 166 du domaine intracellulaire de la GPIbβ, qui est un site d'interaction avec la protéine de signalisation 14-3-3ζ **(Perrault, Mangin et al. 2003)**. Des travaux menés au laboratoire avaient montré que cette protéine participe à la

signalisation menant à l'activation des intégrines, et plus récemment un autre groupe a proposé que la 14-3-3ζ serait également capable de véhiculer la signalisation menant à la mobilisation des stocks internes de Ca^{2+} **(Mangin, David et al. 2004, Zhang, Zhao et al. 2012).**

Nous avons montré que RAM.1 inhibe la génération de thrombine induite par le facteur tissulaire ou le collagène. Le rôle du complexe GPIb-V-IX dans la génération de thrombine est connu, et a été illustré par des études pionnières basées sur du sang de patients Bernard-Soulier qui montrent une diminution de la consommation de prothrombine **(Beguin, Keularts et al. 2004)**. L'implication du complexe dans la génération de thrombine semble indépendante du domaine extracellulaire de la GPIbα, car malgré sa capacité à lier des facteurs de coagulation comme le FXI, le FXII, le kininogène de haut poids moléculaire ou la thrombine, le clivage de la partie extracellulaire de cette sous-unité n'impacte pas la génération de thrombine **(Ravanat, Strassel et al. 2010)**. De manière surprenante, l'effet de RAM.1 est indépendant de l'exposition de phosphatidylsérine, des phospholipides chargés négativement qui favorisent l'assemblage des complexes enzymatiques et constituent le principal mécanisme utilisé par les plaquettes pour promouvoir la coagulation. Une hypothèse serait que l'effet de RAM.1 soit lié à sa capacité à inhiber la phosphorylation de la sérine 166 du domaine intracellulaire de la GPIbβ, ce qui pourrait impacter l'interaction du complexe avec la protéine 14-3-3ζ, qui a récemment été décrite pour participer à l'activité pro-coagulante des plaquettes **(D. van Der Wal 2013)**.

Un résultat majeur dans une optique anti-thrombotique, a été de montrer que RAM.1 inhibe la thrombose expérimentale dans deux modèles de lésion artérielle chez la souris. L'effet anti-thrombotique de RAM.1 résulte probablement de sa capacité à diminuer la liaison du FW à la GPIbα qui est responsable non seulement de l'étape initiale d'adhérence des plaquettes en conditions de flux élevé, mais qui participe également à la croissance du thrombus **(Kulkarni, Dopheide et al. 2000)**. Il est également possible que l'effet inhibiteur de RAM.1 sur la génération de thrombine participe à la diminution de la thrombose, particulièrement dans le modèle de lésion mécanique de l'aorte, qui est sensible aux inhibiteurs de thrombine **(Mangin, Yap et al. 2006)**. En ce qui concerne l'effet inhibiteur de RAM.1 sur la signalisation du complexe, son implication en thrombose reste spéculative. Cette signalisation est connue pour être de relativement faible intensité, mais présente l'avantage d'intervenir dans l'étape initiale d'adhérence des plaquettes au site de lésion et pourrait donc être particulièrement importante. A ce jour aucun acteur impliqué

exclusivement dans la signalisation du complexe n'a été identifié, rendant l'étude de son importance en thrombose, difficile à évaluer. Par ailleurs, l'effet anti-thrombotique de RAM.1 a été mis en évidence dans des modèles sur vaissseaux sains. Il serait intéressant d'évaluer son effet dans des modèles de thrombose sur plaque d'athérosclérose, qui semblent être plus proches des situations pathologiques. De tels modèles ont été mis au point dans notre laboratoire, et reposent sur une rupture de plaque d'athérosclérose de souris ApoE$^{-/-}$ par des ultrasons ou une aiguille **(Hechler and Gachet 2011).**

Une limite des traitements antiplaquettaires utilisés en clinique est qu'ils entrainent un risque de saignement. Des études avaient montré que le ciblage de la GPIbα diminuait la formation de thrombi en prolongeant peu ou pas le temps de saignement des animaux **(Fontayne, Meiring et al. 2008)**. Ces résultats précliniques encourageants avaient été corroborés dans des essais cliniques de phase I qui montrent que des agents comme l'ARC1779 et l'ALX-0081 qui ciblent l'interaction entre la GPIbα et le FW n'entrainent pas de problèmes hémorragiques et ne prolongent pas le temps de saignement de témoins sains **(Gilbert, DeFeo-Fraulini et al. 2007, Bartunek, Barbato et al. 2008, Bartunek, Barbato et al. 2010)**. En revanche, des essais cliniques de phase II indiquent que l'administration de l'ARC1179 s'accompagne de complications hémorragiques chez deux tiers des patients **(Markus, McCollum et al. 2011)**. Nos résultats indiquent que RAM.1 inhibe la thrombose sans prolonger le temps de saignement des souris. D'autres travaux sont nécessaires pour confirmer ces résultats chez l'animal et le développement d'agent, comme un anticorps RAM.1 humanisé, permettrait à plus long terme d'évaluer l'intérêt du ciblage de la GPIbβ chez l'homme en hémostase et en thrombose artérielle.

Un second travail a porté sur l'étude de la réactivité de la FN, une protéine abondamment exprimée dans la paroi artérielle saine et malade. Cette glycoprotéine est présente sous deux formes, la FN cellulaire et la FN plasmatique, qui se retrouvent toutes deux dans une conformation fibrillaire dans la paroi du vaisseau. Nos résultats ont montré que la fibronectine cellulaire fibrillaire (FNcF) constitue une surface thrombogène qui assure une adhérence, activation, agrégation et activité pro-coagulante efficace des plaquettes.

Les protéines assurant l'adhérence plaquettaire sont classiquement subdivisées en deux sous-groupes en fonction de leur réactivité : i) les protéines de réactivité faible, telles que le FW, le fibrinogène, les laminines et la FN plasmatique dimérique, qui permettent uniquement l'adhérence de plaquettes individuelles; et ii) les protéines de réactivité forte, qui se résument aux collagènes fibrillaires, principalement de type I et III, qui assurent une adhérence et une activation importante des plaquettes, menant à leur agrégation **(Beumer, MJ et al. 1994, Savage, Saldivar et al. 1996, Jurk, Clemetson et al. 2003, Schaff, Tang et al. 2013)**. Cette étude a montré qu'à cette liste de protéines de réactivité forte, s'ajoute également les formes fibrillaires des FN cellulaire et plasmatique. Le gain de réactivité des formes fibrillaires par rapport aux formes dimériques de FN pourrait de par leur structure multimérique, résulter d'une concentration de sites de liaison sur une surface restreinte, augmentant ainsi l'avidité des cellules pour cette glycoprotéine. Le lien entre la nature multimérique d'une molécule et sa réactivité est connue pour d'autres protéines adhésives, dont les meilleurs exemples sont les collagènes **(Morton, Peachey et al. 1994, Savage, Ginsberg et al. 1999)**.

La raison pour laquelle la FNpF forme des thrombi plus petits que la forme cellulaire fibrillaire semble indépendante de la formation de fibres, qui apparaissent équivalentes en termes de structure et de quantité. Une hypothèse serait que la réactivité augmentée de la FNcF soit due à la présence des extradomaines A et B qui sont absents de la FNpF **(To and Midwood 2011**). Ceci pourrait expliquer l'effet inhibiteur d'un anticorps dirigé contre le TLR4, un récepteur de l'EDA, qui réduit la formation de thrombi sur FNcF mais pas sur FNpF, suggérant que l'interaction TLR4/EDA pourrait promouvoir la croissance du thrombus **(Okamura, Watari et al. 2001, Zhang, Han et al. 2009)**. Concernant le mécanisme d'action de TLR4, il semble indépendant d'une capacité à recruter directement les plaquettes sur la FNcF immobilisée. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec ceux décrits pour d'autres types cellulaires comme les cellules cancéreuses, où le TLR4 ne participe pas directement aux processus d'adhérence cellulaire, mais régule l'activation. La suite de l'étude va consister à définir la voie de signalisation déclenchée par TLR4 après adhérence des plaquettes sur FNcF. Nous avons déjà montré que l'inhibition de TLR4 ne réduit pas la signalisation calcique, et la suite du travail consistera à évaluer le rôle d'acteurs des voies PI-3K/AKT et NFκB, qui sont classiquement décrits en aval de TLR4 **(Kawai and Akira 2006, Hsu, Chan et al. 2011, Rivadeneyra, Carestia et al. 2013)**.

Le blocage de la GPVI réduit le volume des thrombi formés sur FNcF sans affecter l'étape initiale d'adhérence et la signalisation calcique. Ceci suggère de manière surprenante

que la GPVI participe à la croissance du thrombus en régulant les interactions plaquette/plaquette **(Bergmeier, Piffath et al. 2006)**. En effet, les études réalisées à ce jour suggèrent que son rôle soit limité aux processus d'interaction et d'activation au contact de matrices du sous-endothélium, principalement le collagène **(Kato, Kanaji et al. 2003, Massberg, Gawaz et al. 2003)**. Nos résultats sont toutefois en accord avec un travail récent montrant que la GPVI n'intervient pas dans l'étape initiale de formation du thrombus, mais participe au processus de stabilisation, après lésion des artérioles mésentériques par le $FeCl_3$ **(Bender, Hagedorn et al. 2011)**. Il sera intéressant de comprendre par quel mécanisme la GPVI intervient dans la croissance du thrombus, en essayant d'identifier un ligand plasmatique ou un contre récepteur.

Les FN fibrillaires, tout comme les collagènes fibrillaires, représentent une surface thrombogène assurant l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes. Contrairement aux collagènes fibrillaires de type I et III, qui sont principalement situés dans les couches internes de la paroi vasculaire et sont de ce fait, exposés uniquement après une lésion profonde, les FN fibrillaires sont retrouvées dans les trois tuniques de la paroi vasculaire : l'intima, la média et l'adventice **(Farquharson and Robins 1989, Moretti, Chauhan et al. 2007, Singh, Carraher et al. 2010)**. Ceci a pour conséquence, qu'elles pourraient contribuer à la formation d'un clou hémostatique quelle que soit la profondeur de la lésion vasculaire. D'autre part, la FNcF étant surexprimée au niveau des lésions athéromateuses, elle pourrait également participer à la thrombose artérielle après une rupture de plaque d'athérosclérose, et donc représenter une cible anti-thrombotique intéressante **(Matter, Schuler et al. 2004)**. Si le rôle de la FN plasmatique circulante en thrombose artérielle a déjà été évalué et reste sujet à controverse, d'autres études sont nécessaires pour évaluer la pertinence du ciblage de la FN pariétale **(Ni, Yuen et al. 2003, Reheman, Yang et al. 2009)**. Une approche consisterait à cibler l'interaction entre les plaquettes et la FN en utilisant des agents dirigés contre l'intégrine $\alpha_5\beta_1$.

Dans une troisième étude, nous avons montré que dans les conditions hémodynamiques d'un vaisseau sain, un régime de flux pulsatile réduit le volume des agrégats plaquettaires en comparaison à un flux constant. En revanche, dans un contexte de flux pathologique, retrouvé au niveau d'une zone post-sténotique où la thrombose est plus importante, un flux pulsatile ne diminue pas, mais au contraire augmente le volume des thrombi. Nous avons également montré, que le thrombus localisé au niveau post-sténotique était dépendant des agonistes solubles, comme l'ADP et le TxA_2.

Cette étude indique que les flux pulsatiles rencontrés au niveau des artères saines mènent à la formation d'agrégats moins volumineux que des flux constants. Ces résultats sont en accord avec un récent travail *in silico* de modélisation de la dynamique des fluides (computational fluid dynamics), qui a révélé qu'un flux pulsatile entraine une croissance d'agrégats inférieure à un flux contrôle (**Xu 2009**). Un flux pulsatile peut être considéré comme un enchaînement d'accélération et de décélération. L'observation, en temps réel à la fois *in vitro* sur des agrégats préformés et *in vivo* chez la souris après une lésion laser d'artères mésentériques, montre que le détachement de plaquettes ou d'emboles se produit préférentiellement durant les phases d'accélération du flux. Ce résultat n'est pas vraiment surprenant, car c'est pendant les phases d'accélération que les forces de poussée exercées sur les plaquettes adhérentes sont les plus importantes. Ce résultat est également en accord avec une étude montrant *in vitro* que des accélérations de flux sont responsables du détachement de cellules cancéreuses adhérentes via la N-cadhérine (**Cheung, Zheng et al. 2009**). Au niveau moléculaire, nos résultats suggèrent que les forces appliquées pendant les phases d'accélération d'un flux pulsatile pourraient dépasser la capacité de résistance des liens inter-plaquettaires, notamment $\alpha_{IIb}\beta_3$/fibrinogène, qui sont essentiels pour maintenir les plaquettes ancrées dans un agrégat.

Dans des conditions de flux pathologique, dans une chambre de perfusion présentant une sténose sévère de 90 %, notre étude montre que l'accumulation des plaquettes est maximale dans la zone post-sténotique, où elle conduit à l'occlusion du canal. Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux utilisant également des chambres microfluidiques contenant des rétrécissements, où la formation de thrombi est maximale au niveau post-sténotique **(Nesbitt, Westein et al. 2009, Tovar-Lopez, Rosengarten et al. 2013, Westein, van der Meer et al. 2013)**. Ces études *in vitro* et *in vivo* sont en accord avec les données d'observations d'angiogrammes d'artères carotides et rénales, révélant que le thrombus au niveau de la zone post-sténotique est très volumineux **(Houdart, Mounayer et al. 2001, Arabi, Vellody et al.**

2011). Une analyse *in vitro* par vidéo-microscopie de la thrombose augmentée au niveau de la région post-sténotique, indique que cette accumulation accrue s'explique en partie par une adhérence plaquettaire initiale plus importante que dans les autres régions de la chambre. Le mécanisme impliqué n'est pas connu mais pourrait correspondre à un processus de priming des plaquettes. Il a été décrit que des plaquettes exposées à des flux élevés sont sensibilisées et s'activent plus rapidement que des plaquettes soumises à des taux de cisaillement faibles (**Sheriff, Bluestein et al. 2010**). Cette activation pourrait permettre d'augmenter l'affinité des intégrines de la famille β_1 et β_3 pour leurs protéines adhésives et ainsi permettre le recrutement accru de plaquettes circulantes. Une autre hypothèse repose sur la présence de flux perturbés avec des événements de recirculation ou vortex, permettant de prolonger l'action des agonistes solubles (ADP, TxA_2) produits localement, favorisant le recrutement et l'activation des plaquettes **(Bluestein, Gutierrez et al. 1999, Jackson, Nesbitt et al. 2009)**.

Alors que la pulsatilité réduit la taille des agrégats dans des conditions mimant un vaisseau sain, elle augmente le volume des thrombi dans des conditions pathologiques. Le mécanisme impliqué n'est pas clair, mais pourrait être lié à la capacité de la pulsatilité à augmenter la margination (**Xu and Wootton 2004**). Ce processus est connu pour repousser les plaquettes vers la paroi vasculaire, facilitant leur adhérence **(Tangelder, Teirlinck et al. 1985, Goldsmith and Turitto 1986, Aarts, van den Broek et al. 1988)**.

Notre étude montre que les agonistes solubles, l'ADP et le TxA_2, jouent un rôle important dans la thrombose augmentée observée au niveau post-stenotique. De manière intéressante, l'association d'aspirine et d'un antagoniste du $P2Y_1$ inhibe d'avantage la thrombose qu'un inhibiteur du $P2Y_{12}$ comme l'AR-C69931MX. Ce résultat est en accord avec l'observation que la combinaison aspirine/anti-$P2Y_1$ réduit plus efficacement l'agrégation plaquettaire dans un agrégomètre et dans un système de perfusion de sang sur collagène, qu'une combinaison aspirine/anti-$P2Y_{12}$, qui représente la thérapie utilisée en clinique pour prévenir et traiter la thrombose artérielle **(Labarthe, Babin et al. 2012)**. D'autres études sont nécessaires pour confirmer ce résultat dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ouvrent un certain nombre de perspectives appliquées. Le ciblage de la GPIbβ, pourrait permettre de diminuer la thrombose sans affecter l'hémostase et pourrait donc constituer une stratégie anti-thrombotique potentiellement plus sûre. De plus, la mise en lumière de la thrombogénicité de la FN fibrillaire sous-endothéliale, ouvre le champ à une autre perspective pharmacologique anti-thrombotique, consistant à cibler l'interaction entre les plaquettes et la FN. Enfin, les chambres microfluidiques contenant ou non des rétrécissements développés durant ce travail de thèse pourraient constituer des outils (i) de diagnostic permettant d'identifier des pathologies hémorragiques, (ii) d'évaluation de l'efficacité du traitement anti-thrombotique chez des patients traités par différents médicaments antiplaquettaires utilisés en clinique ou (iii) de criblage de nouveaux agents pharmacologiques.

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**(6): 819-824.
Acharya, S. S. and D. M. Dimichele (2008). "Rare inherited disorders of fibrinogen." Haemophilia **14**(6): 1151-1158.
Addison, W. (1842). "Experimental Researches on the Blood Corpuscle." Prov Med J Retrosp Med Sci **4**(99): 403-407.
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." J Clin Invest **92**(1): 288-296.
Aird, W. C. (2005). "Spatial and temporal dynamics of the endothelium." J Thromb Haemost **3**(7): 1392-1406.
Aitken, A. (2006). "14-3-3 proteins: a historic overview." Semin Cancer Biol **16**(3): 162-172.
Akiyama, S. K., S. S. Yamada, W. T. Chen and K. M. Yamada (1989). "Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization." J Cell Biol **109**(2): 863-875.
Alquwaizani, M., L. Buckley, C. Adams and J. Fanikos (2013). "Anticoagulants: A Review of the Pharmacology, Dosing, and Complications." Current Emergency and Hospital Medicine Reports **1**(2): 83-97.
Ancrenaz, V., Y. Daali, P. Fontana, M. Besson, C. Samer, P. Dayer and J. Desmeules (2010). "Impact of genetic polymorphisms and drug-drug interactions on clopidogrel and prasugrel response variability." Curr Drug Metab **11**(8): 667-677.
Andrews, R. K., S. J. Harris, T. McNally and M. C. Berndt (1998). "Binding of purified 14-3-3 zeta signaling protein to discrete amino acid sequences within the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex." Biochemistry **37**(2): 638-647.
Angiolillo, D. J., D. Capodanno and S. Goto (2010). "Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis." Eur Heart J **31**(1): 17-28.
Antithrombotic Trialists, C. (2002). "Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients." BMJ **324**(7329): 71-86.
Arabi, M., R. Vellody and K. Cho (2011). "Acute Renal Artery Occlusion with Prolonged Renal Ischemia: A Case of Successful Treatment with Stent Placement and Catheter-directed Thrombolysis." J Clin Imaging Sci **1**(11): 2156-7514.
Ariga, T., T. Miyatake and R. K. Yu (2010). "Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related disorders: amyloidogenesis and therapeutic strategies--a review." J Neurosci Res **88**(11): 2303-2315.
Arikawa-Hirasawa, E., W. R. Wilcox, A. H. Le, N. Silverman, P. Govindraj, J. R. Hassell and Y. Yamada (2001). "Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene." Nat Genet **27**(4): 431-434.
Arthur, J. F., S. Dunkley and R. K. Andrews (2007). "Platelet glycoprotein VI-related clinical defects." Br J Haematol **139**(3): 363-372.
Askari, J. A., P. A. Buckley, A. P. Mould and M. J. Humphries (2009). "Linking integrin conformation to function." J Cell Sci **122**(Pt 2): 165-170.
ATC (1994). "Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration." BMJ **308**(6921): 81-106.
Atkinson, B., K. Dwyer, K. Enjyoji and S. C. Robson (2006). "Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets." Blood Cells Mol Dis **36**(2): 217-222.

Attias, D., B. Besse and N. Lellouche (2013). Médecine K-Cardiologie vasculaire. Paris, VERNAZOBRES GREGO.
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**(5): 326-332.
Aumailley, M. and N. Smyth (1998). "The role of laminins in basement membrane function." J Anat **193**(Pt 1): 1-21.
Aumailley, M. and P. Verrando (1993). "Structure et pathologie des membranes absales." Médecine/Sciences **9**: 926-933.
Baglia, F. A., K. O. Badellino, C. Q. Li, J. A. Lopez and P. N. Walsh (2002). "Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin." J Biol Chem **277**(3): 1662-1668.
Baigent, C., L. Blackwell, R. Collins, J. Emberson, J. Godwin, R. Peto, J. Buring, C. Hennekens, P. Kearney, T. Meade, C. Patrono, M. C. Roncaglioni and A. Zanchetti (2009). "Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials." Lancet **373**(9678): 1849-1860.
Barash, P. and S. Akhtar (2010). "Coronary stents: factors contributing to perioperative major adverse cardiovascular events." Br J Anaesth **105 Suppl 1**: i3-15.
Bartunek, J., E. Barbato, J. B. Holz, K. Vercruysse, H. Ulrichts, 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. Vercruysse, 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**.
Bastida, E., G. Escolar, A. Ordinas and J. J. Sixma (1987). "Fibronectin is required for platelet adhesion and for thrombus formation on subendothelium and collagen surfaces." Blood **70**(5): 1437-1442.
Beguin, S., I. Keularts, R. Al Dieri, S. Bellucci, J. Caen and H. C. Hemker (2004). "Fibrin polymerization is crucial for thrombin generation in platelet-rich plasma in a VWF-GPIb-dependent process, defective in Bernard-Soulier syndrome." J Thromb Haemost **2**(1): 170-176.
Bender, M., I. Hagedorn and B. Nieswandt (2011). "Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl(3) -induced thrombosis." J Thromb Haemost **9**(7): 1423-1426.
Bender, M., I. Hagedorn and B. Nieswandt (2011). Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl(3) -induced thrombosis, J Thromb Haemost. 2011 Jul;9(7):1423-6. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04328.x.
Bennett, J. S. (2005). "Structure and function of the platelet integrin alphaIIbbeta3." J Clin Invest **115**(12): 3363-3369.
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 GPIbalpha far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(45): 16900-16905.
Berkes, E. A. (2003). "Anaphylactic and anaphylactoid reactions to aspirin and other NSAIDs." Clin Rev Allergy Immunol **24**(2): 137-148.
Berndt, M. C., Y. Shen, S. M. Dopheide, E. E. Gardiner and R. K. Andrews (2001). "The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex." Thromb Haemost **86**(1): 178-188.
Berne, R. M. and M. D. Levy (2001). Cardiovascular Physiology - 8 edition Mosby.
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**(8): 2811-2818.
Beumer, S., G. J. Heijnen-Snyder, I. J. MJ, P. G. de Groot and J. J. Sixma (2000). "Fibronectin in an extracellular matrix of cultured endothelial cells supports platelet adhesion via its ninth type III repeat : A comparison with platelet adhesion to isolated fibronectin." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(4): E16-25.
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**(9): 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**(11): 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-Ribaudo, J. Booth and E. J. Topol (2006). "Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events." N Engl J Med **354**(16): 1706-1717.
Bhatt, D. L., A. M. Lincoff, C. M. Gibson, G. W. Stone, S. McNulty, G. Montalescot, N. S. Kleiman, S. G. Goodman, H. D. White, K. W. Mahaffey, C. V. Pollack, Jr., S. V. Manoukian, P. Widimsky, D. P. Chew, F. Cura, I. Manukov, F. Tousek, M. Z. Jafar, J. Arneja, S. Skerjanec, R. A. Harrington and C. P. Investigators (2009). "Intravenous platelet blockade with cangrelor during PCI." N Engl J Med **361**(24): 2330-2341.
Biondi-Zoccai, G. G., M. Lotrionte, M. Anselmino, C. Moretti, P. Agostoni, L. Testa, A. Abbate, J. Cosgrave, A. Laudito, G. P. Trevi and I. Sheiban (2008). "Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials appraising the impact of cilostazol after percutaneous coronary intervention." Am Heart J **155**(6): 1081-1089.
Bledzka, K., S. S. Smyth and E. F. Plow (2013). "Integrin alphaIIbbeta3: from discovery to efficacious therapeutic target." Circ Res **112**(8): 1189-1200.
Bluestein, D., C. Gutierrez, M. Londono and R. T. Schoephoerster (1999). "Vortex shedding in steady flow through a model of an arterial stenosis and its relevance to mural platelet deposition." Ann Biomed Eng **27**(6): 763-773.
Boersma, E., R. A. Harrington, D. J. Moliterno, H. White, P. Theroux, F. Van de Werf, A. de Torbal, P. W. Armstrong, L. C. Wallentin, R. G. Wilcox, J. Simes, R. M. Califf, E. J. Topol and M. L. Simoons (2002). "Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials." Lancet **359**(9302): 189-198.
Bolar, N., L. Van Laer and B. L. Loeys (2012). "Marfan syndrome: from gene to therapy." Curr Opin Pediatr **24**(4): 498-504.

Boneu, B. and J. P. Cazenave (1997). Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose - 2ème édition. Reims, édition Alinéa**:** 281.
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**(3): 955-964.
Bou-Gharios, G., M. Ponticos, V. Rajkumar and D. Abraham (2004). "Extra-cellular matrix in vascular networks." Cell Prolif **37**(3): 207-220.
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**(9782): 2013-2022.
Bradford, H. N., R. A. Pixley and R. W. Colman (2000). "Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation." J Biol Chem **275**(30): 22756-22763.
Brinkhous, K. M., D. S. Barnes, J. Y. Potter and M. S. Read (1981). "Von Willebrand syndrome induced by a Bothrops venom factor: bioassay for venom coagglutinin." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(5): 3230-3234.
Bultmann, 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**(3): 532-542.
Burkhart, J. M., M. Vaudel, S. Gambaryan, S. Radau, U. Walter, L. Martens, J. Geiger, A. Sickmann and R. P. Zahedi (2012). "The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways." Blood **120**(15): 2012-2004.
Bustos, M., T. M. Coffman, S. Saadi and J. L. Platt (1997). "Modulation of eicosanoid metabolism in endothelial cells in a xenograft model. Role of cyclooxygenase-2." J Clin Invest **100**(5): 1150-1158.
Campbell, C. L., S. Smyth, G. Montalescot and S. R. Steinhubl (2007). "Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease: a systematic review." JAMA **297**(18): 2018-2024.
Cannon, C. P., R. A. Harrington, S. James, D. Ardissino, R. C. Becker, H. Emanuelsson, S. Husted, H. Katus, M. Keltai, N. S. Khurmi, F. Kontny, B. S. Lewis, P. G. Steg, R. F. Storey, D. Wojdyla and L. Wallentin (2010). "Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study." Lancet **375**(9711): 283-293.
CAPRIE (1996). "A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee." Lancet **348**(9038): 1329-1339.
Casari, C., E. Berrou, M. Lebret, F. Adam, A. Kauskot, R. Bobe, C. Desconclois, E. Fressinaud, O. D. Christophe, P. J. Lenting, J. P. Rosa, C. V. Denis and M. Bryckaert (2013). "von Willebrand factor mutation promotes thrombocytopathy by inhibiting integrin alphaIIbbeta3." J Clin Invest **123**(12): 5071-5081.
Castellanos, M., R. Leira, J. Serena, M. Blanco, S. Pedraza, J. Castillo and A. Davalos (2004). "Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke." Stroke **35**(7): 1671-1676.
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." J Pharmacol Exp Ther **326**(1): 51-58.

Cattaneo, M. (2011). "Molecular defects of the platelet P2 receptors." Purinergic Signal **7**(3): 333-339.
Cattaneo, M. and E. M. Faioni (2012). "Why does ticagrelor induce dyspnea?" Thromb Haemost **108**(6): 1031-1036.
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**(6): 881-898.
Chauhan, A. K., J. Kisucka, M. R. Cozzi, M. T. Walsh, F. A. Moretti, M. Battiston, M. Mazzucato, L. De Marco, F. E. Baralle, D. D. Wagner and A. F. Muro (2008). "Prothrombotic effects of fibronectin isoforms containing the EDA domain." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(2): 296-301.
Chen, X., C. Xie, N. Nishida, Z. Li, T. Walz and T. A. Springer (2010). "Requirement of open headpiece conformation for activation of leukocyte integrin alphaXbeta2." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(33): 14727-14732.
Cheung, L. S., X. Zheng, A. Stopa, J. C. Baygents, R. Guzman, J. A. Schroeder, R. L. Heimark and Y. Zohar (2009). "Detachment of captured cancer cells under flow acceleration in a bio-functionalized microchannel." Lab Chip **9**(12): 1721-1731.
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." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(11): 2143-2149.
Cho, J. and D. F. Mosher (2006). "Impact of fibronectin assembly on platelet thrombus formation in response to type I collagen and von Willebrand factor." Blood **108**(7): 2229-2236.
Cho, J. and D. F. Mosher (2006). "Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation." J Thromb Haemost **4**(7): 1461-1469.
Clemetson, J. M., J. Polgar, E. Magnenat, T. N. Wells and K. J. Clemetson (1999). "The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors." J Biol Chem **274**(41): 29019-29024.
Clemetson, K. J. and J. M. Clemetson (2008). "Platelet GPIb complex as a target for anti-thrombotic drug development." Thromb Haemost **99**(3): 473-479.
Coller, B. S. (1995). "Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy." Circulation **92**(9): 2373-2380.
Consonni, A., L. Cipolla, G. Guidetti, I. Canobbio, E. Ciraolo, 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**(3): 847-856.
Coughlin, S. R. (2000). "Thrombin signalling and protease-activated receptors." Nature **407**(6801): 258-264.
Cranmer, S. L., K. J. Ashworth, Y. Yao, M. C. Berndt, Z. M. Ruggeri, R. K. Andrews and S. P. Jackson (2011). "High shear-dependent loss of membrane integrity and defective platelet adhesion following disruption of the GPIbalpha-filamin interaction." Blood **117**(9): 2718-2727.
Cranmer, S. L., I. Pikovski, P. Mangin, P. E. Thompson, T. Domagala, M. Frazzetto, H. H. Salem and S. P. Jackson (2005). "Identification of a unique filamin A binding region within the cytoplasmic domain of glycoprotein Ibalpha." Biochem J **387**(Pt 3): 849-858.
Cussenot, O. (2002). Anatomie pratique PCEM1, VERNAZOBRES GREGO.
D. van Der Wal, S. C., H. Ramshaw, S. Schoenwaelder, Y. Yuan, E. Gardiner, M. Berndt, R. Andrews, A. Lopez, SP. Jackson (2013). "14-3-3ζ regulates the procoagulant function of platelets." ISTH 2013.

Danen, E. H. and A. Sonnenberg (2003). "Integrins in regulation of tissue development and function." J Pathol **201**(4): 632-641.
Darling, D. L., J. Yingling and A. Wynshaw-Boris (2005). "Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development." Curr Top Dev Biol **68**: 281-315.
Davi, G., F. Santilli and N. Vazzana (2012). "Thromboxane receptors antagonists and/or synthase inhibitors." Handb Exp Pharmacol(210): 261-286.
David, T., C. Strassel, A. Eckly, J. P. Cazenave, C. Gachet and F. Lanza (2010). "The platelet glycoprotein GPIbbeta intracellular domain participates in von Willebrand factor induced-filopodia formation independently of the Ser 166 phosphorylation site." J Thromb Haemost **8**(5): 1077-1087.
De Berardis, G., G. Lucisano, A. D'Ettorre and et al. (2012). "ASsociation of aspirin use with major bleeding in patients with and without diabetes." JAMA **307**(21): 2286-2294.
De Candia, E. (2012). "Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history." Thromb Res **129**(3): 250-256.
De Candia, E., S. W. Hall, S. Rutella, R. Landolfi, R. K. Andrews and R. De Cristofaro (2001). "Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets." J Biol Chem **276**(7): 4692-4698.
De Cristofaro, R., E. De Candia, S. Rutella and J. I. Weitz (2000). "The Asp(272)-Glu(282) region of platelet glycoprotein Ibalpha interacts with the heparin-binding site of alpha-thrombin and protects the enzyme from the heparin-catalyzed inhibition by antithrombin III." J Biol Chem **275**(6): 3887-3895.
De Jaeger, C. and P. Cherin (2012). "Matrice extracellulaire, physiologie et vieillissement vasculaire." Médecine et longévité **4**(1): 41-53.
De Paepe, A. and F. Malfait (2012). "The Ehlers-Danlos syndrome, a disorder with many faces." Clin Genet **82**(1): 1-11.
Deppermann, C., D. Cherpokova, P. Nurden, J.-N. Schulz, I. Thielmann, P. Kraft, xF, T. gtle, C. Kleinschnitz, xFc, S. tting, G. Krohne, S. A. Eming, A. T. Nurden, B. Eckes, G. Stoll, D. Stegner and B. Nieswandt (2013). "Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice." The Journal of Clinical Investigation **123**(8): 3331-3342.
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." J Pharmacol Exp Ther **304**(2): 855-861.
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): 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**(7): 1155-1162.
Du, X. (2007). "Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex." Curr Opin Hematol **14**(3): 262-269.
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**(10): 3902-3906.
Dumont, B., D. Lasne, C. Rothschild, M. Bouabdelli, V. Ollivier, C. Oudin, N. Ajzenberg, B. Grandchamp and M. Jandrot-Perrus (2009). "Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations." Blood **114**(9): 1900-1903.

Eckes, B., M. C. Zweers, Z. G. Zhang, R. Hallinger, C. Mauch, M. Aumailley and T. Krieg (2006). "Mechanical tension and integrin alpha 2 beta 1 regulate fibroblast functions." J Investig Dermatol Symp Proc **11**(1): 66-72.
Eikenboom, J. C. (2001). "Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology." Best Pract Res Clin Haematol **14**(2): 365-379.
Elluru, R. G., J. M. Contreras and D. M. Albert (2013). "Management of manifestations of epidermolysis bullosa." Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg **21**(6): 588-593.
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**(11): 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**(4): 882-890.
Erickson, H. P. and N. A. Carrell (1983). "Fibronectin in extended and compact conformations. Electron microscopy and sedimentation analysis." J Biol Chem **258**(23): 14539-14544.
Exposito, J. Y., C. Cluzel, R. Garrone and C. Lethias (2002). "Evolution of collagens." Anat Rec **268**(3): 302-316.
Ezumi, Y., K. Shindoh, M. Tsuji and H. Takayama (1998). "Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets." J Exp Med **188**(2): 267-276.
Farquharson, C. and S. P. Robins (1989). "Immunolocalization of collagen types I and III in the arterial wall of the rat." Histochem J **21**(3): 172-178.
Fedosov, D. A., W. Pan, B. Caswell, G. Gompper and G. E. Karniadakis (2011). "Predicting human blood viscosity in silico." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(29): 11772-11777.
Ferdous, Z., S. B. Peterson, H. Tseng, D. K. Anderson, R. V. Iozzo and K. J. Grande-Allen (2010). "A role for decorin in controlling proliferation, adhesion, and migration of murine embryonic fibroblasts." J Biomed Mater Res A **93**(2): 419-428.
Fontayne, A., M. Meiring, S. Lamprecht, J. Roodt, E. Demarsin, P. Barbeaux and H. Deckmyn (2008). "The humanized anti-glycoprotein Ib monoclonal antibody h6B4-Fab is a potent and safe antithrombotic in a high shear arterial thrombosis model in baboons." Thromb Haemost **100**(4): 670-677.
Furie, B. and B. C. Furie (2008). "Mechanisms of thrombus formation." N Engl J Med **359**(9): 938-949.
Gachet, C. (2006). "Regulation of platelet functions by P2 receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 277-300.
Gachet, C. (2012). "P2Y(12) receptors in platelets and other hematopoietic and non-hematopoietic cells." Purinergic Signal **8**(3): 609-619.
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**(4): 453-472.
Geberhiwot, T., D. Assefa, J. Kortesmaa, S. Ingerpuu, C. Pedraza, Z. Wondimu, J. Charo, R. Kiessling, I. Virtanen, K. Tryggvason and M. Patarroyo (2001). "Laminin-8 (alpha4beta1gamma1) is synthesized by lymphoid cells, promotes lymphocyte migration and costimulates T cell proliferation." J Cell Sci **114**(Pt 2): 423-433.
Geberhiwot, T., S. Ingerpuu, C. Pedraza, M. Neira, U. Lehto, I. Virtanen, J. Kortesmaa, K. Tryggvason, E. Engvall and M. Patarroyo (1999). "Blood platelets contain and secrete laminin-8 (alpha4beta1gamma1) and adhere to laminin-8 via alpha6beta1 integrin." Exp Cell Res **253**(2): 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**(4): 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**(17): 983-986.
Giannarelli, C., M. U. Zafar and J. J. Badimon (2010). "Prostanoid and TP-receptors in atherothrombosis: is there a role for their antagonism?" Thromb Haemost **104**(5): 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**(23): 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." J Biol Chem **284**(49): 33750-33762.
Gitz, E., C. D. Koopman, A. Giannas, C. A. Koekman, D. J. van den Heuvel, H. Deckmyn, J. W. Akkerman, H. C. Gerritsen and R. T. Urbanus (2013). "Platelet interaction with von Willebrand factor is enhanced by shear-induced clustering of glycoprotein Ibalpha." Haematologica **98**(11): 1810-1818.
Goebel, S., Z. Li, J. Vogelmann, H. P. Holthoff, H. Degen, D. M. Hermann, M. Gawaz, M. Ungerer and G. Munch (2013). "The GPVI-Fc fusion protein Revacept improves cerebral infarct volume and functional outcome in stroke." PLoS One **8**(7).
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." Thromb Haemost **55**(3): 415-435.
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." J Biol Chem **280**(15): 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**(6): 1911-1918.
Goto, S., Y. Ikeda, E. Saldivar and Z. M. Ruggeri (1998). "Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions." J Clin Invest **101**(2): 479-486.
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**(1): 106-116.
Greiling, D. and R. A. Clark (1997). "Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix." J Cell Sci **110 (Pt 7)**: 861-870.
Gresele, P. and S. Momi (2012). "Inhibitors of the interaction between von Willebrand factor and platelet GPIb/IX/V." Handb Exp Pharmacol **210**: 287-309.
Gross, B. S., S. K. Melford and S. P. Watson (1999). "Evidence that phospholipase C-gamma2 interacts with SLP-76, Syk, Lyn, LAT and the Fc receptor gamma-chain after stimulation of the collagen receptor glycoprotein VI in human platelets." Eur J Biochem **263**(3): 612-623.

Gu, M., X. Xi, G. D. Englund, M. C. Berndt and X. Du (1999). "Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3) using a reconstituted mammalian cell expression model." J Cell Biol **147**(5): 1085-1096.
Guerrero, J. A., G. Shafirstein, S. Russell, K. I. Varughese, T. Kanaji, J. Liu, T. K. Gartner, W. Baumler, G. E. Jarvis and J. Ware (2008). "In vivo relevance for platelet glycoprotein Ibalpha residue Tyr276 in thrombus formation." J Thromb Haemost **6**(4): 684-691.
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**(5): 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." J Biol Chem **283**(43): 28795-28805.
Guidetti, G. F. and M. Torti (2012). "The Small GTPase Rap1b: A Bidirectional Regulator of Platelet Adhesion Receptors." J Signal Transduct **412089**(10): 14.
Gurbel, P. A. and U. S. Tantry (2010). "Combination antithrombotic therapies." Circulation **121**(4): 569-583.
Habart, D., Y. Cheli, D. J. Nugent, Z. M. Ruggeri and T. J. Kunicki (2013). "Conditional knockout of integrin alpha2beta1 in murine megakaryocytes leads to reduced mean platelet volume." PLoS One **8**(1): 24.
Hahn, C. and M. A. Schwartz (2009). "Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 53-62.
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**(3): 979-1000.
Harburger, D. S. and D. A. Calderwood (2009). "Integrin signalling at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 2): 159-163.
Harrington, R. A., G. W. Stone, S. McNulty, H. D. White, A. M. Lincoff, C. M. Gibson, C. V. Pollack, Jr., G. Montalescot, K. W. Mahaffey, N. S. Kleiman, S. G. Goodman, M. Amine, D. J. Angiolillo, R. C. Becker, D. P. Chew, W. J. French, F. Leisch, K. H. Parikh, S. Skerjanec and D. L. Bhatt (2009). "Platelet inhibition with cangrelor in patients undergoing PCI." N Engl J Med **361**(24): 2318-2329.
Harrison, P. and E. M. Cramer (1993). "Platelet alpha-granules." Blood Rev **7**(1): 52-62.
Harrison, P., B. Wilbourn, N. Debili, W. Vainchenker, J. Breton-Gorius, A. S. Lawrie, J. M. Masse, G. F. Savidge and E. M. Cramer (1989). "Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets." J Clin Invest **84**(4): 1320-1324.
Hathaway, D. R. and R. S. Adelstein (1979). "Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(4): 1653-1657.
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**(10): 3652-3657.
Hechler, B. and C. Gachet (2011). "Comparison of two murine models of thrombosis induced by atherosclerotic plaque injury." Thromb Haemost **105**(1): 11-0730.
Hechler, B. and C. Gachet (2011). "P2 receptors and platelet function." Purinergic Signal **7**(3): 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." J Exp Med **198**(4): 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]." J Pharmacol Exp Ther **314**(1): 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**(1): 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)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice." J Pharmacol Exp Ther **316**(2): 556-563.
Heemskerk, J. W., W. M. Vuist, M. A. Feijge, C. P. Reutelingsperger and T. Lindhout (1997). "Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca2+ responses." Blood **90**(7): 2615-2625.
Hermans, C., C. Wittevrongel, C. Thys, P. A. Smethurst, C. Van Geet and K. Freson (2009). "A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder." J Thromb Haemost **7**(8): 1356-1363.
Hirsh, J., G. Guyatt, G. W. Albers, R. Harrington and H. J. Schünemann (2008). "Executive summary*: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition)." CHEST Journal **133**(6_suppl): 71S-109S.
Holme, P. A., U. Orvim, M. J. Hamers, N. O. Solum, F. R. Brosstad, R. M. Barstad and K. S. Sakariassen (1997). "Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(4): 646-653.
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." J Biol Chem **277**(13): 10789-10794.
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**(5): 239-248.
Houdart, E., C. Mounayer, R. Chapot, J. P. Saint-Maurice and J. J. Merland (2001). "Carotid stenting for radiation-induced stenoses: A report of 7 cases." Stroke **32**(1): 118-121.
Houdijk, W. P., P. G. de Groot, P. F. Nievelstein, K. S. Sakariassen and J. J. Sixma (1986). "Subendothelial proteins and platelet adhesion. von Willebrand factor and fibronectin, not thrombospondin, are involved in platelet adhesion to extracellular matrix of human vascular endothelial cells." Arteriosclerosis **6**(1): 24-33.
Houdijk, W. P. and J. J. Sixma (1985). "Fibronectin in artery subendothelium is important for platelet adhesion." Blood **65**(3): 598-604.
Howard, M. A. and B. G. Firkin (1971). "Ristocetin--a new tool in the investigation of platelet aggregation." Thromb Diath Haemorrh **26**(2): 362-369.
Hsu, R. Y., C. H. Chan, J. D. Spicer, M. C. Rousseau, B. Giannias, S. Rousseau and L. E. Ferri (2011). "LPS-induced TLR4 signaling in human colorectal cancer cells increases beta1 integrin-mediated cell adhesion and liver metastasis." Cancer Res **71**(5): 1989-1998.
Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.
Hynes, R. O. (2009). "The extracellular matrix: not just pretty fibrils." Science **326**(5957): 1216-1219.

Hynes, R. O., I. U. Ali, A. T. Destree, V. Mautner, M. E. Perkins, D. R. Senger, D. D. Wagner and K. K. Smith (1978). "A large glycoprotein lost from the surfaces of transformed cells." Ann N Y Acad Sci **312**: 317-342.
Ill, C. R., E. Engvall and E. Ruoslahti (1984). "Adhesion of platelets to laminin in the absence of activation." J Cell Biol **99**(6): 2140-2145.
Inomata, N. (2012). "Recent advances in drug-induced angioedema." Allergol Int **61**(4): 545-557.
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." J Cell Biol **160**(5): 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**(4): 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." J Biol Chem **283**(24): 16279-16282.
ISIS-2 (1988). "Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group." Lancet **2**(8607): 349-360.
Isles, C., J. Norrie, J. Paterson and L. Ritchie (1999). "Risk of major gastrointestinal bleeding with aspirin." The Lancet **353**(9147): 148-149.
Jackson, S. P. (2011). "Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly." Nat Med **17**(11): 1423-1436.
Jackson, S. P., W. S. Nesbitt and E. Westein (2009). "Dynamics of platelet thrombus formation." J Thromb Haemost **1**: 17-20.
James, P. D., D. Lillicrap and P. M. Mannucci (2013). "Alloantibodies in von Willebrand disease." Blood **122**(5): 636-640.
Jamieson, G. A. (1997). "Pathophysiology of platelet thrombin receptors." Thromb Haemost **78**(1): 242-246.
Janmey, P. A. and M. Schliwa (2008). "Rheology." Curr Biol **18**(15): R639-R641.
Jobin, F. (1995). La thrombose. Paris, éd. Maloine, 321 p.
Johnson, K. J., H. Sage, G. Briscoe and H. P. Erickson (1999). "The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions." J Biol Chem **274**(22): 15473-15479.
Joseph, K., Y. Nakazawa, W. F. Bahou, B. Ghebrehiwet and A. P. Kaplan (1999). "Platelet glycoprotein Ib: a zinc-dependent binding protein for the heavy chain of high-molecular-weight kininogen." Mol Med **5**(8): 555-563.
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**(11): 1490-1492.
Kakolyris, S., P. Karakitsos, M. Tzardi and E. Agapitos (1995). "Immunohistochemical detection of fibronectin in early and advanced atherosclerosis." In Vivo **9**(1): 35-40.
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**(4): 325-335.
Kasirer-Friede, A., M. R. Cozzi, M. Mazzucato, L. De Marco, Z. M. Ruggeri and S. J. Shattil (2004). "Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors." Blood **103**(9): 3403-3411.

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**(5): 1701-1707.
Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." Cell Death Differ **13**(5): 816-825.
Keeney, S. and A. M. Cumming (2001). "The molecular biology of von Willebrand disease." Clin Lab Haematol **23**(4): 209-230.
Kiefer, T. L. and R. C. Becker (2009). "Inhibitors of Platelet Adhesion." Circulation **120**(24): 2488-2495.
Kim, E. Y., J. Y. Bang, S. I. Chang and I. C. Kang (2008). "A novel integrin alpha5beta1 antagonistic peptide, A5-1, screened by Protein Chip system as a potent angiogenesis inhibitor." Biochem Biophys Res Commun **377**(4): 1288-1293.
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**(17): 2323-2330.
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**(17): 2323-2330.
Kloczewiak, M., S. Timmons, M. A. Bednarek, M. Sakon and J. Hawiger (1989). "Platelet receptor recognition domain on the gamma chain of human fibrinogen and its synthetic peptide analogues." Biochemistry **28**(7): 2915-2919.
Kobe, B. and A. V. Kajava (2001). "The leucine-rich repeat as a protein recognition motif." Curr Opin Struct Biol **11**(6): 725-732.
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**(1-3): 131-137.
Kohan, M., A. F. Muro, E. S. White and N. Berkman (2010). "EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to alpha4beta7 integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling." FASEB J **24**(11): 4503-4512.
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**(3): 249-258.
Kremer Hovinga, J. A. and B. Lammle (2012). "Role of ADAMTS13 in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 610.
Kroll, M. H., J. D. Hellums, L. V. McIntire, A. I. Schafer and J. L. Moake (1996). "Platelets and shear stress." Blood **88**(5): 1525-1541.
Kühnel, W. (2003). Atlas de poche d'histologie - 3ème édition. Paris, éd. Flammarion Médecine-Sciences.
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**(1): 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." Thromb Haemost **98**(5): 1072-1080.
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." J Clin Invest **105**(6): 783-791.
Labarthe, B., J. Babin, M. Bryckaert, P. Theroux and A. Bonnefoy (2012). "Effects of P2Y(1) receptor antagonism on the reactivity of platelets from patients with stable coronary artery disease using aspirin and clopidogrel." Br J Pharmacol **166**(1): 221-231.
Lanza, F. (2006). "Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagiparous 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**(4): 1-12.
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 alphaIIbbeta3 signalling and platelet function." Nature **401**(6755): 808-811.
Lee, S. W., S. W. Park, Y. H. Kim, S. C. Yun, D. W. Park, C. W. Lee, S. J. Kang, S. J. Park, J. H. Lee, S. W. Choi, I. W. Seong, N. H. Lee, Y. H. Cho, W. Y. Shin, S. J. Lee, M. S. Hyon, D. W. Bang, Y. J. Choi, H. S. Kim, B. K. Lee, K. Lee, H. K. Park, C. B. Park, S. G. Lee, M. K. Kim, K. H. Park and W. J. Park (2011). "A randomized, double-blind, multicenter comparison study of triple antiplatelet therapy with dual antiplatelet therapy to reduce restenosis after drug-eluting stent implantation in long coronary lesions: results from the DECLARE-LONG II (Drug-Eluting Stenting Followed by Cilostazol Treatment Reduces Late Restenosis in Patients with Long Coronary Lesions) trial." J Am Coll Cardiol **57**(11): 1264-1270.
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**(5): 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." J Clin Invest **104**(12): 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." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(10): 1941-1947.
Leonardi, S., S. V. Rao, R. A. Harrington, D. L. Bhatt, C. M. Gibson, M. T. Roe, J. Kochman, K. Huber, U. Zeymer, M. Madan, D. D. Gretler, M. W. McClure, G. E. Paynter, V. Thompson and R. C. Welsh (2010). "Rationale and design of the randomized, double-blind trial testing INtraveNous and Oral administration of elinogrel, a selective and reversible P2Y(12)-receptor inhibitor, versus clopidogrel to eVAluate Tolerability and Efficacy in nonurgent Percutaneous Coronary Interventions patients (INNOVATE-PCI)." Am Heart J **160**(1): 65-72.
Li, R. and J. Emsley (2013). "The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex." J Thromb Haemost **11**(4): 605-614.
Libby, P., P. M. Ridker and G. K. Hansson (2011). "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis." Nature **473**(7347): 317-325.
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." Thromb Res **118**(3): 371-380.

Luo, S. Z. and R. Li (2008). "Specific heteromeric association of four transmembrane peptides derived from platelet glycoprotein Ib-IX complex." J Mol Biol **382**(2): 448-457.
Luo, S. Z., X. Mo, V. Afshar-Kharghan, S. Srinivasan, J. A. Lopez and R. Li (2007). "Glycoprotein Ibalpha forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibbeta subunits in the resting platelet." Blood **109**(2): 603-609.
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." J Biol Chem **271**(6): 2879-2881.
Mackman, N. (1997). "Regulation of the tissue factor gene." Thromb Haemost **78**(1): 747-754.
Mahaut-Smith, M. P., S. Jones and R. J. Evans (2011). "The P2X1 receptor and platelet function." Purinergic Signal **7**(3): 341-356.
Mangin, P., T. David, V. Lavaud, S. L. Cranmer, I. Pikovski, S. P. Jackson, M. C. Berndt, J. P. Cazenave, C. Gachet and F. Lanza (2004). "Identification of a novel 14-3-3zeta binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ibalpha." Blood **104**(2): 420-427.
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**(6): 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**(11): 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." J Biol Chem **278**(35): 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**(9): 1550-1555.
Mangin, P. H., C. Tang, C. Bourdon, S. Loyau, M. Freund, B. Hechler, C. Gachet and M. Jandrot-Perrus (2012). "A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents." J Pharmacol Exp Ther **341**(1): 156-163.
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**(8): 2149-2153.
Massberg, S., M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlnhofer, U. Heinzmann and B. Nieswandt (2003). "A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo." J Exp Med **197**(1): 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**(2): 397-399.
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**(12): 1225-1233.
Maurer, E., C. Tang, M. Schaff, C. Bourdon, N. Receveur, C. Ravanat, A. Eckly, B. Hechler, C. Gachet, F. Lanza and P. H. Mangin (2013). "Targeting platelet GPIbbeta reduces platelet adhesion, GPIb signaling and thrombin generation and prevents arterial thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(6): 1221-1229.

Maurer, L. M., B. R. Tomasini-Johansson and D. F. Mosher (2010). "Emerging roles of fibronectin in thrombosis." Thromb Res **125**(4): 287-291.
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**(14): 1903-1916.
Mazzucato, M., P. Pradella, M. R. Cozzi, L. De Marco and Z. M. Ruggeri (2002). "Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibalpha mechanoreceptor." Blood **100**(8): 2793-2800.
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**(10): 1823-1833.
McGowan, K. A. and M. P. Marinkovich (2000). "Laminins and human disease." Microsc Res Tech **51**(3): 262-279.
McHowat, J., P. J. Kell, H. B. O'Neill and M. H. Creer (2001). "Endothelial cell PAF synthesis following thrombin stimulation utilizes Ca(2+)-independent phospholipase A(2)." Biochemistry **40**(49): 14921-14931.
McNicol, A. and S. J. Israels (1999). "Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis." Thromb Res **95**(1): 1-18.
McNicol, A., S. J. Israels, C. Robertson and J. M. Gerrard (1994). "The empty sack syndrome: a platelet storage pool deficiency associated with empty dense granules." Br J Haematol **86**(3): 574-582.
Meadows, T. A. and D. L. Bhatt (2007). "Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation." Circ Res **100**(9): 1261-1275.
Medved, L. and J. W. Weisel (2009). "Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin." J Thromb Haemost **7**(2): 355-359.
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-.
Metcalf, D. J., T. D. Nightingale, H. L. Zenner, W. W. Lui-Roberts and D. F. Cutler (2008). "Formation and function of Weibel-Palade bodies." J Cell Sci **121**(Pt 1): 19-27.
Michelson, A. D. (2010). "Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease." Nat Rev Drug Discov **9**(2): 154-169.
Michiels, C. (2003). "Endothelial cell functions." J Cell Physiol **196**(3): 430-443.
Miossec, P., D. Cavender and M. Ziff (1986). "Production of interleukin 1 by human endothelial cells." J Immunol **136**(7): 2486-2491.
Mo, X., L. Liu, J. A. Lopez and R. Li (2012). "Transmembrane domains are critical to the interaction between platelet glycoprotein V and glycoprotein Ib-IX complex." J Thromb Haemost **10**(9): 1875-1886.
Moake, J. L., N. A. Turner, N. A. Stathopoulos, L. Nolasco and J. D. Hellums (1988). "Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin." Blood **71**(5): 1366-1374.
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." J Biol Chem **272**(9): 6011-6017.
Moon, J. J., M. Matsumoto, S. Patel, L. Lee, J. L. Guan and S. Li (2005). "Role of cell surface heparan sulfate proteoglycans in endothelial cell migration and mechanotransduction." J Cell Physiol **203**(1): 166-176.

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." J Biol Chem **282**(38): 28057-28062.
Morla, A. and E. Ruoslahti (1992). "A fibronectin self-assembly site involved in fibronectin matrix assembly: reconstruction in a synthetic peptide." J Cell Biol **118**(2): 421-429.
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.
Mosesson, M. W. (2005). "Fibrinogen and fibrin structure and functions." J Thromb Haemost **3**(8): 1894-1904.
Mu, F. T., R. K. Andrews, J. F. Arthur, A. D. Munday, S. L. Cranmer, S. P. Jackson, F. C. Stomski, A. F. Lopez and M. C. Berndt (2008). "A functional 14-3-3zeta-independent association of PI3-kinase with glycoprotein Ib alpha, the major ligand-binding subunit of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex." Blood **111**(9): 4580-4587.
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." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(12): 2673-2678.
Murata, T. and T. W. Secomb (1988). "Effects of shear rate on rouleau formation in simple shear flow." Biorheology **25**(1-2): 113-122.
Nakayama, T., T. Matsushita, Z. Dong, J. E. Sadler, S. Jorieux, C. Mazurier, D. Meyer, T. Kojima and H. Saito (2002). "Identification of the regulatory elements of the human von Willebrand factor for binding to platelet GPIb. Importance of structural integrity of the regions flanked by the CYS1272-CYS1458 disulfide bond." J Biol Chem **277**(24): 22063-22072.
National Institutes of Health (2012). "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**(12): 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." Nat Med **15**(6): 665-673.
Ni, H. and J. Freedman (2003). "Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands." Transfus Apher Sci **28**(3): 257-264.
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." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2415-2419.
Nieswandt, B., W. Bergmeier, V. Schulte, K. Rackebrandt, J. E. Gessner and H. Zirngibl (2000). "Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain." J Biol Chem **275**(31): 23998-24002.
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." EMBO J **20**(9): 2120-2130.

Nieswandt, B., D. Varga-Szabo and M. Elvers (2009). "Integrins in platelet activation." J Thromb Haemost **1**: 206-209.
Nieswandt, B. and S. P. Watson (2003). "Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?" Blood **102**(2): 449-461.
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**(1): 85-93.
Nurden, A. T. (2006). "Glanzmann thrombasthenia." Orphanet J Rare Dis **1**: 10.
Nurden, P., N. Debili, I. Coupry, M. Bryckaert, I. Youlyouz-Marfak, G. Sole, A. C. Pons, E. Berrou, F. Adam, A. Kauskot, J. M. Lamaziere, P. Rameau, P. Fergelot, C. Rooryck, D. Cailley, B. Arveiler, D. Lacombe, W. Vainchenker, A. Nurden and C. Goizet (2011). "Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome." Blood **118**(22): 5928-5937.
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**(4): 1400-1408.
Nuyttens, B. P., T. Thijs, H. Deckmyn and K. Broos (2011). "Platelet adhesion to collagen." Thromb Res **127 Suppl 2**: S26-29.
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.
Okamura, Y., M. Watari, E. S. Jerud, D. W. Young, S. T. Ishizaka, J. Rose, J. C. Chow and J. F. Strauss, 3rd (2001). "The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4." J Biol Chem **276**(13): 10229-10233.
Olt, G., A. Berchuck, A. P. Soisson, C. M. Boyer and R. C. Bast, Jr. (1992). "Fibronectin is an immunosuppressive substance associated with epithelial ovarian cancer." Cancer **70**(8): 2137-2142.
OMS (2011). Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva éd. Mendis, S., Puska, P., Norrving, B. World Health Organization Press, 164 p.
OMS (2011) "http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/."
Palmer, A. A. (1967). "Platelet and leucocyte skimming." Bibl Anat **9**: 300-303.
Pankov, R. and K. M. Yamada (2002). "Fibronectin at a glance." J Cell Sci **115**(Pt 20): 3861-3863.
Parsons, T. J., D. L. Haycraft, J. C. Hoak and H. Sage (1986). "Interaction of platelets and purified collagens in a laminar flow model." Thromb Res **43**(4): 435-443.
Patel, P. A., B. Lane and J. G. Augoustides (2013). "Progress in platelet blockers: the target is the P2Y12 receptor." J Cardiothorac Vasc Anesth **27**(3): 620-624.
Patrono, C. and B. Rocca (2012). "Aspirin and Other COX-1 inhibitors." Handb Exp Pharmacol **210**: 137-164.
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**(4): 814-820.
Peerlinck, K., I. De Lepeleire, M. Goldberg, D. Farrell, J. Barrett, E. Hand, D. Panebianco, H. Deckmyn, J. Vermylen and J. Arnout (1993). "MK-383 (L-700,462), a selective nonpeptide platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, is active in man." Circulation **88**(4 Pt 1): 1512-1517.
Penz, S., A. J. Reininger, R. Brandl, P. Goyal, T. Rabie, I. Bernlochner, E. Rother, C. Goetz, B. Engelmann, P. A. Smethurst, W. H. Ouwehand, R. Farndale, B. Nieswandt and W. Siess

(2005). "Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI." FASEB J **19**(8): 898-909.
Perrault, C., P. Mangin, M. Santer, M. J. Baas, S. Moog, S. L. Cranmer, I. Pikovski, D. Williamson, S. P. Jackson, J. P. Cazenave and F. Lanza (2003). "Role of the intracellular domains of GPIb in controlling the adhesive properties of the platelet GPIb/V/IX complex." Blood **101**(9): 3477-3484.
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 GPIbbeta modulates vWF mediated platelet adhesion." Thromb Haemost **86**(5): 1238-1248.
Peterson, D. M., N. A. Stathopoulos, T. D. Giorgio, J. D. Hellums and J. L. Moake (1987). "Shear-induced platelet aggregation requires von Willebrand factor and platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa." Blood **69**(2): 625-628.
Pfeiffer, N., E. Mandrusov, L. Vroman and E. F. Leonard (1998). "Effects of secondary flow caused by a curved channel on plasma protein adsorption to artificial surfaces." Biotechnol Prog **14**(2): 338-342.
Pober, B. R. (2010). "Williams-Beuren syndrome." N Engl J Med **362**(3): 239-252.
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." Thromb Haemost **81**(1): 118-123.
Prydz, K. and K. T. Dalen (2000). "Synthesis and sorting of proteoglycans." J Cell Sci **113 Pt 2**: 193-205.
Quek, L. S., J. M. Pasquet, I. Hers, R. Cornall, G. Knight, M. Barnes, M. L. Hibbs, A. R. Dunn, C. A. Lowell and S. P. Watson (2000). "Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway." Blood **96**(13): 4246-4253.
Quinn, M. J. and D. J. Fitzgerald (1999). "Ticlopidine and clopidogrel." Circulation **100**(15): 1667-1672.
Rabe, F. and E. Salomon (1920). "Ueber-faserstoffmangel im Blute bei einem falle von Hamophilie." Arch Intern Med(95): 2-14.
Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev **50**(3): 413-492.
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 GPIbalpha N-terminal extracellular domain." Blood **116**(7): 1157-1164.
Reheman, A., H. Yang, G. Zhu, W. Jin, F. He, C. M. Spring, X. Bai, P. L. Gross, J. Freedman and H. Ni (2009). "Plasma fibronectin depletion enhances platelet aggregation and thrombus formation in mice lacking fibrinogen and von Willebrand factor." Blood **113**(8): 1809-1817.
Reininger, A. J. (2009). "Platelet function under high shear conditions." Hamostaseologie **29**(1): 21-22.
Rensen, S. S., P. A. Doevendans and G. J. van Eys (2007). "Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity." Neth Heart J **15**(3): 100-108.
Revacept http://www.strokecenter.org/trials/clinicalstudies/revacept-in-symptomatic-carotid-stenosis-revaceptcs02.
Reyes, C. D. and A. J. Garcia (2004). "Alpha2beta1 integrin-specific collagen-mimetic surfaces supporting osteoblastic differentiation." J Biomed Mater Res A **69**(4): 591-600.
Rivadeneyra, L., A. Carestia, J. Etulain, R. G. Pozner, C. Fondevila, S. Negrotto and M. Schattner (2013). "Regulation of platelet responses triggered by Toll-like receptor 2 and 4

ligands is another non-genomic role of nuclear factor-kappaB." Thromb Res **1**(13): 00564-00561.
Romo, G. M., J. F. Dong, A. J. Schade, E. E. Gardiner, G. S. Kansas, C. Q. Li, L. V. McIntire, M. C. Berndt and J. A. Lopez (1999). "The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin." J Exp Med **190**(6): 803-814.
Rosenbloom, J., W. R. Abrams and R. Mecham (1993). "Extracellular matrix 4: the elastic fiber." FASEB J **7**(13): 1208-1218.
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." Thromb Haemost **79**(1): 155-161.
Roth, G. J., N. Stanford and P. W. Majerus (1975). "Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(8): 3073-3076.
Ruggeri, Z. M. (1997). "von Willebrand factor." J Clin Invest **100**(11 Suppl): S41-46.
Ruggeri, Z. M. (1999). "Structure and function of von Willebrand factor." Thromb Haemost **82**(2): 576-584.
Ruggeri, Z. M. (2002). "Platelets in atherothrombosis." Nat Med **8**(11): 1227-1234.
Ruggeri, Z. M. (2007). "The role of von Willebrand factor in thrombus formation." Thromb Res **120**(1): 9.
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**(6): 1903-1910.
Sadler, J. E. (2003). "Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease." Blood **101**(6): 2089-2093.
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. Gralnick 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**(5): 1244-1250.
Sakai, T., K. J. Johnson, M. Murozono, K. Sakai, M. A. Magnuson, T. Wieloch, T. Cronberg, A. Isshiki, H. P. Erickson and R. Fassler (2001). "Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis." Nat Med **7**(3): 324-330.
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**(6851): 74-78.
Sarratt, K. L., H. Chen, M. L. Kahn and D. A. Hammer (2004). "Platelet receptor glycoprotein VI-mediated adhesion to type I collagen under hydrodynamic flow." Ann Biomed Eng **32**(7): 970-976.
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**(4): 1268-1277.
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**(5): 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**(8): 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." J Biol Chem **266**(17): 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**(2): 289-297.

Scarborough, R. M., J. W. Rose, M. A. Hsu, D. R. Phillips, V. A. Fried, A. M. Campbell, L. Nannizzi and I. F. Charo (1991). "Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of Sistrurus m. barbouri." J Biol Chem **266**(15): 9359-9362.
Schaff, M., C. Tang, E. Maurer, C. Bourdon, N. Receveur, A. Eckly, B. Hechler, C. Arnold, A. de Arcangelis, B. Nieswandt, C. V. Denis, O. Lefebvre, E. Georges-Labouesse, C. Gachet, F. Lanza and P. H. Mangin (2013). "Integrin alpha6beta1 is the Main Receptor for Vascular Laminins and Plays a Role in Platelet Adhesion, Activation and Arterial Thrombosis." Circulation.
Schaff, M., C. Tang, E. Maurer, C. Bourdon, N. Receveur, A. Eckly, B. Hechler, C. Arnold, A. de Arcangelis, B. Nieswandt, C. V. Denis, O. Lefebvre, E. Georges-Labouesse, C. Gachet, F. Lanza and P. H. Mangin (2013). "Integrin alpha6beta1 is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis." Circulation **128**(5): 541-552.
Schnaper, H. W., H. K. Kleinman and D. S. Grant (1993). "Role of laminin in endothelial cell recognition and differentiation." Kidney Int **43**(1): 20-25.
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." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7899-7903.
Schulte, S. (2013). "Innovative coagulation factors: albumin fusion technology and recombinant single-chain factor VIII." Thromb Res **131**(2): 70150-70156.
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." Thromb Haemost **102**(1): 111-119.
Shankaran, H., P. Alexandridis and S. Neelamegham (2003). "Aspects of hydrodynamic shear regulating shear-induced platelet activation and self-association of von Willebrand factor in suspension." Blood **101**(7): 2637-2645.
Sheriff, J., D. Bluestein, G. Girdhar and J. Jesty (2010). "High-shear stress sensitizes platelets to subsequent low-shear conditions." Ann Biomed Eng **38**(4): 1442-1450.
Shirakami, A., T. Shigekiyo, Y. Hirai, T. Takeichi, S. Kawauchi, S. Saito and K. Miyoshi (1986). "Plasma fibronectin deficiency in eight members of one family." Lancet **1**(8479): 473-474.
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**(8): 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**(4): 446-451.
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**(5): 832-839.
Sivenius, J., L. Cunha, H. C. Diener, C. Forbes, M. Laakso, A. Lowenthal, P. Smets, P. R. Sr and E. W. G. for the (1999). "Second European Stroke Prevention Study: antiplatelet therapy is effective regardless of age." Acta Neurologica Scandinavica **99**(1): 54-60.
Skalak, R. and P. I. Branemark (1969). "Deformation of red blood cells in capillaries." Science **164**(3880): 717-719.

Skalak, R. and C. Zhu (1990). "Rheological aspects of red blood cell aggregation." Biorheology **27**(3-4): 309-325.
Smith, E. B. (1995). "Fibrinogen, fibrin and the arterial wall." Eur Heart J **16**: 11-14.
Smith, J. W., Z. M. Ruggeri, T. J. Kunicki and D. A. Cheresh (1990). "Interaction of integrins alpha v beta 3 and glycoprotein IIb-IIIa with fibrinogen. Differential peptide recognition accounts for distinct binding sites." J Biol Chem **265**(21): 12267-12271.
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." Thromb Haemost **103**(4): 841-848.
Soslau, G., R. Class, D. A. Morgan, C. Foster, S. T. Lord, P. Marchese and Z. M. Ruggeri (2001). "Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib." J Biol Chem **276**(24): 21173-21183.
Springer, T. A. (1990). "Adhesion receptors of the immune system." Nature **346**(6283): 425-434.
Stefanini, L. and W. Bergmeier (2010). "CalDAG-GEFI and platelet activation." Platelets **21**(4): 239-243.
Sugiyama, T., M. Okuma, F. Ushikubi, S. Sensaki, K. Kanaji and H. Uchino (1987). "A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia." Blood **69**(6): 1712-1720.
Suh, J. W., S. P. Lee, K. W. Park, H. Y. Lee, H. J. Kang, B. K. Koo, Y. S. Cho, T. J. Youn, I. H. Chae, D. J. Choi, S. W. Rha, J. H. Bae, T. G. Kwon, J. W. Bae, M. C. Cho and H. S. Kim (2011). "Multicenter randomized trial evaluating the efficacy of cilostazol on ischemic vascular complications after drug-eluting stent implantation for coronary heart disease: results of the CILON-T (influence of CILostazol-based triple antiplatelet therapy ON ischemic complication after drug-eluting stenT implantation) trial." J Am Coll Cardiol **57**(3): 280-289.
Surin, W. R., M. K. Barthwal and M. Dikshit (2008). "Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis." Thromb Res **122**(6): 786-803.
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 alphaIIbbeta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo." J Clin Invest **120**(1): 179-190.
Tangelder, G. J., H. C. Teirlinck, D. W. Slaaf and R. S. Reneman (1985). "Distribution of blood platelets flowing in arterioles." Am J Physiol **248**(3 Pt 2): H318-323.
Terpening, C. (2009). "An appraisal of dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin for prevention of cardiovascular events." J Am Board Fam Med **22**(1): 51-56.
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." J Clin Invest **102**(11): 1994-2001.
Thon, J. N. and J. E. Italiano (2012). "Platelets: production, morphology and ultrastructure." Handb Exp Pharmacol(210): 3-22.
Thyberg, J., K. Blomgren, J. Roy, P. K. Tran and U. Hedin (1997). "Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin." J Histochem Cytochem **45**(6): 837-846.
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**(19): 9933-9937.
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. Paris, éd. Masson, 776 p.
Tovar-Lopez, F. J., G. Rosengarten, M. Nasabi, V. Sivan, K. Khoshmanesh, S. P. Jackson, A. Mitchell and W. S. Nesbitt (2013). "An Investigation on Platelet Transport during Thrombus Formation at Micro-Scale Stenosis." PLoS One **8**(10): 0074123.
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." N Engl J Med **366**(1): 20-33.
Ulrichts, 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**(3): 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**(17): 1891-1899.
Valiyaveettil, M., W. Feng, G. Mahabaleshwar, D. R. Phillips, T. Byzova and E. Podrez (2007). "Phosphorylation of platelet alphaIIbbeta3 is crucial for arterial thrombosis in vivo and microparticule generation." Abstracts from American Heart Association Scientific Sessions Orlando 2007 Nov 4-7. Circulation **116(16):II_75: Abstract Number 450**.
van der Rest, M. and R. Garrone (1991). "Collagen family of proteins." FASEB J **5**(13): 2814-2823.
van Meijer, M. and H. Pannekoek (1995). "Structure of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update." Fibrinolysis **9**(5): 263-276.
Varga-Szabo, D., I. Pleines and B. Nieswandt (2008). "Cell adhesion mechanisms in platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 403-412.
Versteeg, H. H., J. W. M. Heemskerk, M. Levi and P. H. Reitsma (2013). "New Fundamentals in Hemostasis." Physiol Rev **93**(1): 327-358.
VIDAL. (2013). "http://www.vidal.fr/."
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." Thromb Haemost **98**(3): 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**(2): 298-309.
Wagenseil, J. E. and R. P. Mecham (2009). "Vascular extracellular matrix and arterial mechanics." Physiol Rev **89**(3): 957-989.
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**(3): 907-914.
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**(8): 1752-1762.
Weiss, E. J., J. R. Hamilton, K. E. Lease and S. R. Coughlin (2002). "Protection against thrombosis in mice lacking PAR3." Blood **100**(9): 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**(3): 336-346.
Westein, E., A. D. van der Meer, M. J. Kuijpers, J. P. Frimat, A. van den Berg and J. W. Heemskerk (2013). "Atherosclerotic geometries exacerbate pathological thrombus formation poststenosis in a von Willebrand factor-dependent manner." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(4): 1357-1362.
Wight, T. N., M. G. Kinsella and E. E. Qwarnstrom (1992). "The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation." Curr Opin Cell Biol **4**(5): 793-801.
Winchester, D. E., X. Wen, W. D. Brearley, K. E. Park, R. D. Anderson and A. A. Bavry (2011). "Efficacy and safety of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors during elective coronary revascularization: a meta-analysis of randomized trials performed in the era of stents and thienopyridines." J Am Coll Cardiol **57**(10): 1190-1199.
Wiviott, S. D., E. M. Antman and E. Braunwald (2010). "Prasugrel." Circulation **122**(4): 394-403.
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." N Engl J Med **357**(20): 2001-2015.
Wolberg, A. S. and R. A. Campbell (2008). "Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis." Transfus Apher Sci **38**(1): 15-23.
Woulfe, D., H. Jiang, R. Mortensen, J. Yang and L. F. Brass (2002). "Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets." J Biol Chem **277**(26): 23382-23390.
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." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(2): 323-328.
Wu, Y., N. Asazuma, K. Satoh, Y. Yatomi, T. Takafuta, M. C. Berndt and Y. Ozaki (2003). "Interaction between von Willebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinase in human platelets: role of phosphoinositide 3-kinase." Blood **101**(9): 3469-3476.
Wu, Y. P., P. G. de Groot and J. J. Sixma (1997). "Shear-stress-induced detachment of blood platelets from various surfaces." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(11): 3202-3207.
Xu, C. and D. M. Wootton (2004). "Platelet near-wall excess in porcine whole blood in artery-sized tubes under steady and pulsatile flow conditions." Biorheology **41**(2): 113-125.
Xu, Z., Nan Chen, Shawn C. Shadden, Jerrold E. Marsden, Malgorzata M. Kamocka, Elliot D. Rosen and Mark Alber (2009). "Study of blood flow impact on growth of thrombi using a multiscale model " Soft Matter **5**: 769-779.
Yang, J. T., H. Rayburn and R. O. Hynes (1993). "Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice." Development **119**(4): 1093-1105.
Yeung, J. and M. Holinstat (2012). "Newer agents in antiplatelet therapy: a review." J Blood Med **3**: 33-42.
Yousuf, O. and D. L. Bhatt (2011). "The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease." Nat Rev Cardiol **8**(10): 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**(1): 135-142.

Yuan, S. Y. and R. R. Rigor (2010). Regulation of Endothelial Barrier Function. San Rafael CA, 2011 by Morgan & Claypool Life Sciences.
Yuan, Y., S. Kulkarni, P. Ulsemer, S. L. Cranmer, C. L. Yap, W. S. Nesbitt, I. Harper, N. Mistry, S. M. Dopheide, S. C. Hughan, D. Williamson, C. de la Salle, H. H. Salem, F. Lanza and S. P. Jackson (1999). "The von Willebrand factor-glycoprotein Ib/V/IX interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells." J Biol Chem **274**(51): 36241-36251.
Yurchenco, P. D. (2011). "Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(2).
Zago, A. C., D. I. Simon, Y. Wang, M. Sakuma, Z. Chen, K. Croce, V. Ustinov, C. Shi and E. E. Martinez Filho (2008). "The importance of the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet glycoprotein Ib-a for leukocyte recruitment by platelets and for the inflammatory response to vascular injury." Arq Bras Cardiol **90**(1): 54-63.
Zahid, M., P. Mangin, S. Loyau, B. Hechler, P. Billiald, C. Gachet and M. Jandrot-Perrus (2012). "The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target." J Thromb Haemost **10**(12): 2418-2427.
Zaidi, T. N., L. V. McIntire, D. H. Farrell and P. Thiagarajan (1996). "Adhesion of platelets to surface-bound fibrinogen under flow." Blood **88**(8): 2967-2972.
Zhang, G., J. Han, E. J. Welch, R. D. Ye, T. A. Voyno-Yasenetskaya, A. B. Malik, X. Du and Z. Li (2009). "Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway." J Immunol **182**(12): 7997-8004.
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 alphaIIbbeta3 outside-in signaling." J Biol Chem **286**(45): 39466-39477.
Zhang, W., L. Zhao, J. Liu, J. Du, R. Yan and K. Dai (2012). "Role of 14-3-3zeta in Platelet Glycoprotein Ibalpha-von Willebrand Factor Interaction-Induced Signaling." Int J Mol Sci **13**(5): 5364-5374.
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**(5932): 1330-1334.
Zutter, M. M. and B. T. Edelson (2007). "The alpha2beta1 integrin: a novel collectin/C1q receptor." Immunobiology **212**(4-5): 343-353.

Eric MAURER

Role of the initial steps of platelet adhesion and importance of pulsatile flow in platelet aggregation

Following vascular injury, blood platelets adhere, become activated and aggregate to form a hemostatic plug which stops the bleeding. In a pathological context, platelet aggregation can also lead to the formation of an occlusive thrombus, responsible for life-threatening ischemic events. Current antiplatelet drugs targeting platelet activation and aggregation, have a recognized efficacy, but also present some limitations including the recurrence of ischemic events and the risk of bleeding. The aim of my thesis was to explore the importance of the initial step of platelet adhesion to subendothelial proteins and the role of pulsatile blood flow in platelet aggregation. I provided evidence that RAM.1 an antibody directed against GPIbβ, reduces GPIb signaling and thrombus formation without affecting hemostasis. My work also showed that fibrillar cellular fibronectin is a thrombogenic surface which supports efficient adhesion, activation, aggregation and procoagulant activity of platelets. Finally, I observed that the pulsatility of the blood flow has an inverse role in the growth of thrombi in physiological and pathological settings. In conclusion, this work highlights the importance of initial stages of platelet adhesion and of the blood flow pulsatility in platelet aggregation.

Keywords: platelets, hemostasis, arterial thrombosis, GPIbβ, fibronectin, pulsatile flow.

Eric MAURER

Etude du rôle des étapes initiales d'adhérence des plaquettes sanguines et du flux pulsatile dans l'agrégation plaquettaire

Suite à une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent, s'activent et agrègent pour former un clou hémostatique qui stoppe le saignement. Dans un contexte pathologique, l'agrégation plaquettaire mène à la formation d'un thrombus qui peut obstruer une artère malade et entrainer des pathologies ischémiques graves. Les agents antiplaquettaires actuels, qui ciblent l'activation et l'agrégation des plaquettes, ont une efficacité reconnue, mais ont pour limites, la récurrence d'événements ischémiques et le risque hémorragique. L'objectif central de ma thèse a été d'explorer l'importance des étapes initiales d'adhérence des plaquettes aux protéines sous-endothéliales et du rôle du flux sanguin dans l'agrégation des plaquettes. J'ai pu montrer qu'un anticorps dirigé contre la GPIbβ, RAM.1, réduit la signalisation du complexe GPIb-V-IX et la formation de thrombi sans affecter l'hémostase. J'ai également mis en évidence que la fibronectine cellulaire fibrillaire est une surface thrombogène qui assure l'adhérence, l'activation, l'agrégation et l'activité pro-coagulante des plaquettes. Enfin, mes travaux indiquent que la pulsatilité du flux sanguin possède un rôle inverse sur la croissance des thrombi en conditions physiologique et pathologique. En conclusion, ce travail met en lumière l'importance des étapes initiales d'adhérence des plaquettes et de la pulsatilité du flux sanguin dans l'agrégation plaquettaire.

Mots clés : plaquettes, hémostase, thrombose artérielle, GPIbβ, fibronectine, flux pulsatile.