



HAL
open science

Les plaquettes dans les réactions inflammatoires : maintien de l'intégrité vasculaire et régulation des neutrophiles

Angèle Gros

► **To cite this version:**

Angèle Gros. Les plaquettes dans les réactions inflammatoires : maintien de l'intégrité vasculaire et régulation des neutrophiles. Hématologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCC288 . tel-02276662

HAL Id: tel-02276662

<https://theses.hal.science/tel-02276662v1>

Submitted on 3 Sep 2019

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 de doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole Doctorale : Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies

Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS)

Inserm UMRS 1148, Paris, France

Thèse de doctorat d'Hématologie

Angèle GROS

**Les plaquettes dans les réactions inflammatoires :
Maintien de l'intégrité vasculaire et Régulation des neutrophiles**

Dirigée par le Dr Martine Jandrot-Perrus et le Dr Benoît Ho-Tin-Noé

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 17 Mai 2017

JURY

Dr Najet DEBILI

Pr Hans DECKMYN

Dr Pierre MANGIN

Dr Eric CAMERER

Dr Martine JANDROT-PERRUS

Dr Benoît HO-TIN-NOE

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Thèse de doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole Doctorale : Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies

Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS)

Inserm UMRS 1148, Paris, France

Thèse de doctorat en Hématologie

Angèle GROS

**Les plaquettes dans les réactions inflammatoires :
Maintien de l'intégrité vasculaire et Régulation des neutrophiles**

Dirigée par le Dr Martine Jandrot-Perrus et le Dr Benoît Ho-Tin-Noé

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 17 Mai 2017

JURY

Dr Najet Debili

Pr Hans Deckmyn

Dr Pierre Mangin

Dr Eric Camerer

Dr Martine Jandrot-Perrus

Dr Benoît Ho-Tin-Noé

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Remerciements

Mes premiers remerciements iront à mes directeurs de thèse, le Dr Martine Jandrot-Perrus et le Dr Benoît Ho-Tin-Noé. Merci Martine de m'avoir accueillie au laboratoire dès mon stage de M2 et de m'avoir fait confiance toutes ces années. Merci Benoît d'avoir partagé avec moi tes connaissances et ta passion pour la science, pour ta confiance, ta patience et ton optimisme (*merki* !). Votre complémentarité m'a beaucoup appris.

J'adresse mes remerciements au Dr Hans Deckmyn et au Dr Pierre Mangin qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse ainsi qu'au Dr Eric Camerer pour sa participation à ce jury de thèse. Je remercie également le Dr Najet Debili qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie le Dr Jean-Baptiste Michel, directeur de l'ex-U698 et le Dr Didier Letourneur, actuel directeur de l'U1148, de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions.

Un immense merci à Véronique Ollivier pour m'avoir appris la culture cellulaire, pour tous tes conseils et ton aide, pour toutes ces manip' à plusieurs mains et aussi pour les bons moments passés en congrès.

Je souhaiterais adresser mes remerciements sincères à « l'équipe hémotase » : Marie-Christine Bouton, Véronique Arocas, Laurence Venisse, Nadine Ajzenberg, Dorothee Faille, Javorika Miloradovic, ainsi qu'à Stéphane Loyau pour m'avoir encadrée en master et à Yacine Boulaftali pour son aide, en particulier dans les manip' surdimensionnées !!! Merci à Mary, pour sa présence au *lab' meeting in english* et ses corrections bienveillantes.

Un grand merci à Marie-Anne (courage pour ces derniers mois de thèse avant le post-doc rêvé !) et à Kamel (déjà parti au bout du monde...), à Kristell et à Adrian pour leur écoute, leurs conseils et leur bonne humeur, les bons moments partagés.

Je n'oublie pas non plus Karen, Leila, Soumaya, merci pour vos rires communicatifs, votre bonne humeur et aussi pour votre écoute et vos conseils. Et Audrey, souvent sitôt arrivée que déjà repartie dans un autre labo, merci pour ta bonne humeur.

Merci à Marie-Charlotte, Nicolas, Kim-Anh, Mathieu, Thibaud, Alejandro pour leur bonne humeur dans le « bureau des étudiants » et l'ambiance festive des vendredis après-midi.

Je remercie aussi Fanny et Bouthéina, étudiantes en master, et les *Apprentis Chercheurs*, Anastasia et Luther.

Lamia, Déborah, Sonia, Varouna, Sophie, Devy, Kévin, Sandrine et Clément, merci pour les bons moments passés au laboratoire et aussi en dehors, ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans vous.

Je souhaite également remercier toute l'équipe de génétique pour m'avoir laissé envahir leur bureau à la fin de ma thèse : Mathilde, Catherine, Petra, Sandy, Youmna, Yara, Marie-Sylvie, Louise, Mélodie et Pauline.

Je remercie aussi Corinne Legrand et Asma Tighouart pour leur aide dans les tâches administratives, surtout en cette fin de thèse.

Merci également à tous les animaliers et en particulier à Liliane Louedec et Gwendoline Lucque pour leur aide précieuse à l'animalerie.

Je souhaite adresser mes remerciements à tous les membres de l'unité 1148, présents et anciens, que j'ai rencontrés pendant ma thèse et qui ont enrichi tant sur le plan humain que scientifique ces années : Peng, Dorien, Betty, Kaouter, Sophia, Amena, Ketty, Morgane, Richard, Jean-Philippe, Benjamin, Alexandre, Gulsev, Radouane, Agathe, Gaia, Hadidja, Ziad, Camille, Reda, Fanny, Marion, Francesco, Emanuele, Charlotte, Alexia, Guillaume, Marisol, Jessica, Joana, Aurélie, Jang, Tony, Pina, Jamila, Thang, Marie, Louis, Marc, Maya, Bo, Laeticia, Sébastien, Graciela, Angélique, Christine, Marie-Paule, Xavier, Catherine, Cédric, Rachida, Marie-Nathalie.

Je tiens aussi à remercier les donneurs de sang pour leur générosité et les préleveurs pour leur disponibilité.

Pour finir, je veux remercier ma famille, en particulier mes parents, ma sœur Clara, Catherine pour leur soutien de tous les instants et leurs encouragements.

Sommaire

REMERCIEMENTS	5
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	12
ABRÉVIATIONS	13
AVANT-PROPOS.....	17
INTRODUCTION	19
HEMOSTASE, PLAQUETTES ET VAISSEAUX	21
I. <i>Hémostase primaire et secondaire</i>	21
II. <i>Plaquettes et intégrité vasculaire</i>	22
A. Les plaquettes contribuent à l'intégrité de l'endothélium sain et au maintien de sa barrière semi-perméable 22	
B. La vasoconstriction.....	23
III. <i>Les plaquettes</i>	24
A. Production des plaquettes : la mégacaryopoïèse	25
B. Structure des plaquettes.....	27
1. La membrane plasmique	27
2. Le cytosquelette	28
3. Les granules alpha, les granules denses et autres contenus granulaires	29
a. Les granules alpha	29
b. Les granules denses.....	30
c. Les autres structures granulaires.....	30
IV. <i>Les différentes étapes de l'activation des plaquettes</i>	32
A. Adhérence des plaquettes	32
1. Le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX	32
2. L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ et la glycoprotéine VI	36
3. Les autres récepteurs d'adhésion	40
B. Activation des plaquettes.....	40
1. Sécrétion des facteurs solubles plaquettaires.....	40
2. Voies d'activation et d'amplification	42
C. Agrégation des plaquettes	43
V. <i>Les récepteurs plaquettaires à motif ITAM</i>	45
A. C-type lectin-like receptor 2.....	45
1. Structure	45
2. Rôle dans la formation des vaisseaux lymphatiques	46
B. Fc γ RIIA.....	47
C. Régulation des récepteurs à motif ITAM : les récepteurs à motif ITIM.....	48
REACTIONS INFLAMMATOIRES, NEUTROPHILES ET VAISSEAUX	49
I. <i>Vaisseaux et réactions inflammatoires</i>	50

A.	Hétérogénéité des vaisseaux	52
1.	Endothélium	52
2.	Membrane basale	54
B.	Activation des cellules endothéliales	57
II.	<i>Réactions inflammatoires et polynucléaires neutrophiles</i>	58
A.	Hématopoïèse et leucocytes	58
B.	La granulopoïèse	59
C.	Formation et contenu des granules	61
D.	Neutrophile et défense	64
1.	Systèmes de défense dépendants de l'oxygène	64
a.	Les espèces réactives de l'oxygène	64
b.	L'activité de la myéloperoxydase	65
c.	Neutrophil Extracellular Traps	65
2.	Systèmes de défense indépendants de l'oxygène	66
a.	Les métalloprotéases matricielles	66
b.	Les protéases à sérine : cathepsine G, élastase et protéinase 3	67
c.	Autres peptides et enzymes	69
3.	La phagocytose	69
4.	Production de cytokines et de chimiokines	70
5.	Activation des neutrophiles	70
III.	<i>Recrutement des neutrophiles au site de la réaction inflammatoire</i>	71
A.	Capture et adhésion faible des leucocytes à l'endothélium	72
B.	Adhésion stable des leucocytes	73
C.	Diapédèse des leucocytes	73
D.	Hétérogénéité des réactions inflammatoires	75
IV.	<i>La réaction passive d'Arthus : une réaction inflammatoire stérile</i>	76
V.	<i>Résolution de la phase inflammatoire</i>	77
	REACTIONS INFLAMMATOIRES, IMMUNITÉ, PLAQUETTES ET VAISSEaux	79
I.	<i>Les plaquettes : des caractéristiques partagées avec les cellules immunitaires</i>	79
A.	Des récepteurs	79
B.	Des facteurs immunomodulateurs	80
C.	Production d'espèces réactives de l'oxygène	81
D.	Plaquettes et microparticules	81
E.	Plaquettes et pathogènes	82
II.	<i>Les plaquettes participent à toutes les étapes des réactions inflammatoires</i>	83
A.	Le recrutement des plaquettes à l'endothélium	84
B.	La perméabilité endothéliale	84
C.	L'infiltration des leucocytes	84
D.	La régulation des activités des neutrophiles et monocytes	84
III.	<i>Perméabilité endothéliale, infiltration des leucocytes et saignements inflammatoires : trois processus distincts</i>	93

A.	Perméabilité endothéliale et infiltration des leucocytes	93
B.	Perméabilité endothéliale et saignements inflammatoires	95
IV.	<i>Le maintien de l'intégrité vasculaire par les plaquettes dans les réactions inflammatoires</i>	97
OBJECTIFS DE LA THESE		103
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....		105
	Collagen Can Selectively Trigger a Platelet Secretory Phenotype via Glycoprotein VI	107
	Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice	125
	The contribution of platelet GPVI and CLEC-2 to vascular integrity during inflammation is stimulus and organ dependent.....	125
	Neutrophil-endothelial cell interactions determine the regulation of neutrophil activities by platelets..	165
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		193
I.	<i>Les neutrophiles sont responsables des saignements inflammatoires chez les souris thrombopéniques</i> 195	
II.	<i>Plaquettes et prévention des saignements inflammatoires</i>	196
III.	<i>Plaquettes et régulation des activités des neutrophiles</i>	205
IV.	<i>Clinique et nouvelles pistes thérapeutiques</i>	213
V.	<i>Conclusion</i>	218
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		219

Liste des Figures

- Figure 1** : Formation d'un caillot fibrino-plaquettaire après exposition du sous-endothélium
- Figure 2** : Observation par microscopie électronique de capillaires de lapin avec un compte plaquettaire normal ou de lapin thrombopénique
- Figure 3** : Mesure de la réponse contractile d'artère coronaire de chien avec ou sans endothélium, pré-contractée en réponse à la prostaglandine F_{2α}, et en présence de plaquettes autologues
- Figure 4** : Dessins d'observation de plaquettes par Bizozzero
- Figure 5** : Les étapes de la mégacaryopoïèse
- Figure 6** : Plaquettes humaines observées en microscopie électronique à transmission
- Figure 7** : Représentation du complexe de la GPIb-V-IX.
- Figure 8** : Signalisation plaquettaire en aval du complexe GPIb-V-IX
- Figure 9** : La glycoprotéine VI et sa voie de signalisation
- Figure 10** : Modèle moléculaire de la sécrétion des granules plaquettaires
- Figure 11** : Les récepteurs PARs chez l'humain et la souris
- Figure 12** : Les principales voies d'activation des plaquettes sanguines
- Figure 13** : Les récepteurs portant un motif ITAM sur les plaquettes humaines et murines
- Figure 14** : L'expression de CLEC-2 sur la lignée mégacaryocytaire est essentielle au développement et au maintien de l'intégrité des vaisseaux lymphatiques
- Figure 15** : Les signes cardinaux de l'inflammation et de sa résolution d'après Cornelius Celsus
- Figure 16** : La réaction inflammatoire doit être finement régulée
- Figure 17** : Dessin d'observation de Rudolph Wagner en 1839 montrant l'interaction des leucocytes avec un vaisseau dans l'épiderme d'une grenouille
- Figure 18** : Hétérogénéité structurale des endothéliums chez la myxine observée par microscopie électronique
- Figure 19** : Localisation et composition de la membrane basale vasculaire
- Figure 20** : Ultrastructure de la membrane basale de différents vaisseaux observée par microscopie électronique
- Figure 21** : La membrane basale glomérulaire
- Figure 22** : L'hématopoïèse
- Figure 23** : Les différentes étapes de la granulopoïèse
- Figure 24** : Neutrophile humain observé en microscopie électronique
- Figure 25** : Les différents granules des neutrophiles et leur contenu
- Figure 26** : La NADPH oxydase
- Figure 27** : Observation des *Neutrophil extracellular traps* par microscopie électronique ou après immuno-marquage de l'élastase neutrophilaire, de l'ADN ou des complexes histones H2A-H2B-ADN

Figure 28 : Structure schématique des métalloprotéases matricielles (MMPs)

Figure 29 : La phagocytose

Figure 30 : Les principaux récepteurs exprimés par les neutrophiles et leurs voies de signalisation

Figure 31 : Les étapes de l'extravasation des neutrophiles après la reconnaissance d'un signal de danger

Figure 32 : Extrait des comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la société de biologie de l'année 1903

Figure 33 : La résolution de l'inflammation est un processus actif

Figure 34 : Evolution du système hémostatique : des invertébrés aux mammifères

Figure 35 : Schéma des récepteurs plaquettaire mis en jeu dans les interactions avec les virus

Figure 36 : Observation en microscopie électronique du recrutement des plaquettes avant et lors d'une dermatite irritante chez la souris

Figure 37 : Perméabilité endothéliale et diapédèse des leucocytes sont deux processus distincts

Figure 38 : Observation par microscopie électronique des vaisseaux du muscle crémaster de rat après injection de sérotonine ou d'histamine

Figure 39 : Observation microscopique après immuno-marquage de la membrane basale des vaisseaux cutanés de lapin après une réaction immunologique

Figure 40 : Les plaquettes préviennent la survenue des saignements inflammatoires

Figure 41 : Seule une thrombopénie sévère conduit à des saignements inflammatoires

Figure 42 : Construction de la souris hIL4R α /GPIb α

Figure 43 : Les récepteurs plaquettaire avec un motif ITAM préviennent les saignements inflammatoires cutanés

Figure 44 : Les plaquettes assurent la stabilité des vaisseaux tumoraux

Figure 45 : La glycoprotéine VI participe aussi bien à l'activation des neutrophiles qu'à la réparation des dommages vasculaires dans une réaction immuno-induite dans la peau

Figure 46 : La podoplanine est exprimée à proximité des micro-vaisseaux cutanés CD31+ de souris

Figure 47 : Cinétique de réparation d'une lésion cérébrovasculaire par un macrophage chez le poisson zèbre

Figure 48 : Caractérisation du phénotype des cellules endothéliales (HUVECs) ensemencées sur labtek ou sur transwell

Figure 49 : Quantification du stress oxydant dans le plasma

Figure 50 : Quantification du contenu intra-tumoral en hémoglobine

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Contenu des granules alpha, denses et lysosomes plaquettaires

Tableau 2 : Les principaux ligands du complexe GPIb-V-IX et leurs fonctions

Tableau 3 : Principaux récepteurs leucocytaires et endothéliaux mis en jeu dans l'extravasation des leucocytes

Tableau 4 : Les possibles interactions entre (i) les plaquettes et la membrane basale et entre (ii) les plaquettes et les neutrophiles

Abréviations

5-HT : Sérotonine

A

AC : Adénylate cyclase

ADAM : A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein

ADAMTS 13 : A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13

ADP : Adénosine diphosphate

ANCA : Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies

ATP : Adénosine triphosphate

α -SMA : Alpha-smooth muscle actin

AVC : Accident vasculaire cérébrale

B

BPCO: Broncho-pneumopathie chronique obstructive

BSA : Bovine serum albumin

β -TG : β -thromboglobuline

C

C : Fraction du complément

CalDAG-GEF1 : Ca²⁺ and DAG-regulated guanine nucleotide exchange factor 1

cAMP : Cyclic adenosine monophosphate

CCL : CC chemokine ligand

CCR : CC chemokine receptor

CD : Clusters of differentiation

CEACAM-1 ou CD66a : Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule-1

CLEC-2 : C-type lectin-like receptor 2

CLP : Cecal ligation and puncture

CMLs : Cellules musculaires lisses

c-Mpl : Cellular-myeloproliferative leukemia

CR : Récepteur du complément

CRP : Collagen-related peptide

CXCL : CXC motif ligand

D

DAB : 3, 3'-diaminobenzidine

DAG : Diacylglycerol

DAMPs : Damage-associated molecular pattern molecules

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DTS : Dense tubular system

E

EGF : Epidermal growth factor

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EMMPRIN ou CD147 : Extracellular matrix metalloproteinase inducer

Epac1 : Exchange protein directly activated by cAMP 1

EPO : Erythropoïétine

F

F : Facteur coagulation

FeCl₃ : Chlorure de fer

FGF : Fibroblast growth factor

FITC : Fluorescein isothiocyanate

fMLP : N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

FT : Facteur tissulaire

G

GCD : Chronic granulomatous disease

G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factor

GP : Glycoprotéine

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

H

HCAECs : Human coronary artery endothelial cells

HCl : Acide chlorhydrique

HEVs : High endothelial venules
HMWK : High molecular weight kininogen
HPA : Human platelet antigen
HUVECs : Human umbilical venous
endothelial cells

I

ICAM : Intercellular adhesion molecule
IGF : Insulin-like growth factor
IL : Interleukine
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based
activation motif
ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based
inhibition motif
IV : Intraveineux

J

JAMs : Junctional adhesion molecules

K

KO : Knock-Out

L

LADs : Leukocyte adhesion deficiencies
LAMP-2/3 : Lysosomal-associated membrane
protein-2/3
LAT : Linker for activation of T cells
LCMV : Lymphocytic choriomeningitis virus
LER : Low expression region
LFA-1 : Lymphocyte function-associated
antigen 1
LIF : Leukemia inhibitory factor
LILRB : Leukocyte immunoglobulin-like
receptor subfamily B
LPS : Lipopolysaccharide
LRR : Leucine-rich repeat protein

M

MAC-1 ou CR3 : Macrophage-1 antigen
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MCP-1 ou CCL2 : Monocyte chemotactic
protein 1

MEC : Matrice extracellulaire
MMPs : Matrix metalloproteinases
MPO : Myéloperoxydase

N

NETs : Neutrophil extracellular traps
NO : Nitric oxide
NOS : Nitric oxide synthases
NOX : NADPH oxydase

O

OCS : Open canalicular system

P

PAF : Platelet activated factor
PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1
PAMPs : Pathogen-associated
molecular patterns
PARs : Protease activated receptors
PDGF : Platelet-derived growth factor
PECAM-1 ou CD31 : Platelet endothelial cell
adhesion molecule 1
PF4 : Platelet factor 4
PGE2 : Prostaglandine E2
PGI2 : Prostaglandine I2 ou prostacycline
PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase
PI (4,5) P2 : Phosphatidylinositol 4,5-
bisphosphate
PIRB : Paired immunoglobulin-like receptors

B

PKA/C/G : Protein kinase A/C/G
PLC : Phospholipase C
Plt : Platelet
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate
Pn : Neutrophil
PN-1 : Protéine nexine-1 ou Serpine E2
PNADs : Peripheral-node addressins
PPP : Plasma pauvre en plaquette
PRP : Plasma riche en plaquette
PRR : Pattern recognition receptors

PS : Phosphatidylsérine

PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1

PTP : Protein tyrosine phosphatase

R

RANTES ou CCL5 : Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

Rap1 : Ras-related protein 1

RASA3 : Ras GTPase-activating protein 3

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

ROS : Reactive oxygen species

rpA : Réaction passive d'Arthus

S

S1P : Sphingosine-1-phosphate

SCF : Stem cell factor

SFK : Src family kinases

SHP : Src homology protein tyrosine phosphatase

S-Lex : Sialyl LewisX

SLP-76 : Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kD

SLPI : Secretory leukocyte protease inhibitor

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptors

T

TAFI : Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor

TAMs : Tumor-associated macrophages

TFPI : Tissue factor pathway inhibitor

TGF- β : Transforming growth factor β

TIMPs : Tissue inhibitors of metalloproteinases

TLR : Toll-like receptor

TLT-1: TREM like transcript-1

TM : Thrombomoduline

tMCAO : Transient middle cerebral artery occlusion

TNF- α : Tumor necrosis factor α

t-PA : Tissue plasminogen activator

TPO : Thrombopoïétine

TREM-1: Triggering receptor expressed on myeloid cells 1

TSP : Thrombospondine

U

u-PA : urokinase plasminogen activator

UV : Ultraviolet

V

VAMP : Vesicular associated membrane protein

VCAM : Vascular cell adhesion molecule

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VLA-3/4 : Very late antigen 3/4

VNTR : Variable number of tandem repeat

vWF : von Willebrand factor

W

WPB : Weibel-Palade body

Avant-propos

Les plaquettes : des cellules à part entière

Les plaquettes sont issues de la fragmentation des mégacaryocytes. Leur classification en tant que cellule est encore sujette à controverse du fait de l'absence de noyau, qui en constitue classiquement la définition.

Cependant, nous considérons ici les plaquettes comme des cellules à part entière. Différents arguments, défendus par plusieurs auteurs (Weyrich 2014, Garraud and Cognasse 2015, Kubes 2016), justifient ce choix :

- 1- Les plaquettes ont de multiples récepteurs exprimés de façon constitutionnelle à leur membrane ou mobilisés selon le contexte
- 2- Plusieurs types de granules contenant des médiateurs solubles de nature différente sont présents dans les plaquettes
- 3- Les plaquettes ont des réponses variables traduisant une diversité de fonctions selon l'environnement et le contexte physio- ou physiopathologique
- 4- Les plaquettes synthétisent *de novo* des protéines à partir du matériel génétique présent dans leur cytoplasme
- 5- Des facteurs de transcription avec des fonctions non-génomiques sont présents dans leur cytoplasme
- 6- Une structure habituellement présente dans le compartiment nucléaire, le *spliceosome*, est trouvée dans les plaquettes
- 7- Un inflammasome fonctionnel, complexe macromoléculaire de l'immunité innée, est détecté dans les plaquettes

Tous ces éléments éloignent les plaquettes de l'image de « cytoplasme anucléé », de « sac de colle » (Weyrich 2014) et les rapprochent de la biologie cellulaire.

Les plaquettes : de l'hémostase à l'immunité

Les fonctions des plaquettes ont été redécouvertes tout au long des recherches menées sur ces cellules. Le premier rôle des plaquettes est d'assurer l'hémostase primaire en cas de traumatisme (Versteeg, Heemskerk et al. 2013). Probablement dérivées de leurs ancêtres les hémocytes, cellules circulant dans l'hémolymphe des invertébrés, les plaquettes ont aussi une fonction immunitaire. Elles participent directement aux réponses immunitaires en interagissant, par exemple, avec les virus et les bactéries (Semple, Italiano et al. 2011).

Les plaquettes contribuent également indirectement aux réponses immunitaires en modulant les fonctions des cellules immunitaires, de leur mobilisation à leurs fonctions effectrices. Cette régulation concerne toutes les cellules de l'immunité innée et adaptative : granulocytes, monocytes/macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes. Les plaquettes interviennent ainsi à toutes les étapes des réactions immunitaires, de leur initiation en régulant la perméabilité endothéliale, à leur résolution. Au cours d'une réaction inflammatoire, elles participent particulièrement au maintien de l'intégrité vasculaire c'est-à-dire à la prévention des saignements d'origine inflammatoire, qui sont à différencier des saignements provoqués par des traumatismes.

Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse s'est intéressé à deux aspects des plaquettes dans les réactions inflammatoires.

1- Bien que le rôle des plaquettes dans la prévention des saignements dans les réactions inflammatoires soit établi, les mécanismes de cet effet protecteur ne sont pas clairement identifiés (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008). Nous avons recherché ces mécanismes et déterminé leur originalité par rapport à ceux mis en jeu dans l'hémostase primaire.

2- En parallèle, nous avons cherché à comprendre comment les plaquettes régulent les fonctions effectrices des neutrophiles qui sont les premières cellules mobilisées lors d'une réaction inflammatoire. Ce travail a été mené grâce à la mise en place d'un modèle d'étude *in vitro* permettant l'analyse des interactions entre les plaquettes, les neutrophiles et les cellules endothéliales.

Introduction

I. Hémostase primaire et secondaire

L'hémostase désigne l'ensemble des processus physiologiques permettant de maintenir l'intégrité vasculaire. Elle se décompose schématiquement en trois phases : l'hémostase primaire, la coagulation plasmatique et la fibrinolyse. L'hémostase primaire se met en place très rapidement après la formation d'une brèche vasculaire et aboutit à la formation d'un agrégat plaquettaire. La coagulation a lieu de manière simultanée et complémentaire (**Figure 1**). Elle consiste en l'activation en cascade des facteurs de coagulation (zymogènes) et résulte en la génération de thrombine qui permet la formation d'un réseau de fibrine qui consolide le clou plaquettaire (Versteeg, Heemskerk et al. 2013). La fibrinolyse, permet la dissolution de la fibrine, le rétablissement de la perméabilité vasculaire et la cicatrisation. L'hémostase nécessite une régulation fine afin de ne pas aboutir à un processus pathologique : une activation excessive ou inappropriée aboutit à une maladie thrombotique et à l'inverse un défaut d'activation mène vers une maladie hémorragique.

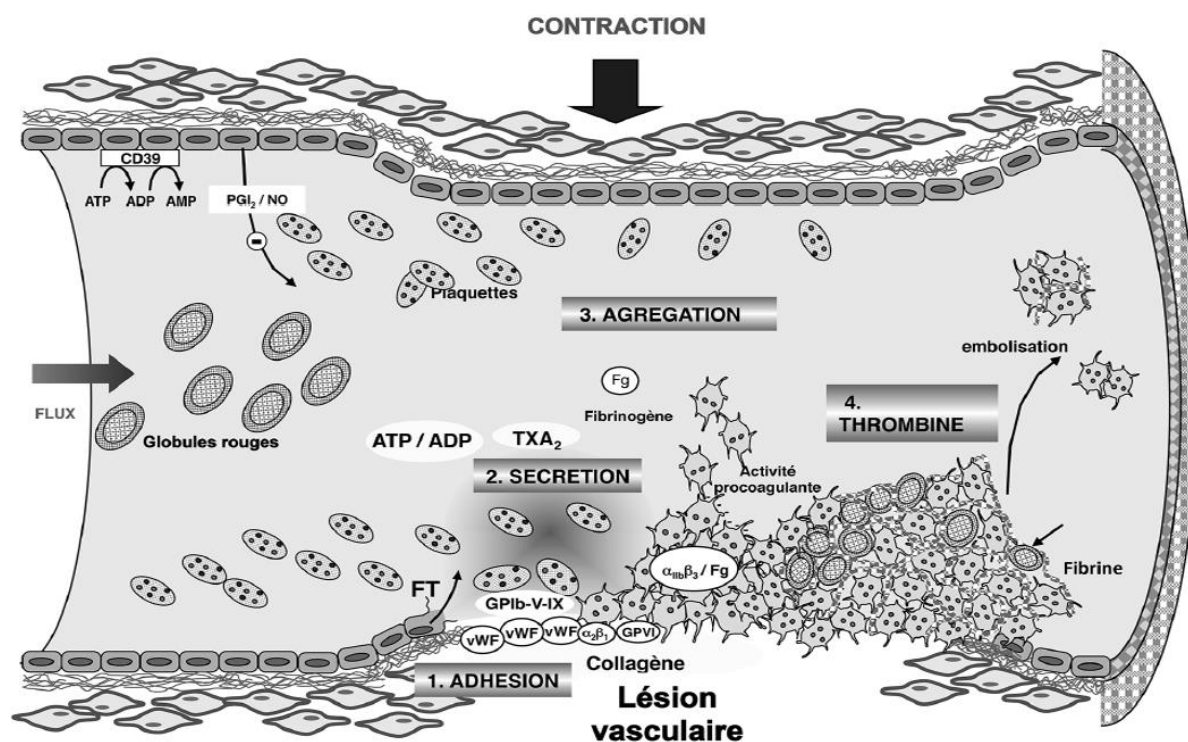


Figure 1 : Formation d'un caillot fibrino-plaquettaire après exposition du sous-endothélium. Vue générale des mécanismes de l'hémostase primaire avec l'activation des plaquettes et secondaire avec la cascade d'activation des facteurs de la coagulation aboutissant à la formation d'un thrombus fibrino-plaquettaire (Gachet 2013).

II. Plaquettes et intégrité vasculaire

A. Les plaquettes contribuent à l'intégrité de l'endothélium sain et au maintien de sa barrière semi-perméable

Si les plaquettes ont un rôle primordial dans l'arrêt des saignements et la réparation vasculaire, elles sont aussi essentielles à l'intégrité de l'endothélium sain et à sa fonction de barrière semi-perméable.

Un des premiers à avoir noté la participation des plaquettes dans le maintien de la fonction de barrière de l'endothélium est Danielli en 1940 (Danielli 1940) qui tentait alors d'éclaircir des observations des années 1920 portant sur la vasodilatation et la formation de l'œdème. Dans son article, il conclut à la diminution de l'œdème en présence des plaquettes par un effet physique de ces cellules dans un modèle de perfusion de fluide chez la grenouille.

Cette conclusion est confirmée par une étude de Gimbrone (Gimbrone, Aster et al. 1969) qui évalue l'intégrité vasculaire dans des lobes thyroïdiens de chien après perfusion de plasma hépariné pauvre en plaquettes (PPP) ou riche en plaquettes (PRP). Plusieurs critères d'évaluation sont retenus dont la formation d'œdème et de pétéchies. L'œdème est significativement augmenté lorsque le perfusât ne contient pas de plaquettes (PPP). En plus de cet œdème augmenté, les discontinuités et les nécroses de l'endothélium sont plus fréquentes.

Ces premières études ayant été réalisées sur des organes perfusés, la question de l'état de « quiescence » de l'endothélium se pose. Cependant, ces observations ont depuis été confirmées chez des animaux et des patients thrombopéniques.

En effet, des travaux chez le lapin (Kitchens and Weiss 1975) montrent par microscopie électronique que les animaux thrombopéniques ont un endothélium plus fin et fenêtré (**Figure 2**). Après le rétablissement d'un compte plaquettaire normal ces modifications ne sont plus observées. Ces observations sont ensuite complétées par une évaluation de l'endothélium chez des patients thrombopéniques à partir de biopsies cutanées ou musculaires. L'endothélium des capillaires des patients thrombopéniques est aussi plus fin et présente des fenestrations anormales dans les territoires vasculaires explorés (Kitchens and Pendergast 1986).

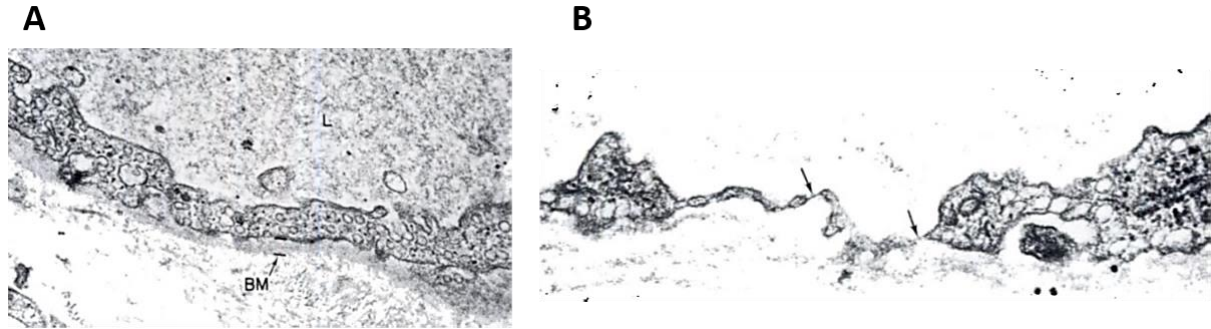


Figure 2 : Observation par microscopie électronique de capillaires de lapin avec un compte plaquettaire normal (A) ou de lapin thrombopénique (B). L'endothélium est plus fin et fenêtré (flèche) chez le lapin thrombopénique. BM : membrane basale ; L : lumière vasculaire (adapté de (Kitchens and Weiss 1975)).

Par la suite, des études *in vitro* sur des cultures de cellules endothéliales ont montré que des facteurs solubles présents dans les plaquettes tels que l'adénosine (Paty, Sherman et al. 1992), l'angiopoïétine-1 (Thurston, Rudge et al. 2000, Li, Huang et al. 2001), la sphingosine-1-phosphate (Schaphorst, Chiang et al. 2003), l'acide lysophosphatidique (Alexander, Patton et al. 1998) ou d'autres lipides d'origine plaquettaire (Minnear, Patil et al. 2001) pouvaient reproduire les effets des plaquettes sur le maintien de la barrière semi-perméable de l'endothélium.

Les effets régulateurs des plaquettes et des cellules endothéliales sont bidirectionnels. L'endothélium sain maintient les plaquettes dans un état de repos en produisant de la prostaglandine I₂ (PGI₂), de l'oxyde nitrique (NO), en métabolisant l'ADP par des ecto-ADPases ou ecto-nucléotidases (la CD39 et la CD73) et en limitant la formation de la thrombine par l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI) et par la voie de la thrombomoduline et de la protéine C (Marcus, Safier et al. 1991, Kaczmarek, Koziak et al. 1996, Marcus, Broekman et al. 1997, Broos, De Meyer et al. 2012, Versteeg, Heemskerk et al. 2013).

Les plaquettes exercent aussi un contrôle sur la contraction ou la relaxation des vaisseaux par un dialogue avec les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.

B. La vasoconstriction

Avant l'entrée en jeu des plaquettes dans l'hémostase primaire, la première réponse à une lésion vasculaire consiste en une vasoconstriction rapide et localisée aux vaisseaux blessés. Cette vasoconstriction permet de réduire le flux sanguin et de concentrer les acteurs de l'hémostase (plaquettes, facteurs solubles et facteurs de coagulation) au site de la lésion par réduction de la lumière

vasculaire. Elle est permise grâce aux propriétés contractiles des vaisseaux et aux facteurs solubles plaquettaires ou plasmatiques comme le thromboxane A2 (TxA2) et la sérotonine (5-HT).

En effet, des études réalisées (Cohen, Shepherd et al. 1983(a), Cohen, Shepherd et al. 1983(b)) sur des artères isolées en bain d'organe ont montré des effets opposés des plaquettes activées sur des artères saines et des artères dénuées d'endothélium. La présence de plaquettes agrégées au contact d'une artère coronaire de chien augmente transitoirement la contractilité de celle-ci avant d'induire une relaxation. En revanche après ablation de la couche de cellules endothéliales, les plaquettes agrégées n'induisent qu'une réponse contractile (**Figure 3**). Par l'utilisation d'agents pharmacologiques spécifiques, les auteurs ont montré que la sérotonine était à l'origine de ces effets opposés. En effet, en agissant sur les cellules musculaires lisses la sérotonine induit une contraction. Or celle-ci est inhibée par l'action de cette même sérotonine sur les cellules endothéliales. Ce mécanisme peut expliquer la vasoconstriction observée lorsque l'endothélium est lésé.

Le thromboxane A2 n'a qu'un effet contractile sur les cellules musculaires lisses tandis que l'ADP a un effet relaxant sur l'endothélium (Vanhoutte and Houston 1985). Le poids des nucléotides ADP/ATP et de la sérotonine dans l'effet relaxant est très probablement variable selon les espèces et la quantité de ces médiateurs solubles contenue dans leurs granules plaquettaires (Houston, Shepherd et al. 1986).



Figure 3 : Mesure de la réponse contractile d'artère coronaire de chien avec ou sans endothélium, pré-contractée en réponse à la prostaglandine F₂α, et en présence de plaquettes autologues. (adapté de (Cohen, Shepherd et al. 1983(b)))

III. Les plaquettes

Le 21 janvier 1882, *The Lancet* publie un article « *A new blood corpuscle* » dans lequel Bizzozero, médecin et scientifique italien, décrit les plaquettes et leur fonction dans l'hémostase et la thrombose. Cette découverte, initialement publiée en décembre 1881 dans une revue italienne (Coller 1984), explique pour la première fois les fonctions plaquettaires. Les plaquettes ont déjà été observées par d'autres mais leur rôle reste obscur jusqu'aux travaux de Bizzozero. Il décrit des corpuscules discoïdes sans noyau ni hémoglobine (contrairement aux premières descriptions des grecs anciens) mais avec des granules. Avant lui, Hayem avait parfaitement observé ces corps discoïdes mais les avait décrits comme les précurseurs des globules rouges. Quant à Neumann, il décrit les plaquettes comme des globules

rouges endommagés. Bizzozero décrit alors les plaquettes comme des éléments indépendants des globules rouges et des leucocytes, d'un diamètre de 2 à 3 μ m et qui *in vivo* sont des éléments circulants. Il observe également leur rapide changement de forme lors d'une blessure qui mène à la formation d'agrégats (**Figure 4**). Il décrit leur rôle dans le maintien de l'intégrité vasculaire (qui pouvait être jusque-là attribué aux seuls leucocytes) et dans les maladies thrombotiques (Mazzarello, Calligaro et al. 2001). Mark Schultze avait quelques années avant, en 1865, commencé à décrire les plaquettes et leur agrégation lors d'une étude sur les leucocytes (Brewer 2006).

A partir de ces premières observations microscopiques, l'étude des plaquettes se développe et continue jusqu'aujourd'hui.

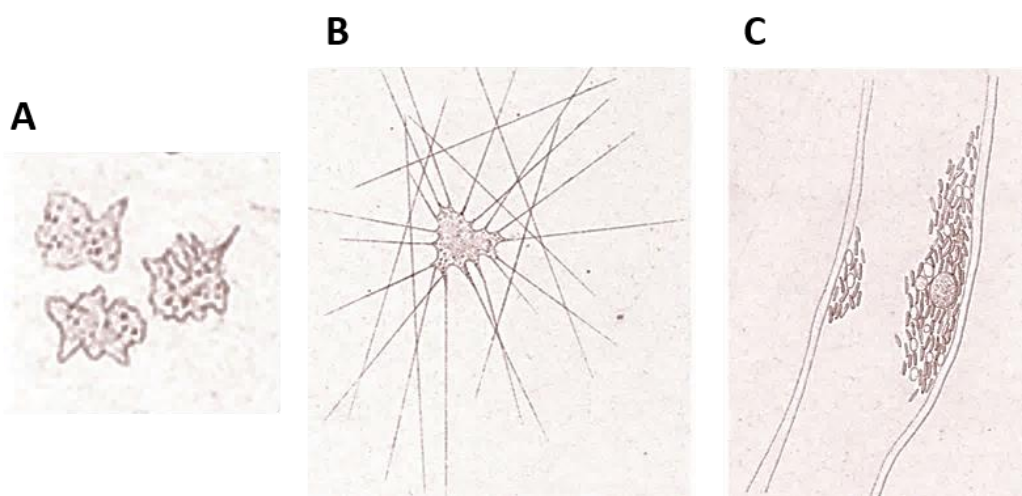


Figure 4 : Dessins d'observation de plaquettes par Bizzozero. Plaquettes de chien dessinées par Bizzozero immédiatement après prélèvement sanguin (A) ou huit minutes plus tard (B). Dans ce dernier cas, les plaquettes forment un agrégat en présence de fibrine. Dessin réalisé par Bizzozero d'après l'observation de thrombi dans un vaisseau mésentérique de cochon d'Inde (C) (cité par (Mazzarello, Calligaro et al. 2001)).

A. Production des plaquettes : la mégacaryopoïèse

Les plaquettes sont issues de la fragmentation des mégacaryocytes formés dans la moelle osseuse. La mégacaryopoïèse conduit à la formation de plaquettes fonctionnelles. Elle comprend plusieurs étapes : à partir des cellules souches hématopoïétiques puis des progéniteurs mégacaryocytaires, un processus de prolifération, de différenciation puis de polyploïdisation et de maturation se met en place avant la formation et la libération des pro-plaquettes dans la circulation sanguine (**Figure 5**).

Ces processus sont très finement régulés et en particulier par deux gènes *GATA-1* pour la différenciation et *NF-E2* pour la formation des pro-plaquettes. La mégacaryopoïèse est aussi sous le

contrôle d'une hormone la thrombopoïétine (TPO) d'origine hépatique et de son récepteur c-Mpl (*cellular-myeloproliferative leukemia*), dont l'expression est respectivement sous le contrôle des gènes *TPO* et *C-MPL* (Chang, Bluteau et al. 2007). D'autres facteurs physico-chimiques sont également requis pour une mégacaryopoïèse optimale (Aguilar, Pertuy et al. 2016).

Les gènes codant les facteurs de transcription GATA-1 et NF-E2 ainsi que le gène codant le récepteur de la thrombopoïétine c-Mpl ont été ciblés et modifiés pour obtenir des souris thrombopéniques (Gurney, Carver-Moore et al. 1994, Levin, Peng et al. 1999, Vyas, Ault et al. 1999).

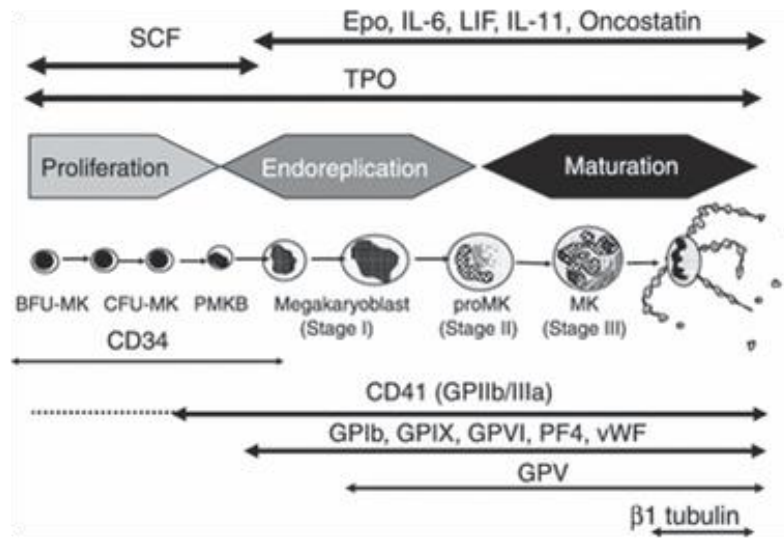


Figure 5 : Les étapes de la mégacaryopoïèse. La mégacaryopoïèse comprend plusieurs étapes dont les principales sont la prolifération des progéniteurs, l'endoréplication et la maturation qui aboutissent à la plaquettogénèse. Chaque étape de ce processus est sous le contrôle de facteurs (indiqués en haut de la figure) et associés à l'expression de marqueurs spécifiques (indiqués en bas de la figure) (Chang, Bluteau et al. 2007).

Bien que des différences existent entre les plaquettes humaines et les plaquettes murines (Schmitt, Guichard et al. 2001), les deux espèces présentent de nombreuses similitudes faisant des souris un modèle d'étude convenable. Parmi les différences remarquables, les plaquettes de souris sont plus petites mais plus nombreuses que chez l'Homme. La mégacaryopoïèse présente aussi quelques différences notamment par la présence de mégacaryocytes dans la rate. Pour la suite de ce chapitre, les plaquettes humaines seront principalement décrites.

Chez l'Homme, environ 10^{11} plaquettes sont produites par jour (Chang, Bluteau et al. 2007). Une fois libérées dans la circulation générale, les plaquettes ont une durée de vie de 10 jours chez l'humain (Kaushansky 2005) et de 5 jours chez la souris (Berger, Hartwell et al. 1998). Elles sont éliminées par les macrophages du système réticulo-endothélial notamment dans la rate et le foie (Mustard, Rowsell et al. 1966, Dowling, Josefsson et al. 2010).

B. Structure des plaquettes

Les plaquettes sanguines au repos sont de forme discoïde (**Figure 6A**) avec une taille de 2 à 4 μm de diamètre. Chez l'humain, le nombre normal de plaquettes est compris entre 150 000 et 400 000 plaquettes par microlitre tandis que chez la souris les études rapportent des comptes compris entre 400 000 à 1 600 000 plaquettes par microlitre (Jirouskova, Shet et al. 2007).

En microscopie électronique, on observe la présence de granules alpha (α) et denses (δ), de lysosomes, de mitochondries, du système canaliculaire ouvert (OCS), du système tubulaire dense (DTS) et d'un réseau de microtubules important formant la bande marginale. Des grains de glycogène et un peroxyosome (catalase) sont aussi présents dans le cytoplasme.

Au contact du sous-endothélium, exposé en cas de blessure, les plaquettes s'activent et changent de forme. Elles deviennent alors sphériques et émettent des pseudopodes (**Figure 6B**).

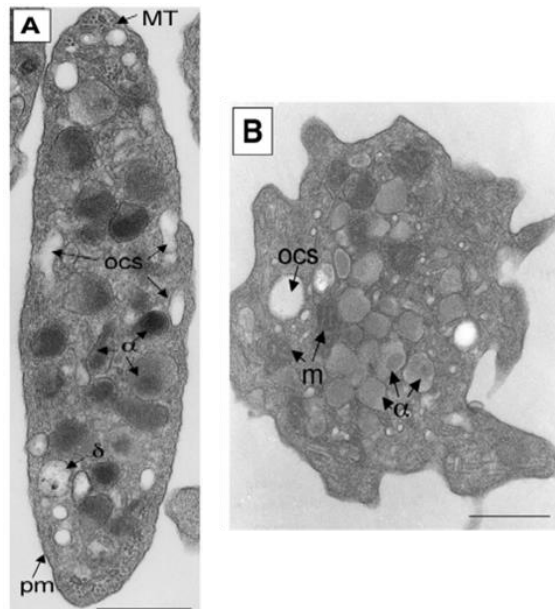


Figure 6 : Plaquettes humaines observées en microscopie électronique à transmission. *Plaquette au repos de forme discoïde (A) ou plaquette de forme sphérique (B) avec des pseudopodes après activation à l'adénosine diphosphate (ADP). Sur ces photos, la membrane plasmique (pm), les granules alpha (α), les granules denses (δ), les mitochondries (m) et le système canaliculaire ouvert (ocs) sont observables. Barre = 500nm (Cazenave, Ohlmann et al. 2004).*

1. La membrane plasmique

La membrane plasmique des plaquettes est composée d'une bicouche lipidique riche en phospholipides et en cholestérol. Les phospholipides sont disposés de manière asymétrique grâce à l'activité d'une flippase (translocase d'aminophospholipides dépendante de l'ATP) ; les phospholipides

chargés négativement étant sur le feuillet interne des plaquettes au repos. A l'inverse lors de l'activation des plaquettes, floppase et scramblase exposent sur le feuillet externe ces phospholipides chargés négativement comme la phosphatidylsérine (PS). La membrane plasmique sert alors de plateforme d'activation à la coagulation. Les radeaux (*rafts*) lipidiques (formés par le cholestérol et les sphingolipides) supportent la signalisation et le transport intracellulaire. L'osmolarité des plaquettes est assurée grâce à des pompes sodiques et calciques.

Les glycoprotéines, glycolipides et récepteurs impliqués dans toutes les étapes de l'activation des plaquettes, de leur adhésion à leur agrégation, sont ancrés à la membrane plasmique et/ou stockés à la membrane des granules alpha. Plusieurs familles de récepteurs ont été identifiées : des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), des intégrines ou des glycoprotéines appartenant à d'autres familles (*Leucine-rich glycoproteins* ou superfamille des immunoglobulines).

Deux structures sont remarquables au niveau de la membrane plasmique des plaquettes : le système canaliculaire ouvert (OCS) et le système tubulaire dense (DTS).

Le système canaliculaire ouvert facilite les échanges entre les plaquettes et le milieu extérieur en augmentant la surface d'échange ; il constitue une voie de communication possible vers l'extérieur avec l'entrée de molécules par endocytose et la sécrétion de facteurs plaquettaires solubles par exocytose. Il pourrait être impliqué dans la sécrétion différentielle des facteurs contenus dans les granules alpha. L'OCS constitue aussi une réserve de membrane plasmique nécessaire à la plaquette pour la formation de filopodes et son étalement lors de l'activation plaquettaire. Il tient enfin lieu de réservoir pour le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX.

Le système tubulaire dense est un réseau membranaire clos qui constitue une réserve de calcium (à la manière d'un réticulum endoplasmique). Le calcium contenu dans le DTS peut être exporté vers le cytoplasme lors de l'activation des plaquettes et contribuer à cette activation (Thon and Italiano 2012).

2. Le cytosquelette

Le cytosquelette des plaquettes a un rôle essentiel dans le maintien de leur forme discoïde à l'état de repos et dans leur résistance aux forces de cisaillement. Le réseau de spectrine, d'actine et la zone marginale de microtubules en sont ses composants principaux (Thon and Italiano 2012). La myosine IIA participe à ce cytosquelette avec une importance toute particulière lors de la formation des plaquettes (Aguilar, Pertuy et al. 2016).

Le réseau de spectrine qui comprend 2 000 molécules est relié à la fois à la membrane plasmique et au cytosquelette d'actine.

L'actine est la protéine plaquettaire la plus abondante (Hartwig and DeSisto 1991). Elle est présente à la fois sous forme de monomère et de polymère. La filamine et l' α -actinine sont aussi représentées en grande quantité et contribuent à la formation du réseau dense d'actine en liant les fibres d'actine entre

elles. La filamine permet l'ancrage du complexe GPIb-V-IX au cytosquelette de la plaquette. La liaison entre GPIb α et la filamine est cruciale dans la formation et le maintien de la forme discoïde des plaquettes.

La myosine IIA a un rôle déterminant dans les premières étapes de la mégacaryopoïèse, au moment de la distribution des organelles dans le cytoplasme (granules et mitochondrie). Elle est nécessaire à la structuration du cytosquelette des futures plaquettes et à la formation du réseau d'actine (Pertuy, Eckly et al. 2014).

La zone marginale de microtubules est une caractéristique propre des plaquettes. Ces microtubules (entre 8 et 12) sont également présents sous forme de dimères ou de polymères. La description de ce réseau plaquettaire de microtubules date des travaux de White dans les années 1960 (White 1968). Sa fonction est de maintenir la forme discoïde des plaquettes au repos (Thon and Italiano 2012). En cas d'activation plaquettaire, la réorganisation de ce réseau de microtubules engendre le changement de forme caractéristique des plaquettes activées (Diagouraga, Grichine et al. 2014).

Plus généralement, l'activation des plaquettes conduit à la réorganisation rapide de tout le cytosquelette plaquettaire. Les moteurs moléculaires que sont les myosines, les dynéines et les kinésines en sont les principaux acteurs (Sadoul 2015).

3. Les granules alpha, les granules denses et autres contenus granulaires

a. Les granules alpha

Les granules alpha (α) sont les granules présents en plus grande quantité dans les plaquettes : de 40 à 80 granules par plaquette. Ils mesurent entre 200 et 500 nm de diamètre et apparaissent avec un cœur noir en microscopie électronique. Le contenu des granules alpha provient de la synthèse de protéines par le mégacaryocyte et de l'endocytose et/ou pinocytose de protéines plasmatiques (Thon and Italiano 2012). Parmi les 4 000 à 4 500 protéines dénombrées dans les plaquettes, 1 045 seraient présentes dans les granules alpha (**Tableau 1**). Ces protéines peuvent :

- être exclusivement synthétisées par les mégacaryocytes comme le facteur plaquettaire 4 (PF4) et la β -thromboglobuline (β -TG),
- avoir une origine mixte, avec une synthèse par les mégacaryocytes et d'autres types cellulaires, comme le facteur von Willebrand (vWF), la P-sélectine (ou CD62P), la thrombospondine (TSP), le PDGF ou le TGF- β ,
- provenir d'une synthèse uniquement extra-mégacaryocytaire et être incorporées ensuite par endocytose dans les mégacaryocytes et les plaquettes comme le fibrinogène, les immunoglobulines G (IgG) ou la fibronectine.

Les composants du granule alpha sont majoritairement solubles et sécrétés dans le milieu extracellulaire comme les facteurs de coagulation. D'autres protéines sont spécifiques de la membrane des granules et sont externalisées à la surface des plaquettes activées comme la P-sélectine. Les facteurs présents en plus grande quantité dans les granules alpha sont le facteur plaquettaire 4, la thrombospondine et la β -thromboglobuline (500 ng pour 10^8 plaquettes). Leur dosage est donc utilisé en clinique pour diagnostiquer un défaut de synthèse par les mégacaryocytes et/ou de sécrétion par les plaquettes (Mumford, Frelinger et al. 2015). Le syndrome des plaquettes grises est une maladie hémorragique congénitale causée par des mutations sur le gène *NBEAL2* (*Neurobeachin-like 2*) (Gunay-Aygun, Falik-Zaccari et al. 2011) et caractérisée par une absence ou une réduction des granules alpha. Les souris *Nbeal2* *-/-* reproduisent le phénotype de cette maladie (Deppermann, Nurden et al. 2013). Récemment, des mutations du *Growth factor independence 1b gene* (*GFI1*) ont également été associées à des anomalies de formation des granules alpha (Nurden and Nurden 2016).

b. Les granules denses

Les granules denses (δ) ont une taille de 250 nm, et sont denses aux électrons en microscopie électronique. On en compte 3 à 8 par plaquette. Ils contiennent principalement des nucléotides (ATP, ADP), des catécholamines (sérotonine, histamine) et du calcium (**Tableau 1**). Les plaquettes constituent la principale source de sérotonine (5-HT) circulante. Tous ces facteurs sont des agonistes, plus ou moins forts, de l'activation plaquettaire et sont impliqués dans le recrutement des plaquettes et l'amplification de la réponse. Le syndrome de Hermansky-Pudlak est une affection multi-systémique congénitale causée par des mutations sur différents gènes et provoquant des altérations dans la formation des granules denses (Witkop, Krumwiede et al. 1987). Plusieurs modèles animaux existent pour modéliser les différentes maladies de ce syndrome (Meng, Wu et al. 2015). Les patients atteints de la maladie de Chédiak-Higashi, encore peu caractérisée, présentent aussi des défauts de formation et de sécrétion de leurs granules denses (Nurden, Freson et al. 2012).

c. Les autres structures granulaires

Quelques lysosomes sont présents dans les plaquettes (moins de 3 par plaquettes) et contiennent principalement des enzymes de digestion (**Tableau 1**).

Une équipe américaine a mis en avant l'existence d'un autre type de granule, appelé granule T dans les plaquettes humaines (Thon, Peters et al. 2012). Ces structures se caractérisent par un aspect tubulaire, sont denses aux électrons et contiendraient le récepteur TLR9 (*Toll-like receptor*). Ces résultats n'ont cependant pas encore été confirmés par d'autres équipes bien que des granules alpha de forme tubulaire aient déjà été décrits (White 2010).

Granules	Type de facteurs	Facteurs
Granule dense	Petites molécules	ATP, ADP, sérotonine, histamine, calcium, polyphosphate, pyrophosphate
Granule alpha	Glycoprotéines membranaires	GPIb, $\alpha_{IIb}\beta_3$
	Facteurs de coagulation	vWF, FV, FIX, FII, HMWK
	Inhibiteurs de la coagulation	TFPI, protéine S, Protéase Nexine-1
	Facteurs de la Fibrinolyse	PAI-1, TAFI, α_2 -antiplasmine, plasminogène, uPA
	Autres inhibiteurs de protéases	α_1 -antitrypsine, α_2 -macroglobuline
	Facteurs inflammatoires, pro-athérogéniques, de réparation et protéines antimicrobiennes	P-sélectine, PSGL-1, thrombospondine, CD40L, chimiokines et cytokines (ex : PF4, β -TG, IL-8, IL-1 β , TGF- β , MCP-1, RANTES), TLT-1, ostéonectine, facteurs du complément (C3, C4, ...)
	Facteurs de croissance pro-angiogéniques	VEGF, PDGF, EGF, IGF, FGF, angiopoïétine
	Facteurs de croissance anti-angiogéniques	Angiostatine, endostatine, inhibiteurs de MMPs, TIMPs, LAMP-2
	Inducteur de MMPs	EMMPRIN (CD147)
	Ligand pour récepteur de surface	Sémaphorine 7A
Lysosome	Protéines membranaires	LAMP-2, LAMP-3
	Enzymes	Protéases, β -galactosidase, cathepsines, β -N-acetylhexosaminidase, phosphatases, ...

Tableau 1 : Contenu des granules alpha, denses et lysosomes plaquettaires. (adapté de (Mumford, Frelinger et al. 2015))

IV. Les différentes étapes de l'activation des plaquettes

A. Adhérence des plaquettes

1. Le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX

Lors d'une brèche vasculaire, la première interaction entre le sous-endothélium et les plaquettes se fait par l'intermédiaire du complexe glycoprotéique GPIb-V-IX plaquettaire et le facteur von Willebrand (vWF). Cette glycoprotéine et son rôle ont été découverts grâce à l'étude de patients souffrant d'une maladie de Bernard-Soulier caractérisée par un syndrome hémorragique. La première purification de GPIb a été réalisée en 1969. Le lien entre la maladie de Bernard-Soulier et l'absence de GPIb est établi au milieu des années 1970 (Grottum and Solum 1969, Nurden and Caen 1975).

Le facteur von Willebrand est une glycoprotéine multimérique présente dans le sous-endothélium et dans le plasma. Il est stocké dans les corps de Weibel-Palade (WPB) des cellules endothéliales et dans les granules alpha des plaquettes. Le vWF constitutivement sécrété par les cellules endothéliales à leur face basale se lie par ses domaines A1 et A3 aux collagènes de type I et III du sous-endothélium permettant une interaction indirecte du collagène avec le complexe GPIb-V-IX (Bonney, Romijn et al. 2006). Lorsque les cellules endothéliales sont soumises à un stress, le vWF est sécrété à la face apicale vers la lumière vasculaire. Sous l'effet des forces de cisaillement il acquiert une conformation permettant la liaison par son domaine AI à la sous-unité GPIb α des plaquettes.

A la surface des plaquettes, le complexe GPIb-V-IX est présent à une densité d'environ 25 000 copies. Chaque complexe compte deux sous-unités GPIb α (135 kDa), deux sous-unités GPIb β (26 kDa), deux sous-unités GPIX (20 kDa) et une sous-unité GPV (82 kDa) (**Figure 7**). Chaque sous-unité de ce complexe appartient à la superfamille des *leucine-rich repeat proteins* (LRR), un motif essentiel à leur fonction (Broos, De Meyer et al. 2012, Bryckaert, Rosa et al. 2015).

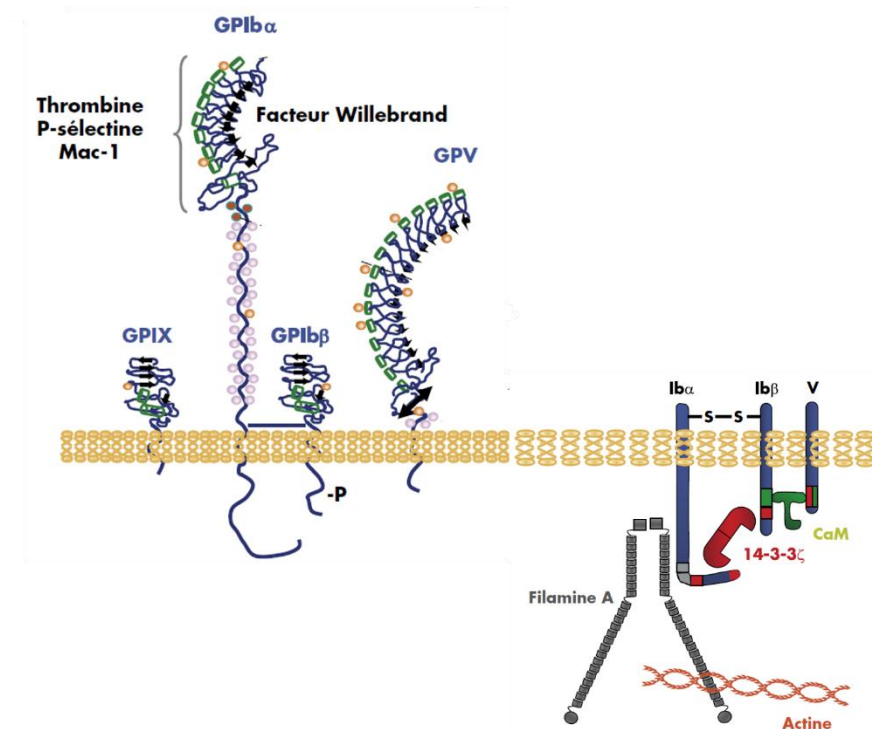


Figure 7 : Représentation du complexe GPIIb-V-IX. Ce complexe se compose de deux sous-unités GPIIb α , GPIIb β , GPIIX et d'une sous-unité GPV. Il est ancré au cytosquelette d'actine par la filamine A et est associé à la protéine 14-3-3 ζ et à la calmoduline (CaM). Ce complexe peut interagir avec de nombreux ligands (facteur von Willebrand, thrombine, P-sélectine, Mac-1) dont les sites de liaison à GPIIb α sont indiqués sur le schéma (adapté de (Lanza 2008)).

Cette première interaction entre les plaquettes et le sous-endothélium se fait à des taux de cisaillement élevés. Elle est rapide et réversible permettant le roulement des plaquettes (*rolling*) et leur ralentissement avant une adhésion stable. La liaison du complexe GPIIb-V-IX à son ligand déclenche une signalisation intra-plaquettaire complexe (**Figure 8**) mettant en jeu de nombreux effecteurs dont la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), les kinases à tyrosine Src et Lyn et la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2). Ces voies aboutissent à la sécrétion des granules plaquettaires, à la synthèse de thromboxane A2 et à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ notamment par le recrutement de la taline via la GTPase Rap1 (Bryckaert, Rosa et al. 2015).

Il est intéressant de remarquer que les kinases de la famille Src (SFK), Src et Lyn, sont associées au complexe GPIIb-V-IX. Elles contribuent à l'activation des récepteurs à ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) par une signalisation *inside-out* (Senis, Mazharian et al. 2014).

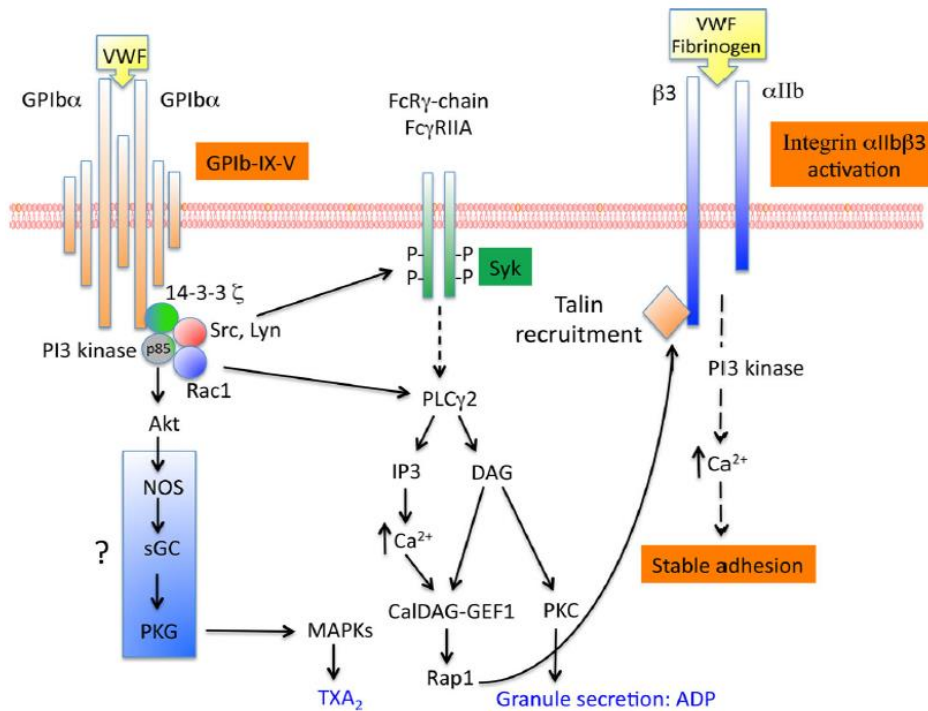


Figure 8 : Signalisation plaquettaire en aval du complexe GPIIb-V-IX. La liaison du facteur von Willebrand au complexe GPIIb-V-IX conduit à l'activation de différentes voies de signalisation qui conduisent à la sécrétion des granules plaquettaires et à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ par une signalisation inside-out. Les SFK sont également recrutées et contribuent à l'activation des récepteurs à ITAM par une signalisation inside-out. La voie mettant en jeu la NOS (Nitric oxide synthase) et la PKG reste controversée (Bryckaert, Rosa et al. 2015).

Les principaux facteurs régulant la liaison vWF-GPIIb sont les forces de cisaillement et l'activité de la métalloprotéase ADAMTS13 (*A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13*). ADAMTS13 est une protéase (200 kDa) présente dans la circulation générale sous forme active qui clive spécifiquement les multimères de très haut poids de vWF sur des sites rendus accessibles en condition de cisaillement élevé, limitant ainsi son pouvoir adhésif (Veyradier and Coppo 2011). Le stress oxydatif peut à la fois modifier la conformation du facteur von Willebrand limitant son clivage par ADAMTS13 (Chen, Fu et al. 2010) et inhiber l'activité de ADAMTS13 (Wang, Chen et al. 2015). De plus, la partie extracellulaire de GPIIbα peut aussi être clivée par la métalloprotéase ADAM17 (*A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17*) libérant un fragment nommé glycocalicine.

GPIIbα a de nombreux autres partenaires que le facteur von Willebrand. Les plus importants sont indiqués dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2**).

Ligands de GPIb-V-IX	Fonction
Domaine A1 du vWF	Liaison des plaquettes au sous-endothélium ou à l'endothélium activé
Collagène	Liaison indirecte par les domaines A1 et A3 du vWF
Thrombine	Activation plaquettaire par les faibles doses de thrombine
Mac-1	Liaison des plaquettes aux leucocytes
P-sélectine	Liaison des plaquettes à l'endothélium activé ou aux leucocytes
Thrombospondine	Liaison au sous-endothélium des petits vaisseaux en condition de haut <i>shear</i>

Tableau 2 : Les principaux ligands du complexe GPIb-V-IX et leurs fonctions. (adapté de (Clemetson 2007)).

Trois polymorphismes de GPIb α ont été décrits. Le premier polymorphisme appelé VNTR (*Variable number of tandem repeat*) est localisé dans le domaine extracellulaire de GPIb α , dans sa partie O-glycosylée (macro-glycopeptide). Quatre variants ont été décrits selon le nombre de répétition en tandem d'une séquence de treize acides aminés entre la sérine 399 et la thréonine 411 : VNTR-A (quatre répétitions), VNTR-B (trois répétitions), VNTR-C (deux répétitions), VNTR-D (une répétition) (Moroi, Jung et al. 1984, Lopez, Ludwig et al. 1992, Ishida, Furihata et al. 1995). Un cinquième variant très rare VNTR-E ne comportant pas cette séquence de treize acides aminés a aussi été rapporté (Muckian, Hillmann et al. 2000). Ce polymorphisme modifie la distance entre le site de liaison de GPIb α et la membrane plaquettaire ; les variants les plus longs pourraient être plus sensibles aux forces de cisaillement, favorisant la liaison de GPIb α avec le facteur von Willebrand (Moroi, Jung et al. 1984).

Un second polymorphisme HPA-2 (*Human platelet antigen-2*) a été décrit dans la partie N-terminale du domaine extracellulaire de GPIb α avec l'expression d'un résidu thréonine (HPA-2a) ou d'un résidu méthionine (HPA-2b) en position 145 au sein des motifs LRR. HPA-2 constitue un antigène plaquettaire susceptible de déclencher la synthèse d'allo-anticorps impliqués par exemple dans le purpura post-transfusionnel ou l'allo-immunisation antiplaquettaire fœto-maternelle (Kuijpers, Faber et al. 1992, Kuijpers, Ouwehand et al. 1992). Ce polymorphisme modifie la conformation de la région N-terminale et le variant HPA-2a a une meilleure affinité de liaison pour le facteur von Willebrand que le variant HPA-2b. Aucune différence d'affinité de liaison pour la thrombine entre les deux variants n'a été mise

en évidence (Ulrichs, Vanhoorelbeke et al. 2003). Des HPA ont aussi été identifiés sur GPIIb β (Curtis and McFarland 2014).

Dans la séquence Kozak non codante de GPIIb α (une séquence consensus dans le promoteur des gènes contrôlant l'efficacité de la traduction), un dimorphisme T/C a été décrit à la position -5. Le variant -5C est associé à une meilleure efficacité de traduction de la protéine et à une augmentation de l'expression de GPIIb α à la membrane (Afshar-Kharghan, Li et al. 1999). Ce polymorphisme serait associé à une augmentation des risques cardiovasculaires (Baker, Eikelboom et al. 2001).

La fréquence de ces trois polymorphismes est variable selon les populations étudiées (Simsek, Bleeker et al. 1994, Corral, Gonzalez-Conejero et al. 1998, Aramaki and Reiner 1999, Ozelo, Costa et al. 2004). De plus, un déséquilibre de liaison entre les polymorphismes VNTR et HPA-2 a été observé (Simsek, Bleeker et al. 1994).

La GPIIb α humaine est composée de 626 résidus tandis que la forme murine compte 734 résidus. Cette différence de 108 acides aminés chez la souris se traduit par un domaine extracellulaire plus long comparé à l'humain. Les domaines transmembranaire et intra-cytoplasmique humain et murin partagent 95% d'identité. La région N-terminale humaine, contenant le site de liaison au facteur von Willebrand et à la thrombine, partage 75% de similarité avec la séquence murine homologue. Les séquences riches en leucine (LRR) sont conservées entre les deux espèces. Des différences significatives entre humain et souris sont observées au niveau du site de liaison de GPIIb α au vWF, avec notamment l'absence de plusieurs résidus chargés négativement et de tyrosines chez la souris comparée à l'humain. Ces différences expliqueraient la spécificité de liaison intra-espèce observée entre GPIIb et ses ligands (Ware, Russell et al. 1997, Fujita, Hashimoto et al. 1998, Uff, Clemetson et al. 2002).

2. L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ et la glycoprotéine VI

L'interaction GPIIb-vWF outre le ralentissement des plaquettes, déclenche une signalisation *inside-out* peu intense mais qui contribue à une interaction stable entre les plaquettes et le collagène du sous-endothélium. L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (ou GPIIb-IIIa) et la glycoprotéine (GP) VI sont deux récepteurs directs du collagène qui permettent une adhésion stable des plaquettes au collagène et d'autre part l'activation de voies de signalisation puissantes (Pugh, Simpson et al. 2010, Nuyttens, Thijs et al. 2011).

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est présente à 2 000 à 4 000 copies par plaquette (Nieuwenhuis, Akkerman et al. 1985, Broos, Feys et al. 2011). Il s'agit d'une intégrine à domaine I, ce qui lui confère une haute affinité pour le collagène et en particulier pour la séquence Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg. Cependant comme les autres intégrines sur les plaquettes au repos, $\alpha_2\beta_1$ est sous une conformation repliée et elle devient active grâce à une signalisation *inside-out*. Malgré son importance pour les réponses plaquettaires au collagène

in vitro, les études *in vivo* ne mettent pas en évidence un défaut majeur de l'hémostase en son absence (Nieswandt, Brakebusch et al. 2001).

Le récepteur majeur du collagène sur les plaquettes est la glycoprotéine VI, une protéine transmembranaire de type I de 58 kDa (**Figure 9**). Elle est exclusivement exprimée par la lignée mégacaryocytaire et est codée par le chromosome 19 chez l'Homme. Elle fait partie de la superfamille des immunoglobulines. Elle est associée de manière non covalente à la chaîne γ des récepteurs Fc (FcR γ) qui porte un motif ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) (Poole, Gibbins et al. 1997, Tsuji, Ezumi et al. 1997). Environ 4 000 copies de GPVI sont présentes à la surface des plaquettes. Son domaine extracellulaire se compose de deux boucles *immunoglobuline-like* de type C2, D1 et D2, orientées à 90° et impliquées dans la liaison du collagène. Sa structure cristallographique a été résolue en 2006 (Horii, Kahn et al. 2006). D1 lie le collagène tandis que D2 permet la dimérisation de GPVI, seule forme ayant une haute affinité pour le collagène (Miura, Takahashi et al. 2002, Jung, Tsuji et al. 2009, Loyau, Dumont et al. 2012). L'affinité de GPVI pour le collagène est faible sur les plaquettes au repos et augmentée par sa dimérisation induite par la liaison du complexe GPIb-V-IX au collagène via le facteur von Willebrand. *In vitro*, GPVI peut être activée par la convulxine, une toxine issue du venin de serpent (Jandrot-Perrus, Lagrue et al. 1997, Polgar, Clemetson et al. 1997).

La région juxta-membranaire de GPVI est un domaine de type mucine riche en sérine et thréonine O-glycosylée. Cette région est la cible de métalloprotéases, en particulier ADAM10 et ADAM17, pouvant libérer la partie extracellulaire appelée GPVI soluble (sGPVI) et quantifiable dans le plasma (Andrews, Karunakaran et al. 2007).

La région transmembranaire de GPVI (19 acides aminés) permet l'interaction non covalente par un pont ionique entre l'Arg272 de GPVI et l'Asp11 de la chaîne FcR γ .

La région intracellulaire (51 acides aminés) contient un domaine riche en acides aminés basiques permettant la liaison à la calmoduline qui protège la GPVI des protéases, et un domaine riche en proline (PRD) liant constitutivement les kinases à tyrosine de la famille Src : Lyn et Fyn (Suzuki-Inoue, Tulasne et al. 2002).

La voie de signalisation (**Figure 9**) débute par la phosphorylation du motif ITAM de la chaîne FcR γ par Lyn/Fyn et se poursuit par le recrutement et l'activation de la kinase à tyrosine Syk puis par l'assemblage d'un complexe composé de protéines adaptatrices (LAT, SLP-76, Gads) et des enzymes phosphatidylinositol-3-kinases α et β (PI3K), des kinases à tyrosine de la famille Bruton (Btk) et de la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2). La voie de signalisation aboutit à l'activation de la protéine kinase C (PKC) suite à la formation de diacylglycérol (DAG), et à la mobilisation des réserves intracellulaires de calcium par le phosphatidyl-inositol triphosphate (IP3). Des petites protéines G (Rac1), des GTPases (Rap1) sont également activées et contribuent à l'amplification de la réponse (Watson, Auger et al. 2005, Tomlinson, Calaminus et al. 2007).

Des polymorphismes de GPVI ont été identifiés. Deux allèles de la glycoprotéine VI avec des fréquences respectives de 0,85 et 0,13 sont principalement décrits (Joutsu-Korhonen, Smethurst et al. 2003). Ils diffèrent par cinq acides aminés : trois sont localisés dans la partie extracellulaire (Ser199Pro, Lys217Glu, Thr229Ala) et deux dans le domaine cytoplasmique (Gln297Leu and His302Asn). L'allèle le plus fréquent est ainsi nommé *SKTQH* tandis que le moins fréquent est appelé *PEALN*. L'allèle *PEALN* exprimé de façon homozygote est associé à une expression et une fonctionnalité réduites de GPVI.

La glycoprotéine VI humaine (hGPVI) et murine (mGPVI) diffèrent quelque peu. Les protéines murine et humaine partagent 64,4% d'identité pour leur séquence d'acides aminés et 67,3% d'identité pour leur séquence nucléotidique. Chez la souris, GPVI compte 313 acides aminés contre 339 chez l'humain avec un domaine intracellulaire plus court de 24 acides aminés que la hGPVI (Jandrot-Perrus, Busfield et al. 2000). De plus, les domaines extracellulaires de la mGPVI et de la hGPVI ne sont pas identiques avec en particulier des différences sur 3 résidus (59, 117 et 166). En conséquence, les deux espèces ont une affinité de liaison différente pour le CRP (*Collagen-related peptide*) et la plupart des anticorps bloquants dirigés contre hGPVI ne lient pas mGPVI (Lecut, Feeney et al. 2003, Smethurst, Joutsu-Korhonen et al. 2004).

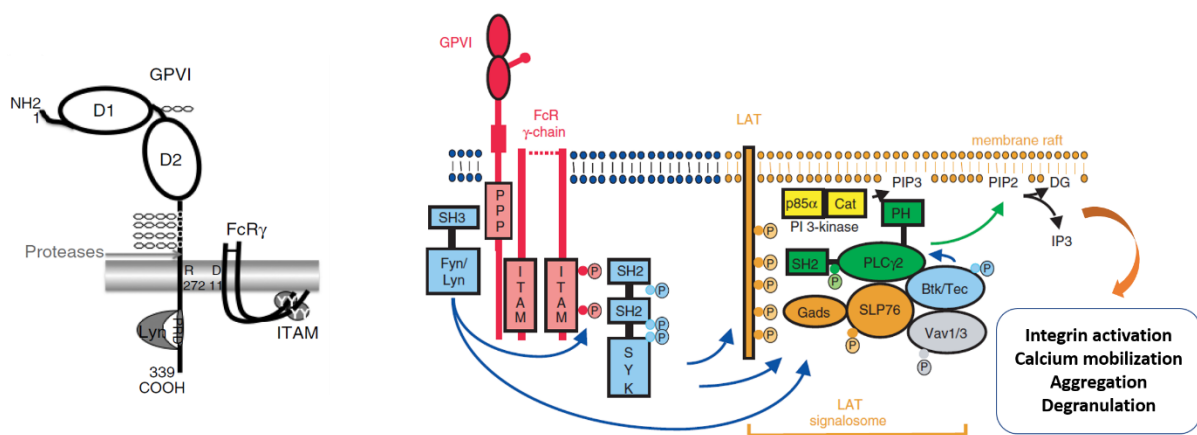


Figure 9 : La glycoprotéine VI et sa voie de signalisation. La glycoprotéine VI est liée de manière non covalente à la chaîne FcR γ contenant un motif ITAM. La dimérisation et l'activation de la glycoprotéine VI conduit au recrutement de kinases à tyrosine (Fyn, Lyn, Syk) puis à l'assemblage d'un complexe de signalisation. L'activation de GPVI aboutit à une mobilisation du calcium intraplaquettaire, à la sécrétion des granules, à l'activation des intégrines et à l'agrégation des plaquettes (adapté de (Watson, Auger et al. 2005, Dütting, Bender et al. 2012, Zahid, Mangin et al. 2012)).

Le collagène se lie ainsi aux plaquettes par trois récepteurs différents. Il est important de noter que chacune de ces interactions est optimale à des taux de cisaillement variables et aboutit à différents états d'activation. Elles se réalisent aux différentes étapes de la formation d'un thrombus et cette synergie permet une activation complète des plaquettes (Pugh, Simpson et al. 2010). Le type de collagène, caractérisé par ses motifs peptidiques et sa structure fibrillaire, associé aux fibrilles ou en réseau (Ricard-Blum 2011), détermine également l'affinité de liaison à chaque récepteur et son activation (Kehrel 1995). La liaison des collagènes de type I ou III à la glycoprotéine VI conduit à l'activation des plaquettes (Jung, Takemura et al. 2008). L'affinité de liaison des collagènes de type IV et V à la glycoprotéine VI ainsi que leur capacité à activer les plaquettes restent à élucider. En effet, la difficulté de purification de ces types de collagène donne lieu à des résultats différents selon les études (Jarvis, Atkinson et al. 2002, Jung, Takemura et al. 2008).

La glycoprotéine VI est un récepteur clé dans l'activation des plaquettes, la signalisation *outside-in*, la sécrétion des facteurs solubles et l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (ou GPIIb/IIIa). Cependant, son engagement dans l'hémostase primaire et la thrombose diverge.

Dans un vaisseau sain, la glycoprotéine VI n'est pas indispensable à la prévention des saignements puisque les patients avec un déficit inné ou acquis de GPVI ne saignent que modérément (Arthur, Dunkley et al. 2007). Des saignements plus importants sont généralement associés à d'autres défauts plaquettaires ou hématologiques.

Au contraire, dans un vaisseau lésé comme à la suite de la rupture de la plaque dans l'athérosclérose, la glycoprotéine VI joue un rôle majeur dans la formation du thrombus (Jiang and Jandrot-Perrus 2014). L'absence de GPVI, soit par déplétion (Nieswandt, Schulte et al. 2001) soit par transgénèse (Bender, Hagedorn et al. 2011), a montré un effet protecteur dans plusieurs modèles de thrombose (thromboembolisme, lésion mécanique, lésion au chlorure de fer ou laser) (Jiang and Jandrot-Perrus 2014). Récemment, la fibrine polymérisée a été décrite comme un autre ligand de la glycoprotéine VI (Alshehri, Hughes et al. 2015, Mammadova-Bach, Ollivier et al. 2015) avec pour conséquence une amplification de la génération de thrombine et un recrutement au thrombus des plaquettes circulantes menant à la croissance et à la stabilisation du thrombus.

Cet effet protecteur vis-à-vis de la thrombose est encore plus important lorsque l'absence de GPVI est associée à celle du récepteur CLEC-2 (*C-type lectin-like receptor 2*) de la famille des hémi-ITAM comme montré chez la souris (Bender, May et al. 2013). Cette protection se double néanmoins d'un défaut d'hémostase, évalué dans cette étude par un temps de saignement global à la queue. Cette double déplétion montre des fonctions redondantes des deux récepteurs en même temps qu'un effet sur la structure et le compte plaquettaire.

3. Les autres récepteurs d'adhésion

D'autres récepteurs d'adhésion sont présents à la surface des plaquettes. Parmi eux les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$ qui sont respectivement les récepteurs de la vitronectine, de la fibronectine et de la laminine (Sonnenberg, Modderman et al. 1988, Nieswandt, Varga-Szabo et al. 2009). La thrombospondine peut aussi se lier au CD36 des plaquettes. Leurs fonctions dans l'activation plaquettaire ne sont pas encore clairement identifiées. Cependant, ces récepteurs plaquettaires aux protéines matricielles de la membrane basale des vaisseaux pourraient contribuer à la réponse des plaquettes (Gruner, Prostedna et al. 2003) selon le lit vasculaire, le type et la sévérité de la blessure. L'intégrine $\alpha_6\beta_1$ permet ainsi l'adhésion des plaquettes à la laminine et, en synergie avec la glycoprotéine VI, elle conduit à l'étalement des plaquettes par la formation de lamellipodes et de filopodes (Inoue, Suzuki-Inoue et al. 2006). De plus, chez des souris présentant un déficit en $\alpha_6\beta_1$ le thrombus est de taille réduite dans des modèles de thrombose par lésion mécanique ou laser. L'hémostase primaire n'est cependant pas affectée par l'absence de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ (Schaff, Tang et al. 2013).

B. Activation des plaquettes

Cette première phase d'adhésion instable puis stable des plaquettes au sous-endothélium déclenche ainsi plusieurs voies de signalisation qui mènent à l'activation des plaquettes : les plaquettes changent de forme, sécrètent les facteurs solubles contenus dans leurs granules et deviennent pro-coagulantes par exposition des phospholipides anioniques (comme la phosphatidylsérine) sur le feuillet externe de la membrane plasmique.

1. Sécrétion des facteurs solubles plaquettaires

Les modalités de régulation du contenu des granules plaquettaires et de leur sécrétion ne sont pas encore bien connues. Un modèle moléculaire basé sur la formation de complexes SNAREs (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptors*) est néanmoins proposé (Ren, Ye et al. 2008, Heijnen and van der Sluijs 2015).

La formation de complexes entre les v-SNAREs (*vesicular-SNAREs*) des granules et les t-SNAREs (*target-SNAREs*) de la membrane plasmique permettrait la fusion des membranes et l'exocytose du contenu granulaire dans le milieu extérieur. Les plaquettes expriment les v-SNAREs : VAMP-2, VAMP-3, VAMP-7, VAMP-8 (*Vesicular associated membrane protein*) et les t-SNAREs : syntaxine-2, syntaxine-4, syntaxine-7, syntaxine-11, SNAP-23 et SNAP-29.

Ainsi, après activation des plaquettes, les granules s'accrocheraient (*tethering*) à la membrane plasmique au niveau de zone enrichie en PI(4,5)P2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). Ce contact avec la

membrane serait permis par l'activation et l'association de la GTPase rab27a avec Munc 13-4 et SLP4 (*Synaptogamin-like protein 4*). Cette première interaction rapprocherait les granules de la membrane plasmique en permettant aux v-SNAREs et t-SNAREs de former des complexes (*docking*). Ces associations impliquant notamment VAMP-8, SNAP-23, et la syntaxine-11 (stabilisée par Munc 18-2) mèneraient à la fusion des membranes et à la sécrétion du contenu granulaire (**Figure 10**).

Un modèle murin *Unc13d* (*Jinx*) caractérisé par une absence de la protéine Munc 13-4 présente un défaut de sécrétion total des granules denses et un défaut de sécrétion partiel des granules alpha et des lysosomes (Ren, Wimmer et al. 2010).

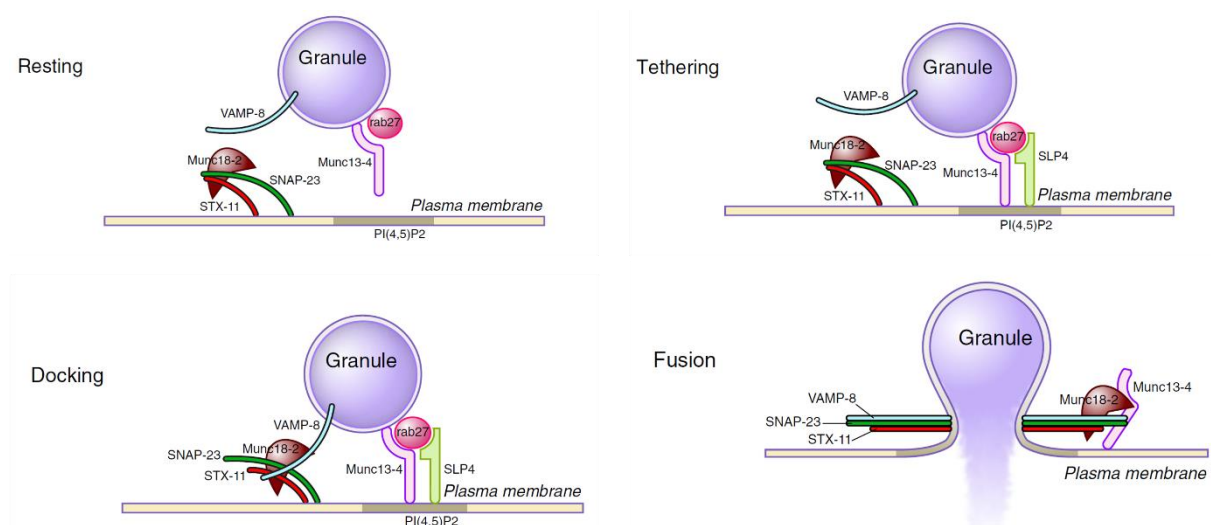


Figure 10 : Modèle moléculaire de la sécrétion des granules plaquettaire. La sécrétion des granules serait permise par la formation de complexe SNARE (*docking*) et la fusion des membranes plasmiques et granulaires (*fusion*) à la suite d'une étape d'adhésion (*tethering*) (Heijnen and van der Sluijs 2015).

Des études récentes montrent que le contenu des granules alpha est hétérogène et suggèrent que leur sécrétion pourrait être sélective selon l'agoniste et la voie de signalisation mis en jeu (Sehgal and Storrie 2007, Italiano and Battinelli 2009, Chatterjee, Huang et al. 2011).

L'hétérogénéité des granules alpha pourrait être consécutive à la différence d'origine des protéines contenues (Sehgal and Storrie 2007) ; une protéine synthétisée par les mégacaryocytes ne se trouverait pas dans le même granule qu'une protéine d'origine plasmatique. La spécialisation fonctionnelle des granules reste controversée (Italiano, Richardson et al. 2008, Jonnalagadda, Izu et al. 2012).

Alors que la répartition spatiale des granules dans les plaquettes et celle des protéines dans les granules alpha seraient aléatoires et indépendantes de leur fonction (Kamykowski, Carlton et al. 2011), l'exocytose des granules serait un processus régulé (Chatterjee, Huang et al. 2011, Jonnalagadda, Izu et al. 2012). Des auteurs ont émis l'hypothèse que cette sécrétion pourrait être déterminée par les propriétés physico-chimiques des facteurs (leur solubilité par exemple), la forme des granules ou leur mode de

sécrétion (Jonnalagadda, Izu et al. 2012). Un processus incomplet d'exocytose pourrait également expliquer la sécrétion de certains facteurs comparée à d'autres alors qu'ils sont contenus dans les mêmes granules (Kamykowski, Carlton et al. 2011).

Récemment, une étude a montré que deux modes de sécrétion des granules alpha et denses étaient mis en œuvre par les plaquettes selon le type de blessure, l'intensité et la durée de la stimulation. Ainsi, les granules alpha et denses peuvent être sécrétés de manière simple après fusion de leur membrane avec la membrane plasmique. Cependant, les granules alpha peuvent, en cas de forte stimulation des plaquettes, fusionner entre eux avant d'être exocytés (Eckly, Rinckel et al. 2016).

2. Voies d'activation et d'amplification

Certains facteurs solubles sécrétés ont des récepteurs à la surface des plaquettes et leur libération permet d'amplifier l'activation initiale des plaquettes. Cette amplification se fait principalement par la voie des récepteurs couplés aux protéines Gi, Gq ou G_{12/13} (RCPG) (Versteeg, Heemskerk et al. 2013). Gi induit indirectement l'activation des plaquettes via l'inhibition de la formation d'AMPc par l'adénylate cyclase (AC) et l'inhibition de l'activité de la PKA. La voie Gi est aussi couplée à l'activation de la PI3K. La protéine Gq conduit à l'activation de la PLC β , puis de la PKC et à la mobilisation du calcium intracellulaire. G_{12/13} conduit à la phosphorylation de la myosine via la kinase ROCK (*RhoA kinase*). C'est ainsi que :

-l'adénosine diphosphate (ADP) contribue à l'activation des plaquettes et à l'amplification de cette activation. Sur les plaquettes, deux récepteurs à l'ADP de type RCPG sont exprimés : P2Y1 et P2Y12. P2Y1, couplé à Gq, permet le déclenchement de l'activation tandis que la voie activée par P2Y12, couplé à Gi, permet de maintenir cette activation initiale (Eckly, Gendrault et al. 2001, Soulet, Hechler et al. 2005, Hechler and Gachet 2011).

-le thromboxane A₂ (TxA₂) se lie à son récepteur TP qui est couplé à une protéine Gq.

-la sérotonine active son récepteur 5HT-2A couplé à une protéine Gq.

Les récepteurs de la thrombine, les *proteinase-activated receptors* (PAR) 1 et 4 chez l'humain, sont couplés à la fois à Gq et à G_{12/13}. La souris diffère de l'homme par l'absence de PAR1 et la présence de PAR3 dont la fonction est différente (**Figure 11**). Chez l'Homme, la thrombine qui est une protéase à sérine clive l'extrémité N-terminale du domaine extracellulaire du récepteur PAR1. Ce clivage démasque une nouvelle extrémité N-terminale qui se lie au récepteur et l'active. PAR1 est le principal récepteur à la thrombine chez l'Homme. Sa seule activation est suffisante pour activer les plaquettes. PAR4 n'est activé que par de forte dose de thrombine mais a un rôle de maintien et de renforcement de l'activation plaquettaire.

Chez la souris, PAR3 agit comme un co-facteur de PAR4. En se liant à la thrombine PAR3 permet l'activation de PAR4, qui est le seul des deux récepteurs capable de déclencher une signalisation intra-plaquettaire (De Candia 2012).

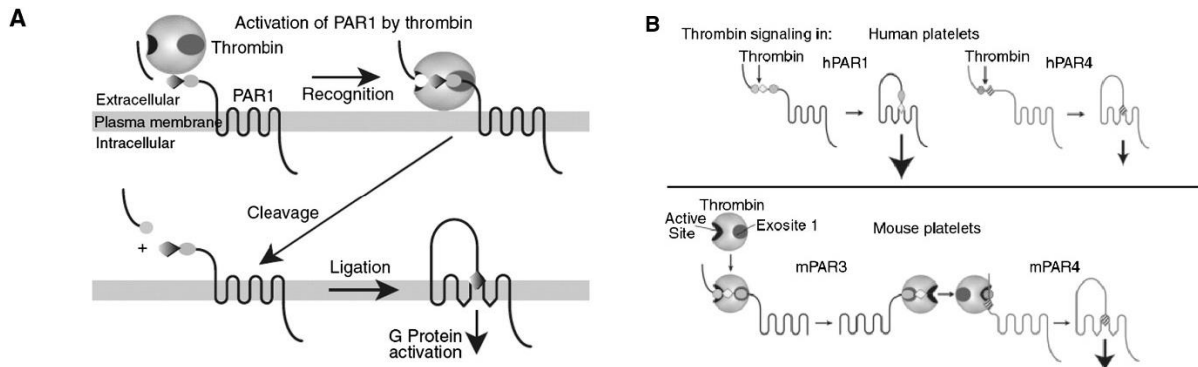


Figure 11 : Les récepteurs PARs chez l'humain et la souris. A. Le clivage de l'extrémité N-terminale de PAR1 par la thrombine permet son activation. B. Les récepteurs PARs humains et murins sont activés par des mécanismes différents. Chez la souris, la liaison de la thrombine à PAR3 permet l'activation de PAR4 qui est le seul récepteur capable de transduire un signal d'activation (De Candia 2012).

C. Agrégation des plaquettes

Les étapes d'adhésion puis d'activation des plaquettes aboutissent à leur agrégation (**Figure 12**). Celle-ci se définit par l'association des plaquettes entre elles par l'intermédiaire de la liaison du fibrinogène à faible taux de cisaillement ou du facteur von Willebrand à haut taux de cisaillement à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, qui est le récepteur clé de cette étape d'agrégation, est le récepteur dont la densité est la plus élevée à la surface des plaquettes ; environ 80 000 copies par cellules, sans compter celles qui peuvent être mobilisées lors de l'activation plaquettaire. Cette intégrine reconnaît le motif RGD (arginine-glycine-acide aspartique). En conséquence les protéines exprimant ce motif, le fibrinogène, la fibrine, le facteur von Willebrand, la vitronectine, la fibronectine, la thrombospondine ou le CD40L peuvent se lier à $\alpha_{IIb}\beta_3$. La liaison de ces ligands peut parfois impliquer une autre séquence qui agit en synergie avec RGD comme le dodécapeptide de l'extrémité de la chaîne γ du fibrinogène (Kasirer-Friede, Kahn et al. 2007).

Les intégrines sont des complexes non covalents hétérodimériques composés d'une chaîne α et d'une chaîne β , toutes deux transmembranaires. Ces chaînes ont une longue partie extracellulaire et une courte queue cytoplasmique (Versteeg, Heemskerk et al. 2013). Pour être fonctionnelles, les intégrines doivent être préalablement activées pour se trouver dans une conformation dite « active », de forte affinité pour leur ligand. Dans les plaquettes, l'activation de $\alpha_{IIb}\beta_3$ résulte majoritairement de la voie de

signalisation intracellulaire *inside-out*, qui est déclenchée par la plupart des agonistes plaquettaires que sont l'ADP, le thromboxane A2, la thrombine, le collagène, la podoplanine ou l'adrénaline. Ces principaux effecteurs sont la protéine kinase C (Harper and Poole 2010) et le facteur d'échange de nucléotide guanine CalDAG-GEF1 (Stefanini and Bergmeier 2010) sensible au calcium activant Rap1 (*Ras-related protein 1*). De plus, l'activation du récepteur P2Y12 par l'ADP conduit à l'inhibition de RASA3 (*Ras GTPase-activating protein 3*), une protéine régulant négativement l'activité de Rap1 (Stefanini, Paul et al. 2015). Cependant, cette activation peut être réversible selon le degré de stimulation, comme avec de faible concentration d'ADP. De manière réciproque, une signalisation extracellulaire dite *outside-in* est déclenchée par la liaison de l'intégrine à son ligand. Cette voie de signalisation comprend des protéines adaptatrices, des protéines du cytosquelette, des kinases et des phosphatases. Les kinases à tyrosines Src et Syk sont particulièrement impliquées dans la transduction du signal couplé à $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Watson, Auger et al. 2005). L'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ permet l'étalement des plaquettes sur le fibrinogène ainsi que la rétraction du caillot après sa formation. L'étude de la thrombasthénie de Glanzmann, qui se caractérise par une absence congénitale de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et des saignements sévères, montre que $\alpha_{IIb}\beta_3$ est cruciale dans le processus hémostatique. Des polymorphismes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, appartenant notamment au système HPA, ont été décrits (Curtis and McFarland 2014).

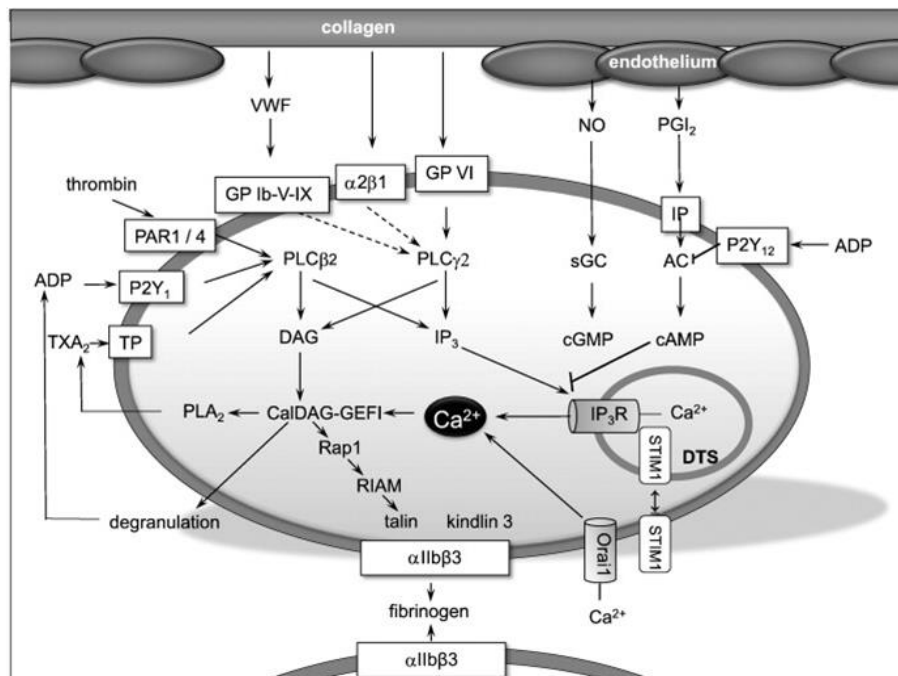


Figure 12 : Les principales voies d'activation des plaquettes sanguines. (Broos, De Meyer et al. 2012).

V. Les récepteurs plaquettaire à motif ITAM

Les récepteurs dits ITAMs (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) sont des récepteurs dont l'activation repose sur la présence dans le domaine cytoplasmique d'un motif ITAM dont la séquence est YxxL/Ixxxxxx(xx)YxxL/I (Reth 1989, Gibbins, Asselin et al. 1996). Les plaquettes humaines expriment trois récepteurs à motif ITAM (**Figure 13**) :

- la glycoprotéine VI, décrite précédemment.
- le récepteur CLEC-2 (*C-type lectin-like receptor 2*).
- le récepteur de faible affinité aux immunoglobulines G FcγRIIA. Ce récepteur n'est pas exprimé chez la souris.

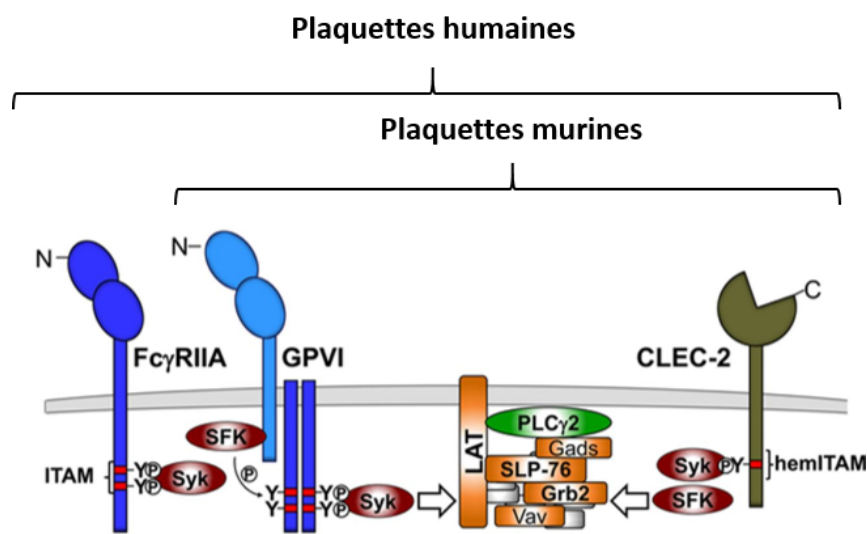


Figure 13 : Les récepteurs portant un motif ITAM sur les plaquettes humaines et murines. La glycoprotéine VI est dépendante de sa liaison non covalente avec la chaîne FcγR qui contient l'ITAM. FcγRIIA, qui n'est exprimé que chez les primates et l'humain, porte lui-même son motif ITAM. CLEC-2 contient un demi motif ITAM (hemi-ITAM). Tous ces récepteurs déclenchent une signalisation dépendante de kinases à tyrosine (adapté de (Stegner, Haining et al. 2014)).

A. C-type lectin-like receptor 2

1. Structure

CLEC-2 est un récepteur hémé-ITAM avec un seul motif YxxL/I (**Figure 13**) appartenant à la famille des protéines transmembranaires de type II (Watson, Herbert et al. 2010) exprimé à la surface des plaquettes avec environ 2 000 copies par plaquettes chez l'Homme (Suzuki-Inoue, Fuller et al. 2006,

Suzuki-Inoue, Inoue et al. 2011, Ozaki, Suzuki-Inoue et al. 2013, Gitz, Pollitt et al. 2014). Son expression sur les leucocytes est encore débattue (Lowe, Navarro-Nunez et al. 2015). Son principal ligand est la podoplanine qui est une glycoprotéine exprimée par les vaisseaux lymphatiques, certaines cellules cancéreuses (Suzuki-Inoue, Kato et al. 2007), les macrophages et les lymphocytes Th17 en situation inflammatoire (Hou, Bystrom et al. 2010, Peters, Pitcher et al. 2011, Astarita, Acton et al. 2012, Hitchcock, Cook et al. 2015). *In vitro*, CLEC-2 peut être activé par la rhodocytine, une toxine contenue dans le venin de serpent (Suzuki-Inoue, Fuller et al. 2006). La stimulation de CLEC-2 conduit à l'activation des plaquettes (Versteeg, Heemskerk et al. 2013). Les voies de signalisation sont similaires à celles mises en jeu par la stimulation de GPVI même si des différences existent (Spalton, Mori et al. 2009).

Chez les souris présentant un déficit en CLEC-2 exclusivement dans la lignée mégacaryocytaire (générées par la technologie *Cre-Lox* : *Clec2^{fl/fl}PF4Cre+*), une diminution de 30% du compte plaquettaire est observée. Néanmoins, le temps de saignement et de formation d'un thrombus induit par une lésion par le chlorure de fer ne sont pas augmentés (Bender, May et al. 2013). CLEC-2 ne serait donc requis ni dans l'hémostase ni dans la thrombose artérielle. Cependant dans un modèle murin de thrombose veineuse profonde (DVT) provoquée par une sténose de la veine cave inférieure, une étude récente a montré que l'interaction de CLEC-2 avec la podoplanine favoriserait la formation du thrombus (Payne, Ponomaryov et al. 2017).

CLEC-2 aurait aussi d'autres fonctions. En effet, CLEC-2 est fortement exprimé sur les mégacaryocytes de la niche hématopoïétique et contribuerait à son homéostasie (Nakamura-Ishizu, Takubo et al. 2014, Nakamura-Ishizu, Takubo et al. 2015). L'interaction de CLEC-2 avec son ligand la podoplanine favoriserait également la maturation des mégacaryocytes et la formation de pro-plaquettes (Tamura, Suzuki-Inoue et al. 2016).

2. Rôle dans la formation des vaisseaux lymphatiques

CLEC-2 est aussi essentiel dans le développement et le maintien de l'intégrité du système lymphatique. En effet, la délétion complète de *Clec2* (ou *Clec1b*) chez la souris induit des œdèmes pulmonaires, des ascites chyleuses au niveau du péritoine, des hémorragies cérébrales et est létale au stade embryonnaire (Suzuki-Inoue, Inoue et al. 2010). L'absence de podoplanine conduit au même phénotype (Finney, Schweighoffer et al. 2012).

De manière intéressante, la délétion spécifique de CLEC-2 au niveau de la lignée mégacaryocytaire est viable et se caractérise par une interconnexion des vaisseaux lymphatiques et sanguins (*blood-filled lymphatics*) (**Figure 14**). Ainsi, l'expression de CLEC-2 sur les plaquettes assure le bon développement et l'intégrité du réseau lymphatique et de ses ganglions (Bertozzi, Schmaier et al. 2010, Navarro-Nunez, Langan et al. 2013, Benezech, Nayar et al. 2014, Hess, Rawnsley et al. 2014).

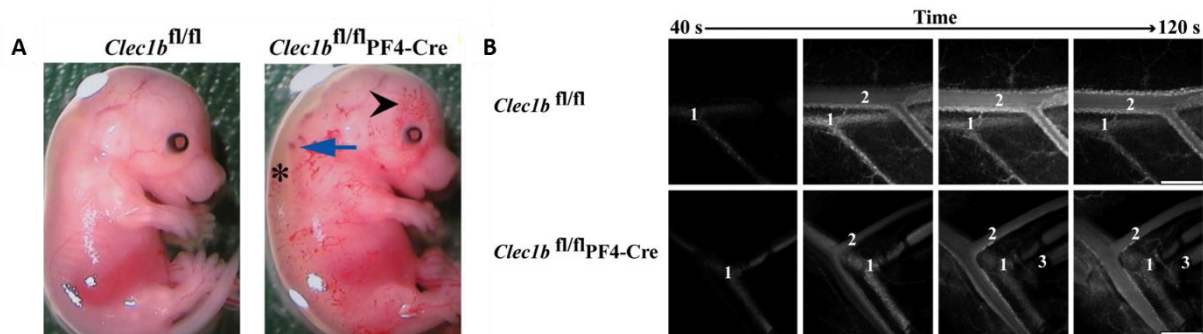


Figure 14 : L'expression de CLEC-2 sur la lignée mégacaryocytaire est essentielle au développement et au maintien de l'intégrité des vaisseaux lymphatiques A. En absence de CLEC-2 sur les plaquettes (*Clec1b^{fl/fl} PF4-Cre*), les embryons présentent des œdèmes (astérix), des hémorragies (flèche bleue) et leurs vaisseaux lymphatiques sont remplis d'éléments sanguins « blood-filled lymphatics » (flèche noire). B. Interconnexion des vaisseaux sanguins (1 et 2) et lymphatiques (3) observée après injection de dextran-FITC dans la circulation mésentérique de souris *Clec1b^{fl/fl} PF4-Cre* comparées à des souris contrôles (adapté de (Finney, Schweighoffer et al. 2012)).

B. FcγRIIA

FcγRIIA (CD32a) est un récepteur de faible affinité pour les immunoglobulines G (IgG) de 40 kDa, exprimé principalement sur les cellules du système immunitaire (**Figure 13**). Ce récepteur est le seul récepteur aux IgG exprimé sur les plaquettes et il n'est pas présent dans l'espèce murine. On compte entre 900 et 5 000 copies par plaquette (Arman and Krauel 2015). Il appartient à la famille des glycoprotéines transmembranaires de type I. Il se compose de deux domaines extracellulaires *Ig-like* D1 et D2 et d'un domaine intracellulaire portant un motif ITAM original car les deux séquences YXXL sont séparées par douze acides aminés au lieu de six ou huit (Arman and Krauel 2015). Le domaine D2 lie le fragment constant Fc des immunoglobulines G (IgG). Deux formes alléliques sont décrites avec un polymorphisme en position 131 remplaçant l'arginine (FcγRIIA-R131) par une histidine (FcγRIIA-H131). L'affinité de liaison de FcγRIIA-H131 pour les IgG2 et les IgG3 est plus forte que celle de FcγRIIA-R131. FcγRIIA est notamment activé par des auto-anticorps dirigés contre le complexe héparine-PF4 lors des thrombopénies induites par l'héparine (TIH). Les IgGs agrégées, les anticorps anti-plaquettes, les IgG opsonisées sur des pathogènes ou les complexes immuns sont aussi des ligands de ce récepteur. Ainsi, FcγRIIA n'a pas un rôle direct dans l'hémostase mais peut contribuer à l'activation des plaquettes dans un contexte immunitaire. L'activation de FcγRIIA, entraînant sa dimérisation, conduit à une signalisation comparable à celle de la glycoprotéine VI dépendante des kinases à tyrosine et activant la phospholipase Cγ2 (PLCγ2). Cette signalisation aboutit à une élévation du calcium intra-cytoplasmique et à l'activation de la PKC, à la dégranulation et à l'agrégation des plaquettes (Versteeg, Heemskerk et al. 2013). En absence de stimulus spécifique, FcγRIIA amplifie les

réponses déjà initiées par l'activation d'autres récepteurs tels que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, et plus particulièrement dans les états infectieux.

Les activités de Fc γ RIIA et de GPVI partagent le fait que la voie ITAM active des ADAMs (ADAM 10 ou 17) conduisant au clivage de la partie extracellulaire de GPVI et/ou à la protéolyse du domaine intracellulaire de Fc γ RIIA par la calpaïne. Ces deux récepteurs ont donc la capacité de se neutraliser mutuellement (Qiao, Al-Tamimi et al. 2015).

C. Régulation des récepteurs à motif ITAM : les récepteurs à motif ITIM

Dans les plaquettes, comme dans les cellules du système immunitaire, l'activation des récepteurs à motif ITAM est contrebalancée par l'activation de récepteurs à motif ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) qui ont pour séquence S/I/V/LxYxxI/V/L (D'Ambrosio, Hippen et al. 1995, Daeron, Latour et al. 1995, Vivier and Daeron 1997, Jones, Barrett et al. 2012). Suite à l'activation de ces récepteurs, les motifs ITIM sont phosphorylés par la kinase à tyrosine Src et des phosphatases à tyrosine (PTP) telles que SHP-1 et SHP-2 sont recrutées. Ces phosphatases peuvent inactiver certains effecteurs de la voie de signalisation ITAM comme Syk, PLC γ , SLP-76 ou LAT (Barrow and Trowsdale 2006). Les plaquettes expriment plusieurs récepteurs à motif ITIM :

- PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1* ou CD31),
- CEACAM-1 (*Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule-1* ou CD66a),
- G6b-B,
- TLT-1 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells-like (TREM-like) transcript-1*),
- LILRB chez l'humain (*Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B*) ou son homologue chez la souris PIRB (*Paired immunoglobulin-like receptors B*).

PECAM-1 (Patil, Newman et al. 2001, Cicmil, Thomas et al. 2002, Falati, Patil et al. 2006), CEACAM-1 (Wong, Liu et al. 2009), G6b-B (Newland, Macaulay et al. 2007, Senis, Tomlinson et al. 2007) et LILRB/ PIRB (Fan, Shi et al. 2014) inhibent l'activation des plaquettes induite par le collagène et des agonistes de GPVI ou par la rhodocytine pour G6b-B (Mori, Pearce et al. 2008). De plus, CEACAM-1 (Yip, Alshahrani et al. 2016) et LILRB/ PIRB (Fan, Shi et al. 2014) régulent l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Du fait d'un motif ITIM ayant subi un épissage alternatif, TLT-1 (Barrow, Astoul et al. 2004, Washington, Schubert et al. 2004, Washington, Gibot et al. 2009) renforce l'activation des plaquettes.

Réactions inflammatoires, Neutrophiles et Vaisseaux

Le système immunitaire permet de protéger l'organisme de toute agression par du « non-soi », provoquée par un pathogène tel qu'une bactérie, un virus, un champignon, un parasite, ou d'une agression dite stérile comme une brûlure. La réponse immunitaire se déroule alors en plusieurs étapes et fait intervenir différents acteurs. Classiquement, on distingue la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative bien que les deux soient largement intriquées. Ce manuscrit est principalement focalisé sur la réponse innée en raison de la participation des plaquettes à celle-ci.

Les barrières cutanéomuqueuses constituent une première ligne de défense. Lorsqu'elles sont insuffisantes pour protéger l'organisme, une réaction inflammatoire se met en place. Celle-ci est complexe et mobilise plusieurs types cellulaires et de nombreux médiateurs selon une chronologie finement régulée. Cornelius Celsus a décrit pour la première fois les manifestations cliniques de la réaction inflammatoire au Ier siècle avant Jésus-Christ. Elle se caractérise par quatre signes cardinaux : rougeur, chaleur, douleur, œdème (« *rubor, tumor cum calore, dolor* »), et une altération des fonctions de l'organe affecté (**Figure 15**). Ces signes sont le reflet d'une dilatation vasculaire, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et d'un recrutement suivi d'une activation des cellules inflammatoires.

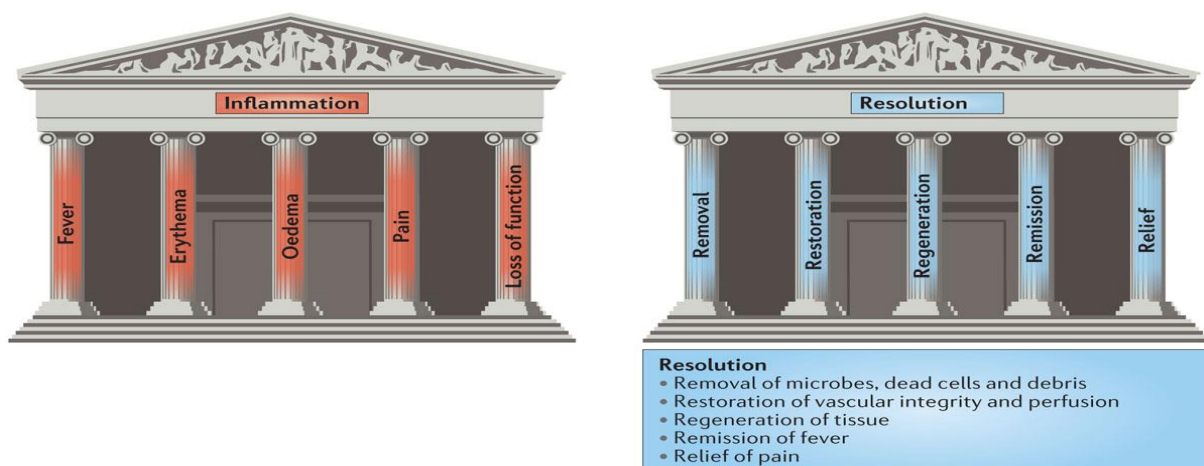


Figure 15 : Les signes cardinaux de l'inflammation et de sa résolution d'après Cornelius Celsus. (Basil and Levy 2016).

Ces premières observations ont été poursuivies par Augustus Waller (1846), Julius Cohnheim (1867), Rudolph Virchow (1858). Une des étapes majeures de la compréhension des réactions inflammatoires a été la découverte de la phagocytose par Elie Metchnikoff en 1892. Metchnikoff décrit les macrophages et les microphages, aujourd'hui dénommés neutrophiles polynucléaires. L'immunité humorale, et donc adaptative, est mise en évidence dans les travaux de Paul Ehrlich puis ceux de

Eùil von Behring et de Shibasaburo Kitasato en 1890. Le système du complément est découvert en 1896 par Jules Bordet.

La réaction inflammatoire est initialement une réponse de défense et de protection de l'organisme contre une agression exogène ou endogène. Cependant cette réponse doit être finement régulée et limitée dans le temps pour ne pas devenir chronique et aboutir à des dégâts tissulaires chez l'hôte. La phase de résolution de l'inflammation est ainsi une étape cruciale de ce processus (**Figure 16**).

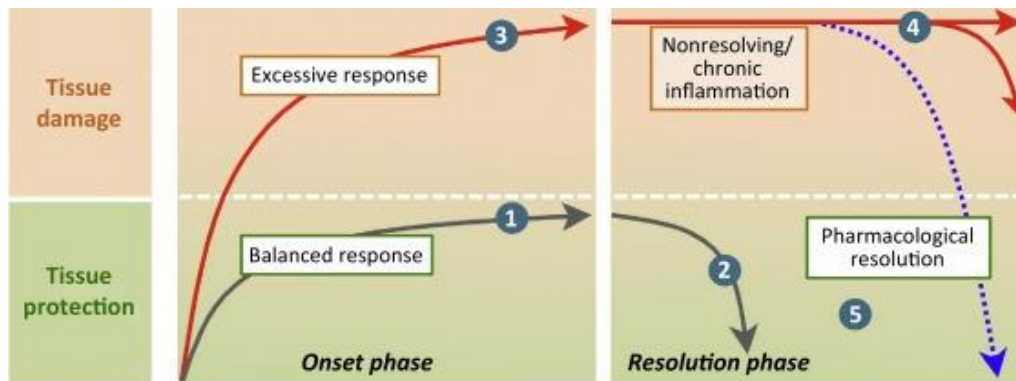


Figure 16 : La réaction inflammatoire doit être finement régulée. Cette réaction doit être limitée dans le temps et restreinte à l'organe ou tissu agressé. Dans le cas contraire, cette réaction devient chronique et expose l'hôte à des dégâts tissulaires (Perretti, Leroy et al. 2015).

Le terme d'inflammation est très imprécis et il est plus correct de parler des réactions inflammatoires. En effet celles-ci sont diverses selon leur localisation et leur origine (Nathan 2002). Cette hétérogénéité peut être illustrée par ces quelques exemples de pathologies : les réactions allergiques, l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, l'ischémie-reperfusion, la maladie de Crohn, les vascularites, les dermatites, les infections virales (par le virus de la grippe par exemple) ou bactériennes (*Helicobacter pylori*, ...), le sepsis ou la fibrose pulmonaire, ...

I. Vaisseaux et réactions inflammatoires

En 1628, William Harvey met fin aux théories énoncées 1500 ans plus tôt par Galien et Hippocrate qui décrivaient les artères et les veines comme deux systèmes indépendants ; les artères transportant l'air vital et les veines le sang formé dans le foie (Hwa and Aird 2007). Harvey démontre que le système sanguin est un système clos composé de veines et d'artères qui communiquent les unes avec les autres. Les capillaires qui permettent effectivement cette connexion sont observés par Malpighi en 1661 grâce au progrès de la microscopie. Le terme d'endothélium apparaît pour la première fois en 1865 avec Wilhelm His qui différencie ainsi la couche interne de la couche externe du vaisseau.

Au XIX^{ème} siècle, Rudolph Wagner a observé le *rolling* des leucocytes sur les parois vasculaires d'une veinule de grenouille dans l'épiderme (**Figure 17**). Il montre ainsi que dans une réaction inflammatoire, les leucocytes entrent en étroite interaction avec les vaisseaux (Wagner and Frenette 2008).

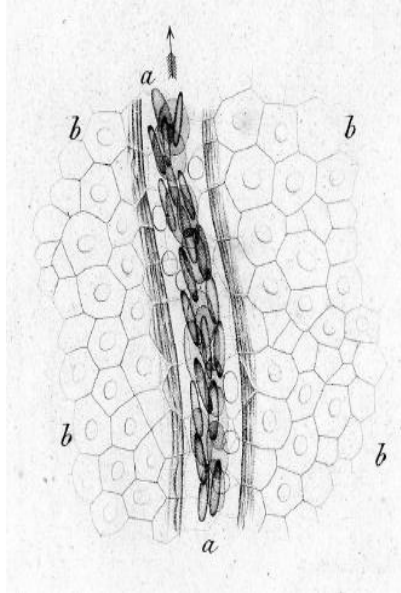


Figure 17 : Dessin d'observation de Rudolph Wagner en 1839 montrant l'interaction des leucocytes avec un vaisseau dans l'épiderme d'une grenouille. La veinule (a) est entourée par les cellules pavimenteuses de l'épiderme (b). Tandis que la majorité des cellules sanguines s'écoulent au centre du vaisseaux, les leucocytes, représentés par des cercles vides, ont une vitesse réduite et interagissent avec la paroi vasculaire (cité par (Wagner and Frenette 2008)).

La structure des cellules endothéliales est plus finement décrite grâce au microscope électronique dans les années 1950 et 1960. Les corps de Weibel-Palade (WPB) et les différents types de jonctions cellulaires sont alors mis en évidence (Aird 2007(a)). Les premières cultures de cellules endothéliales sont réalisées en 1973 par Jaffe *et al.* (Jaffe, Nachman et al. 1973, Nachman and Jaffe 2004) puis en 1974 par Gimbrone *et al.* (Gimbrone, Cotran et al. 1974) après isolation de cellules endothéliales à partir d'une veine ombilicale. Des auteurs ont estimé que les cellules endothéliales étaient au nombre de 12×10^{17} et représentaient 400 mètres carrés chez l'humain (Anggard 1990). La durée de vie moyenne d'une cellule endothéliale est de une année (Aird 2007(b)).

A. Hétérogénéité des vaisseaux

1. Endothélium

Dans un même organisme les cellules endothéliales ont des structures différentes selon les lits vasculaires auxquels elles appartiennent. Les artères et les veines ont chacune leurs spécificités (marqueurs moléculaires, forme et jonctions cellulaires) mais elles ont toutes deux un endothélium continu et non fenêtré. Les capillaires peuvent être discontinus comme dans les sinusoides hépatiques ou bien continus et fenêtrés comme dans les glomérules rénaux. Dans la peau, les muscles, les poumons ou le cerveau les capillaires sont continus et non fenêtrés.

Les organes lymphoïdes secondaires se caractérisent par la présence de cellules endothéliales particulières au niveau de leurs veinules post-capillaires : les HEVs (*High endothelial venules*) sont de forme cuboïde et leur membrane basale est plus épaisse que dans les autres veinules. Elles ont des fonctionnalités particulières dans le *trafficking*, le transport et la maturation des lymphocytes. Elles expriment un répertoire spécifique de chimiokines (CCL21, CXCL12, CXCL13 par exemple) et de molécules d'adhésion telles que des sialomucines fortement glycosylées et sulphatées (*Peripheral-node addressins* (PNADs)) (Miyasaka and Tanaka 2004, Aird 2007(a)).

Chez la myxine, un organisme modèle du groupe des chordés (vertébrés), l'analyse des cellules endothéliales de l'aorte, du cœur, du derme, de la peau et du foie par microscopie électronique illustre cette hétérogénéité des endothéliums (**Figure 18**). En effet selon l'organe, on observe des structures tubulaires, des cavéoles, des cellules associées ou pas aux cellules endothéliales (cellules *chromaffines-like* ou péricytes plus ou moins nombreux), des fenestrations ou une membrane basale d'épaisseur variable (Yano, Gale et al. 2007). Ces variations de structure confèrent une fonction spécifique à chaque vaisseau en même temps qu'elles sont à l'origine de réponses biologiques différentes à une même stimulation.

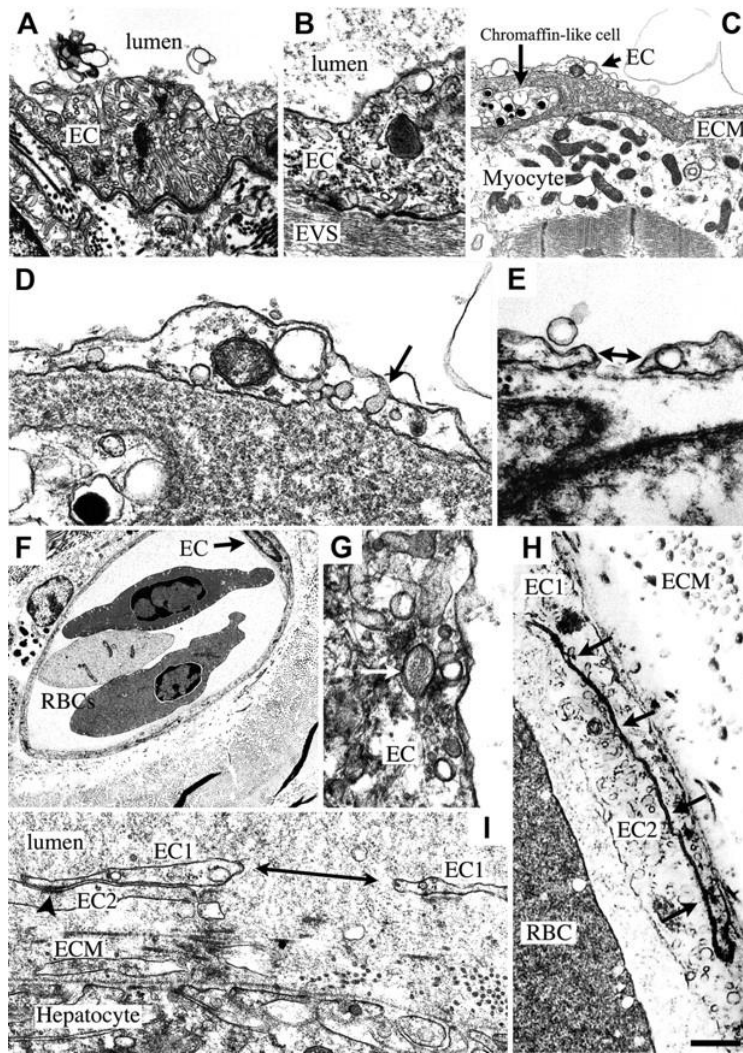


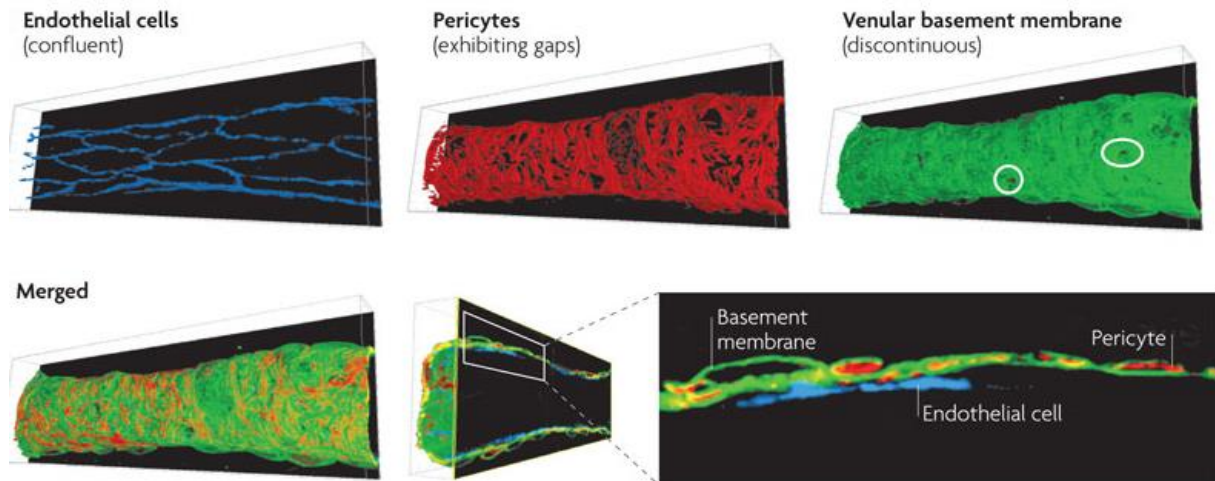
Figure 18 : Hétérogénéité structurale des endothéliums chez la myxine observée par microscopie électronique. (A, B) Cellules endothéliales (EC) d'aorte avec des structures tubulaires et probablement des corps de Weibel-Palade. (C) EC cardiaques reposant sur une épaisse matrice extra-cellulaire (ECM) en contact avec des cellules chromaffin-like. (D) Grossissement d'une EC cardiaque riche en cavéoles (flèche). (E) Endothélium du cœur discontinu (pointe de flèche). (F) EC du derme riche en vésicules. (G) EC d'un microvaisseau du derme avec un corps de Weibel-Palade (flèche). (H) Grossissement d'un microvaisseau du derme et de son endothélium continu (flèche). (I) Sinusoïde hépatique avec un endothélium discontinu (flèche) présentant de nombreuses jonctions cellulaires (pointe de flèche) et reposant sur une ECM épaisse. La barre d'échelle correspond pour les différentes photos à 865 nm (A), 469 nm (B), 898 nm (C), 258 nm (D), 393 nm (E), 5172 nm (F), 261 nm (G), 2305 nm (H), et 492 nm (I). EVS : espace extravasculaire ; Lumen : lumière vasculaire ; RBCs : globule rouge (Yano, Gale et al. 2007).

De plus, les cellules endothéliales sont sensibles à leur microenvironnement biomécanique (flux, contraintes hémodynamiques) et biochimique (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, hormones, oxygène, ...) et s'adaptent à ces contraintes. Ces adaptations peuvent, par exemple, se manifester par un changement de forme, un changement d'expression protéique ou une modification des flux calciques. Ces changements de phénotype sont particulièrement observables en réaction aux signaux pro-inflammatoires au niveau des veinules post-capillaires, permettant ainsi l'extravasation des leucocytes (voir section ci-dessous). De plus, des études ont mis en évidence des différences d'expression génique entre des cellules endothéliales artérielles et veineuses (Chi, Chang et al. 2003). Le phénotype des cellules endothéliales est donc susceptible d'évoluer dans le temps et dans l'espace.

2. Membrane basale

La membrane basale est une structure tridimensionnelle en contact étroit avec la face basale des cellules endothéliales et la face apicale des péricytes. Elle peut être synthétisée par les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les péricytes. Son identification a été possible grâce à la microscopie électronique. Cette structure apparaît dense aux électrons, amorphe, poreuse et mesure entre 50 et 100 nm d'épaisseur (Kalluri 2003). Elle est composée de collagène de type IV, de laminines, des nidogènes 1 ou 2 et de protéoglycane héparane-sulfate (perlécane) (**Figure 19**). L'ostéonectine, les fibulines 1 et 2, les collagène VII, XV, XVIII ainsi que les thrombospondines 1 et 2 sont présents mais en plus faible quantité (Hallmann, Horn et al. 2005). Le collagène de type IV et les laminines forment chacun un réseau indépendant interconnecté par les nidogènes et le perlécane. Le collagène IV compose à 50% la membrane basale et est essentiel à sa structure et à sa stabilité. Sa délétion est létale au stade embryonnaire chez les souris (Poschl, Schlotzer-Schrehardt et al. 2004). Chaque protéine matricielle compte plusieurs isoformes permettant des associations multiples générant des membranes basales de composition originale (Sorokin 2010). Chaque combinaison confère à la membrane basale des propriétés et/ou fonctions différentes (Hudson, Reeders et al. 1993, Frieser, Nockel et al. 1997, Hallmann, Horn et al. 2005).

A



B

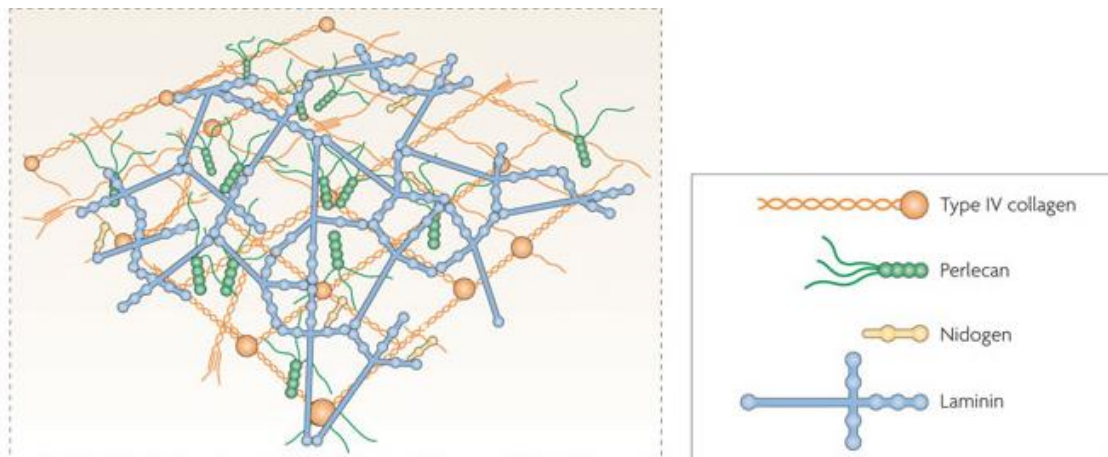


Figure 19 : Localisation et composition de la membrane basale vasculaire. (A) Représentation en trois dimensions de la paroi vasculaire d'une veinule du muscle crémaster de souris après immunomarquage des cellules endothéliales (CD31), des péricytes (α -SMA) et de la membrane basale (laminine) (adapté de (Nourshargh, Hordijk et al. 2010)).

(B) La membrane basale est une structure tridimensionnelle composée d'un réseau de collagène de type IV et d'un réseau de laminine interconnectés par le perlécane et les nidogènes (adapté de (Sorokin 2010)).

L'hétérogénéité structurelle des membranes basales s'observe entre artère et veine (**Figure 20**). En effet chez le primate, le diamètre des fibres et des pores de la membrane basale de l'aorte et de la carotide sont supérieurs à ceux de la veine saphène ou de la veine cave inférieure. De plus, la membrane basale est plus épaisse dans l'aorte et la carotide que dans la veine saphène. La membrane basale de la veine cave inférieure a une épaisseur intermédiaire (Liliensiek, Nealey et al. 2009). Ces caractéristiques peuvent être altérées en fonction du statut sain ou malade d'un individu comme l'atteste l'épaississement

de la membrane basale des capillaires musculaires chez les sujets diabétiques (Siperstein, Unger et al. 1968).

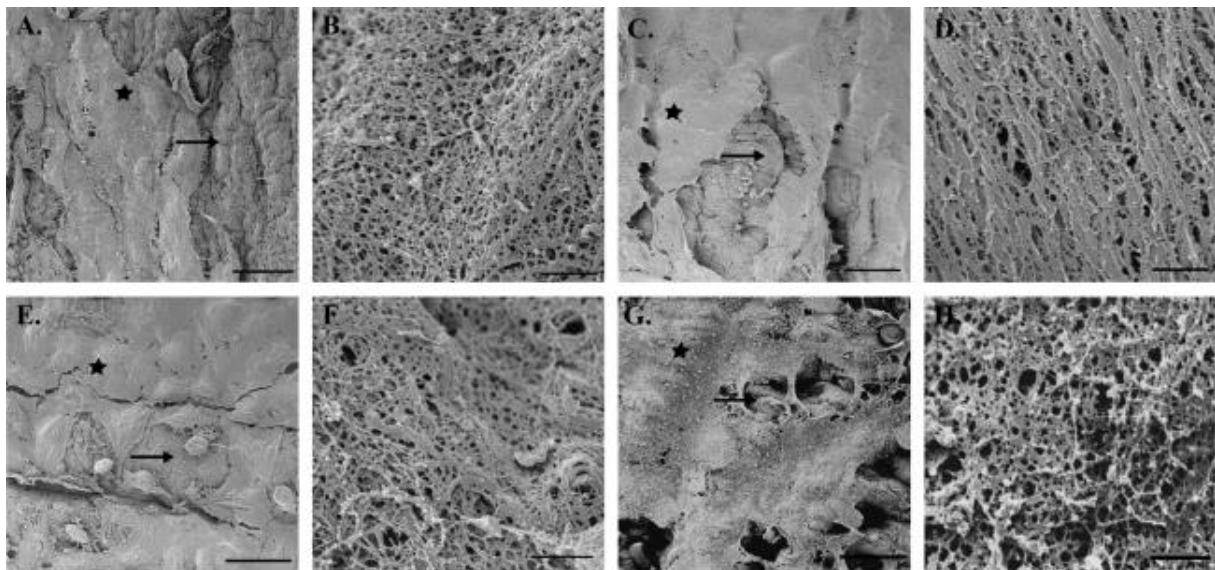


Figure 20 : Ultrastructure de la membrane basale de différents vaisseaux observée par microscopie électronique. Photos montrant l'endothélium (A, C, E, G) et la membrane basale (B, D, F, H) provenant de l'aorte (A, B), de l'artère carotide (C, D), de la veine saphène (E, F) et de la veine cave inférieure (G, H). Les étoiles marquent un endothélium intact et les flèches une exposition de la membrane basale (Liliensiek, Nealey et al. 2009).

Des différences de structure entre les membranes basales des différents organes ont aussi été constatées. La membrane basale des capillaires des muscles striés est décrite comme un réseau de fibres associées de manière aléatoire au sein d'une matrice de densité moyenne. Une structure plus organisée et stratifiée est décrite pour la membrane basale des capillaires cutanés. La membrane basale des vaisseaux associés à la cornée (membrane Descemet) est plus épaisse et contient du collagène de type VIII (Kefalides 1969). Dans la majorité des organes, la membrane basale vasculaire est associée aux cellules endothéliales, aux péricytes et à d'autres cellules perivasculaires (cellules musculaires lisses notamment). Cependant, la membrane de Descemet n'est associée qu'aux cellules endothéliales alors que la membrane basale glomérulaire (**Figure 21**) est associée à des cellules endothéliales et à des cellules épithéliales (Pavelka 2004).

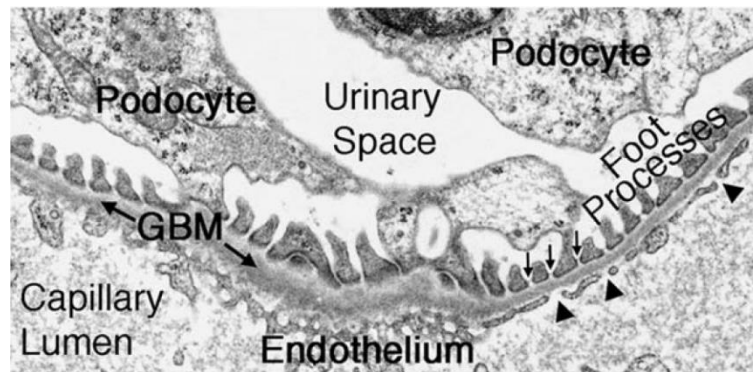


Figure 21 : La membrane basale glomérulaire. Dans le rein, la membrane basale glomérulaire (GBM) est associée aux cellules épithéliales avec leurs podocytes et aux cellules endothéliales (Miner 2011).

Enfin au sein de la membrane basale vasculaire d'un même vaisseau, il peut exister des zones spécialisées comme par exemple les *low expression regions* (LERs) (Voisin, Pröbstl et al. 2010). Elles sont caractérisées par une plus faible proportion de protéines matricielles (collagène IV et laminine). Elles ont été observées dans de nombreux organes (peau, muscle, mésentère) et principalement au niveau des veinules. Lors d'une réaction inflammatoire, pour s'extravaser les leucocytes doivent franchir la membrane basale vasculaire. L'attaque de cette membrane basale par les protéases à sérine ainsi que les métalloprotéases (MMPs) permet aux leucocytes de traverser cette membrane et de s'infiltrer dans les tissus (Kolaczowska, Grzybek et al. 2009, Lerchenberger, Uhl et al. 2013). Par leur faible densité en protéines matricielles, ces LERs sont des zones privilégiées pour la transmigration des leucocytes.

B. Activation des cellules endothéliales

En réaction aux agressions exogènes ou endogènes, les cellules endothéliales acquièrent de nouvelles caractéristiques en « s'activant » (Pober and Sessa 2007). Cette activation comprend des modifications rapides et d'autres plus lentes dépendantes d'une synthèse protéique.

Ces adaptations sont consécutives à une activation des récepteurs endothéliaux fortement exprimés au niveau des veinules (RCPG principalement) par des médiateurs inflammatoires (histamine, facteur d'activation plaquettaire (PAF), ...) (Heltianu, Simionescu et al. 1982). Ces médiateurs sont produits par des cellules immunitaires résidentes (mastocytes, macrophages, cellules dendritiques) suite à la reconnaissance de signaux de danger (*Pathogen-associated molecular patterns* ou *Damage-associated molecular pattern molecules*) par des récepteurs spécifiques *pattern recognition receptors* (PRRs). L'activation de ces récepteurs endothéliaux induit une élévation du calcium cytoplasmique et le déclenchement de diverses voies de signalisation.

Ces voies intracellulaires aboutissent à une vasodilatation par la production d'oxyde nitrique (NO) et de prostacycline (PGI₂), à une augmentation de la perméabilité endothéliale par une ouverture des

jonctions serrées et adhérentes, à une exocytose de la P-sélectine (ou CD62P) des corps de Weibel-Palade qui s'additionne aux CD31 (ou PECAM-1) et CD99 déjà exprimés à la membrane par les cellules endothéliales.

Dans un second temps, les cytokines pro-inflammatoires (comme le TNF- α ou l'IL-1) activent à leur tour les cellules endothéliales par la liaison à leur récepteur spécifique. En plus des effets déjà mentionnés, des récepteurs aux leucocytes sont synthétisés *de novo* tels que la E-sélectine, le *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) et le *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1). Des chimiokines, comme CXCL8, sont produites favorisant le recrutement des leucocytes.

II. Réactions inflammatoires et polynucléaires neutrophiles

A. Hématopoïèse et leucocytes

Les leucocytes appartiennent à la lignée hématopoïétique qui prend son origine dans les cellules souches hématopoïétiques (HSCs). A partir de ces cellules souches, un système très hiérarchisé de progéniteurs hématopoïétiques (HPCs) se met en place (Manz and Boettcher 2014).

A partir des progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes communs, les précurseurs hématopoïétiques se différencient progressivement pour former des cellules matures (**Figure 22**). Sous le contrôle d'un ensemble de cytokines et de gènes, deux lignées de cellules hématopoïétiques se développent :

1- la lignée myéloïde comprenant les granulocytes, les plaquettes, les érythrocytes, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques,

et

2- la lignée lymphoïde avec les lymphocytes B et T et les cellules NK (*Natural Killer*).

Les polynucléaires neutrophiles font partie de la lignée granulocytaire qui comprend aussi les éosinophiles et les basophiles. Cette classification repose sur les observations microscopiques de Paul Ehrlich en 1879 qui a identifié la structure polylobée du noyau et les granulations grâce à des colorants ayant des affinités différentes pour les structures neutres, acides ou basiques. Ces premières observations ont été confirmées avec le développement de la microscopie électronique (dans les années 1970) puis le fractionnement subcellulaire et l'isolement de chaque type de granule (dans les années 1970 et 1980) (Borregaard and Cowland 1997).

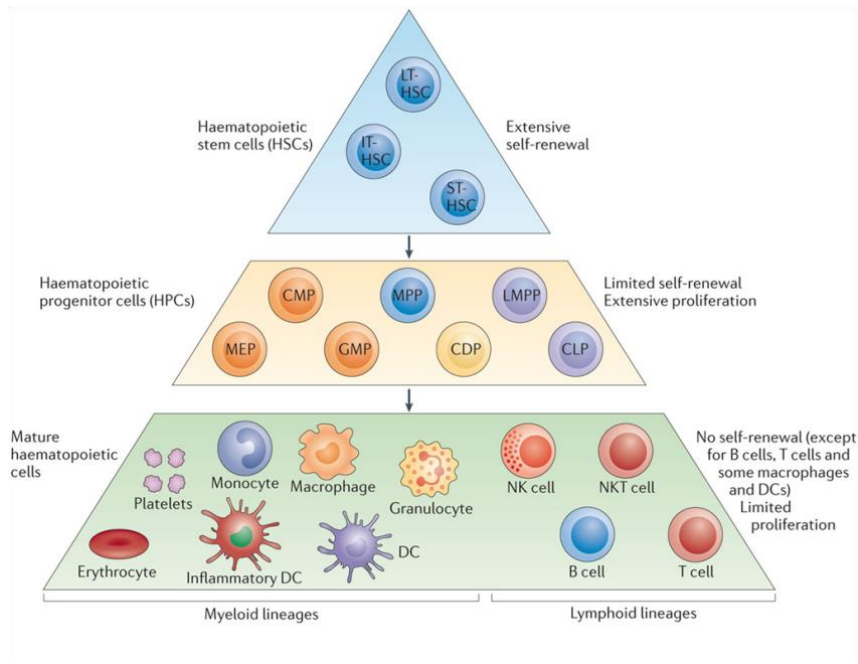


Figure 22 : L'hématopoïèse. Représentation du système hiérarchisé de l'hématopoïèse qui débute avec les cellules souches hématopoïétiques et aboutit aux lignées myéloïdes et lymphoïdes (Manz and Boettcher 2014).

B. La granulopoïèse

La granulopoïèse est illustrée **Figure 23**. Au cours de la différenciation et de la maturation, les cellules passent par les stades de myéloblaste, de promyélocyte, de myélocyte, de métamyélocyte pour aboutir à une forme juvénile (*band cell*) avant la maturation complète en neutrophile. Ces étapes sont contrôlées par différents facteurs de transcription et/ou facteurs de croissance (Borregaard 2010).

Le *homing* des cellules souches au sein de la niche hématopoïétique est assuré par la sécrétion de CXCL12 (ou SDF-1) par les cellules stromales (ostéoblastes et cellules endothéliales) et par l'expression de son récepteur CXCR4 sur les cellules souches (Sugiyama, Kohara et al. 2006, Borregaard 2010). Le récepteur CXCR2, exprimé sur les cellules myéloïdes, est impliqué dans la libération des cellules matures dans la circulation générale après sa liaison à ses ligands CXCL1 (ou GRO- α ou KC) et CXCL2 (ou GRO- β). Ces deux chimiokines sont exprimées par les cellules endothéliales de la niche hématopoïétique (Eash, Greenbaum et al. 2010).

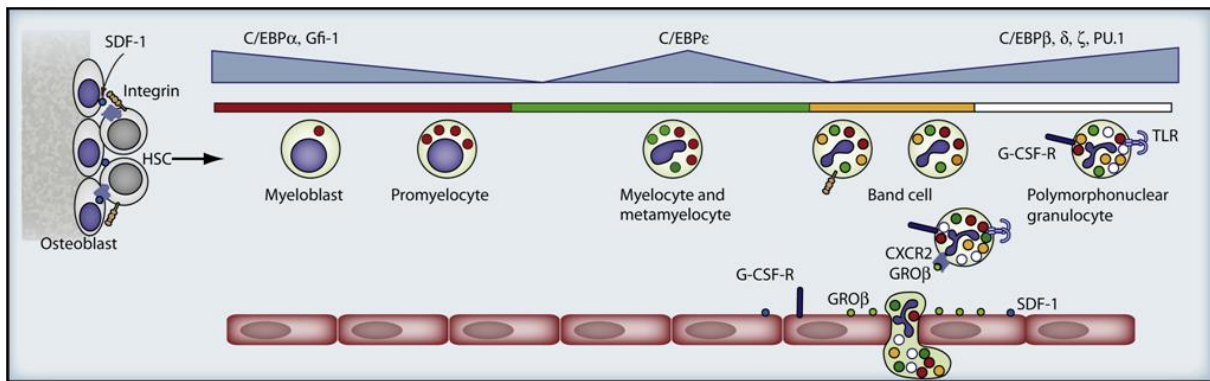


Figure 23 : Les différentes étapes de la granulopoïèse. L'expression de différents facteurs de transcription (*C/EBP*, *Gfi-1*, *PU.1*, ...) contrôle la différenciation et la maturation des cellules souches en granulocytes. Dans la niche hématopoïétique, un équilibre entre la liaison des chimiokines *CXCL12* (ou *SDF-1* ; rétention) et *CXCL1/2* (*GRO-α* ou *KC/GRO-β* ; libération) à leur récepteur respectif *CXCR4* et *CXCR2* régule la rétention et la libération des neutrophiles dans la circulation. Les granules azurophiles, spécifiques, gélatinases et les vésicules sécrétoires sont respectivement figurés en rouge, en vert, en jaune et en blanc. Ces granules sont séquentiellement formés à partir du stade promélocytaire, sous le contrôle de facteurs de transcription indiqués en haut de la figure (Borregaard 2010).

Chez l'humain, de 10^{11} à 10^{12} neutrophiles sont produits par jour (Mayadas, Cullere et al. 2014). Les neutrophiles survivent entre 8 et 12 heures dans la circulation ou *ex-vivo*, et jusqu'à un ou deux jours dans les tissus. Cette durée de vie est débattue et certaines études estiment que les neutrophiles peuvent survivre jusqu'à 5 jours dans la circulation (Mayadas, Cullere et al. 2014). Le nombre de neutrophiles circulant est soumis à des variations circadiennes. Un changement de morphologie au cours du temps et du vieillissement de la cellule est aussi observé (Adrover, Nicolas-Avila et al. 2016).

Des différences existent entre le système immunitaire des Hommes et celui des souris (Mestas and Hughes 2004) comme l'inversion du ratio neutrophiles/lymphocytes circulant. En effet, parmi les leucocytes circulant, 75 à 90% sont des lymphocytes et 10 à 25% sont des neutrophiles chez la souris alors que chez l'Homme on trouve une proportion de 30 à 50% de lymphocytes et de 50 à 70% de neutrophiles dans la circulation (Doeing, Borowicz et al. 2003). Une demi-vie plus courte des neutrophiles de souris dans la circulation générale comparée aux neutrophiles humains pourrait expliquer les différences observées comme le suggèrent des études de mise en culture de neutrophiles (Savill, Wyllie et al. 1989, Boxio, Bossenmeyer-Pourié et al. 2004). Cependant, cette faible proportion de neutrophile circulant est à mettre en parallèle avec la forte mobilisation possible des neutrophiles en cas de réaction inflammatoire chez la souris comme montré dans les réaction de type DTH (*Delayed-type hypersensitivity*) et la réaction d'Arthus (Crowle 1975).

C. Formation et contenu des granules

Les granules des neutrophiles, et plus généralement des granulocytes, se forment à partir du stade promyélocytaire par un transfert passif des protéines entre l'appareil de Golgi et les granules (Bainton, Ulliyot et al. 1971, Arnljots, Sorensen et al. 1998).

Les neutrophiles contiennent quatre types de granules (**Figures 24 et 25**), qui sont caractérisés par les protéines qu'ils contiennent :

- 1-les **granules azurophiles** ou primaires caractérisés par la présence de la myéloperoxydase (MPO),
- 2-les **granules spécifiques** ou secondaires caractérisés par la présence de la lactoferrine,
- 3-les **granules gélatinases** ou tertiaires caractérisés par la présence de la gélatinase (MMP9),
- 4-les **granules ou vésicules sécrétoires** sont formés par endocytose au dernier stade de maturation des neutrophiles et présentent à leur face interne des protéines importantes pour la réaction inflammatoire telles que des récepteurs (FcγRIII, récepteurs du complément CR1, ...) et molécules d'adhésion comme Mac-1 (CD11b/CD18).

Certaines molécules sont contenues spécifiquement dans un seul type de granule mais la majorité des facteurs sont stockés dans les différents types de granules. Ces médiateurs granulaires ont des fonctions particulières et interviennent aux différentes étapes de la réaction inflammatoire : adhésion aux vaisseaux, diapédèse, lutte contre les pathogènes.

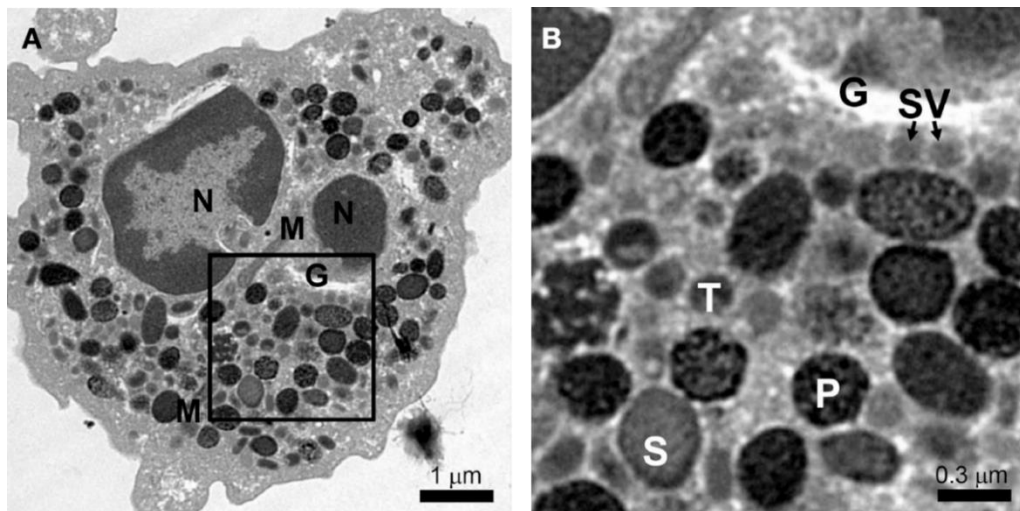


Figure 24 : Neutrophile humain observé en microscopie électronique. A et B : Neutrophile au repos avec ses granules primaires (P) marqués en noir après une coloration au DAB (3,3'-Diaminobenzidine), substrat de la peroxydase. Les granules secondaires (S) et tertiaires (T) apparaissent plus clairs. Les vésicules de sécrétion (SV) sont proches de l'appareil de Golgi (G). Le noyau (N) polylobé du neutrophile et quelques mitochondries (M) sont également observables (Sheshachalam, Srivastava et al. 2014).

Cette classification des granules traduit aussi leur cinétique de libération lors de l'activation des neutrophiles. Les granules formés tardivement sont les premiers à être mobilisés. Effectivement, la synthèse des granules obéit à un processus particulier appelé *targeting by timing of biosynthesis* par certains auteurs (Le Cabec, Cowland et al. 1996). Les protéines sont regroupées dans les granules en fonction du stade de maturation du neutrophile auquel elles sont synthétisées. Ces auteurs montrent qu'en forçant la synthèse de la protéine NGAL (*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) par transfection de cellules de la lignée HL-60 au stade promyélocytaire (alors que normalement cette protéine est synthétisée plus tard au stade myélocytaire/métamyélocytaire), la protéine est incorporée dans les granules azurophiles et non dans les vésicules sécrétoires. Une des conséquences de cette modification de la composition granulaire est la dégradation de NGAL par des protéases contenues dans les granules azurophiles. Le stade de biosynthèse de chaque protéine détermine ainsi sa localisation granulaire et sa sécrétion.

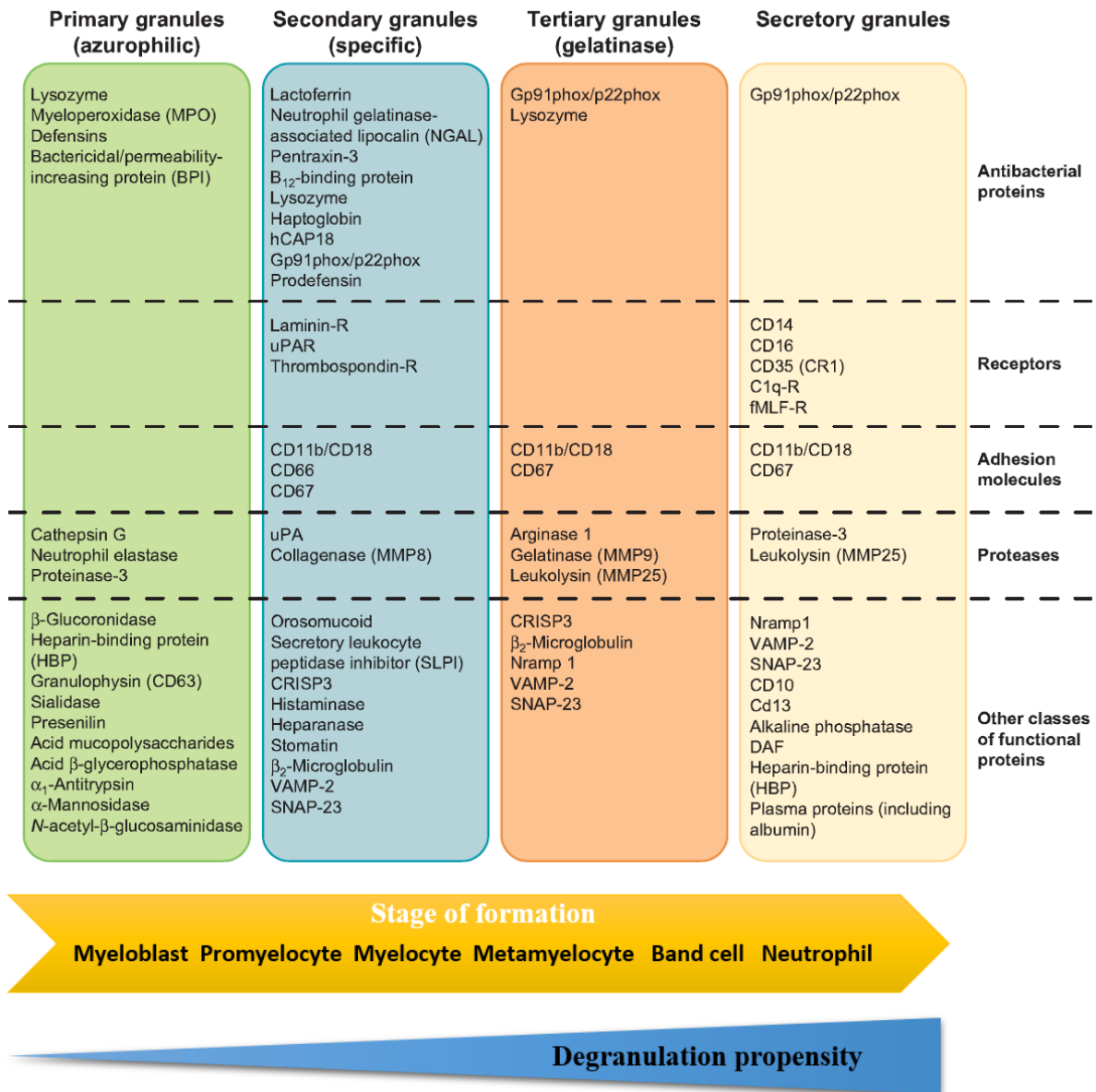


Figure 25 : Les différents granules des neutrophiles et leur contenu. Les quatre types de granules formés pendant la granulopoïèse contiennent des facteurs ayant des fonctions différentes : des protéines antibactériennes, des récepteurs, des molécules d'adhésion, des protéases, ... Les granules formés tardivement lors de la granulopoïèse sont les premiers à être sécrétés après activation du neutrophile (adapté de (Amulic, Cazalet et al. 2012, Paul 2013)).

D. Neutrophile et défense

1. Systèmes de défense dépendants de l'oxygène

Le système de défense des neutrophiles repose pour partie sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS ont une action propre antibactérienne et ils sont également essentiels pour l'activité de la myéloperoxydase et la formation des NETs ou *neutrophil extracellular traps*.

a. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène comprennent plusieurs entités comme les ions superoxydes (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou les radicaux hydroxyles (OH^\cdot). Les ions superoxydes peuvent réagir avec l'oxyde nitrique (NO) pour former des ions peroxynitrites (ONOO^-). Les ROS sont générés par la NADPH oxydase (NOX), formée par l'assemblage des sous-unités p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, gp91^{phox} (NOX2), gp22^{phox}, et de la GTPase Rac (**Figure 26**). La NADPH oxydase peut être exprimée à la fois sur la membrane plasmique et sur la membrane du phagosome (Mayadas, Cullere et al. 2014).

Des mutations ont été décrites sur la NADPH oxydase et sont à l'origine de granulomatoses septiques chroniques (CGD). Ces malades présentent des infections sévères et chroniques (Amulic, Cazalet et al. 2012).

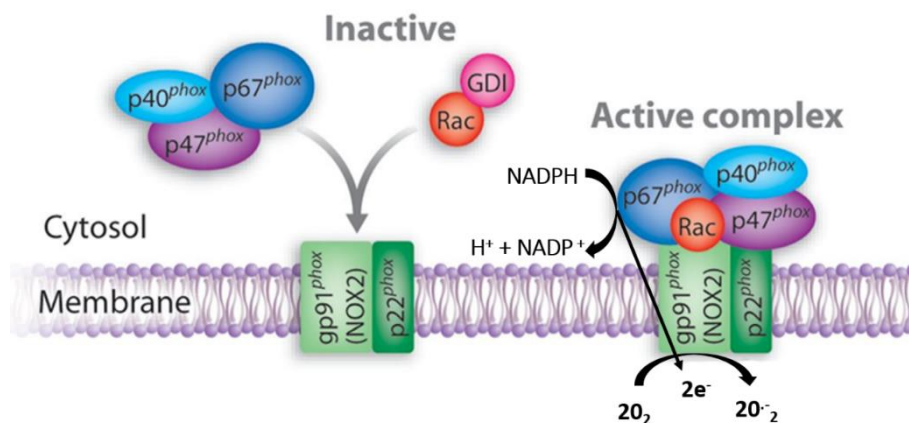


Figure 26 : La NADPH oxydase (NOX). L'assemblage des différentes sous-unités de la NADPH oxydase à la membrane plasmique du neutrophile ou du phagosome permet la production d'espèces réactives de l'oxygène telles que les ions superoxydes (O_2^-) (adapté de (Quinn, Ammons et al. 2006)).

b. L'activité de la myéloperoxydase

En plus de leurs effets propres, les espèces réactives de l'oxygène sont nécessaires à l'activité de la myéloperoxydase. Celle-ci catalyse la formation d'acide hypochloreux (HOCl) à partir du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'ion chlorure (Cl⁻).

c. Neutrophil Extracellular Traps

L'étude des patients atteints de CGD (Fuchs, Abed et al. 2007, Bianchi, Hakkim et al. 2009) a montré que la formation des NETs (*Neutrophil extracellular traps*) est également sous la dépendance des espèces réactives de l'oxygène. Les NETs sont formés par des brins d'ADN (chromatine) décondensés décorés par des histones H2, H3, H4 et des protéines granulaires comme la MPO ou des protéases à sérine (élastase, protéinase 3) et qui sont projetés en dehors du neutrophile (**Figure 27**). La première description de la « nettose » par une équipe japonaise en 1996 (Takei, Araki et al. 1996) décrit une mort du neutrophile différente de la nécrose et de l'apoptose suite à une activation au phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA). Ces auteurs ont ainsi observé une décondensation de la chromatine avant la rupture de l'enveloppe nucléaire puis cytoplasmique. Le rôle des espèces réactives de l'oxygène est alors évoqué. A partir des années 2000, les propriétés antibactériennes de ces câbles d'ADN piégeant les bactéries et évitant ainsi leur dissémination dans l'organisme sont décrites (Brinkmann, Reichard et al. 2004, Fuchs, Abed et al. 2007). Bien que certains auteurs montrent qu'après la formation de NETs les neutrophiles sont encore fonctionnels (Yipp, Petri et al. 2012), leur survie reste un sujet débattu. Principalement décrite chez les neutrophiles, cette forme particulière de mort cellulaire a aussi été observée chez les éosinophiles (Yousefi, Gold et al. 2008).

Les NETs ont un double effet. Ils sont bénéfiques pour limiter la propagation des micro-organismes dans le compartiment vasculaire mais ils sont aussi à l'origine de dégâts tissulaires (Clark, Ma et al. 2007, McDonald, Urrutia et al. 2012) et ils contribuent à l'initiation et au développement de thromboses dans un contexte inflammatoire nommées immunothromboses (Fuchs, Brill et al. 2010, Engelmann and Massberg 2013).

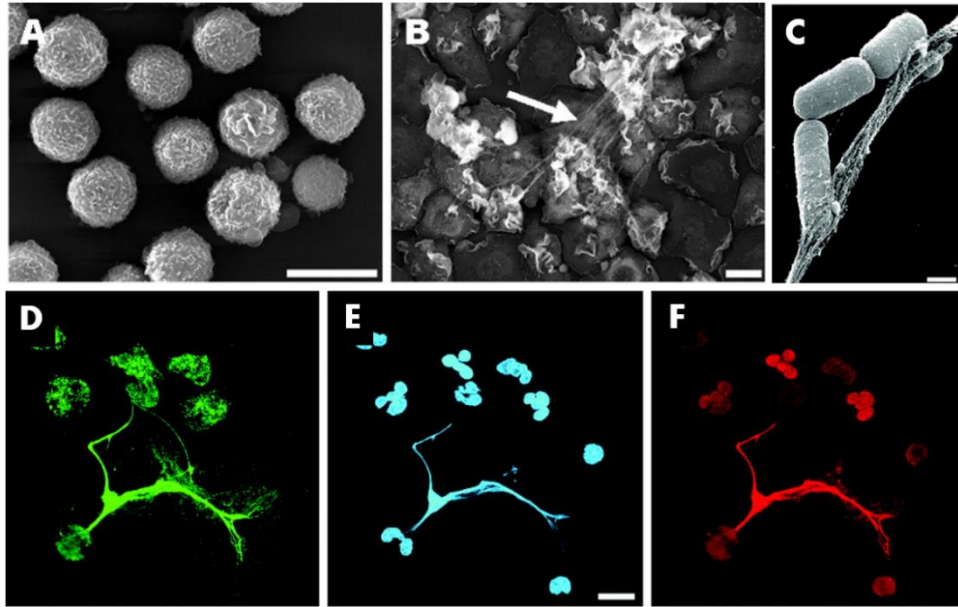


Figure 27 : Observation des *Neutrophil extracellular traps* (NETs) par microscopie électronique (A, B, C) ou après immuno-marquage de l'élastase neutrophilaire (D), de l'ADN (E) ou des complexes histones H2A-H2B-ADN (F). Neutrophiles humains au repos (A) puis observation de NETs produits après activation au PMA (25nM, 30min) (B) ou après incubation des neutrophiles avec la bactérie *Shigella flexneri* (C). Les NETs sont ensuite caractérisés par immunofluorescence après stimulation des neutrophiles avec l'interleukine-8 (10ng, 30min) (D, E, F). Barre 10µm (A, B, D-F) ou 500nm (C) (adapté de (Brinkmann, Reichard et al. 2004)).

2. Systèmes de défense indépendants de l'oxygène

Parmi les quatre types de protéases présentes dans l'organisme (à cystéine, à sérine, à acide aspartique, et métalloprotéase), les protéases à sérine et les métalloprotéases matricielles (MMPs) sont fortement exprimées dans les neutrophiles.

a. Les métalloprotéases matricielles

Dans les neutrophiles, on retrouve principalement la MMP8 (collagénase) et la MMP9 (gélatinase) dans les granules gélatinases et azurophiles. La MMP25 (leucolysine) a aussi été détectée dans les granules gélatinases et les vésicules sécrétoires mais son rôle et ses substrats sont indéterminés.

Les métalloprotéases comptent une vingtaine de membre chez l'humain. Leur activité est dépendante des ions zinc (Zn^{2+}). Elles sont exprimées sous forme de zymogènes. Le clivage du domaine « pro-enzyme » produit la forme active de l'enzyme et démasque le domaine catalytique contenant le domaine

de liaison au zinc. En C-terminal un domaine hémopexine permet la liaison de l'enzyme à son substrat, ou aux membranes cellulaires, ou de certains inhibiteurs. Les MMPs membranaires (MT-MMP) contiennent en plus une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Parks, Wilson et al. 2004).

Les MMPs sont sécrétées sous forme de pro-enzymes inactives et activées dans le milieu extracellulaire par d'autres protéases ou les espèces réactives de l'oxygène. Les mécanismes exacts d'activation *in vivo* restent à déterminer (**Figure 28**).

Les principaux inhibiteurs des métalloprotéases sont les quatre TIMPS (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*) et l' α 2-macroglobuline. La glycoprotéine membranaire RECK (*Reversion including cysteine-rich protein with kazal motif*) a aussi été décrite comme inhibiteur des MMPs pendant le développement embryonnaire (Oh, Takahashi et al. 2001).

In vitro, les MMPs peuvent dégrader tous les constituants de la matrice extracellulaire (MEC) et de la membrane basale. Les MMPs ont aussi été décrites comme pouvant réguler les processus inflammatoires en clivant des chimiokines, des cytokines, des facteurs de coagulation et des peptides antimicrobiens (Owen 2008).

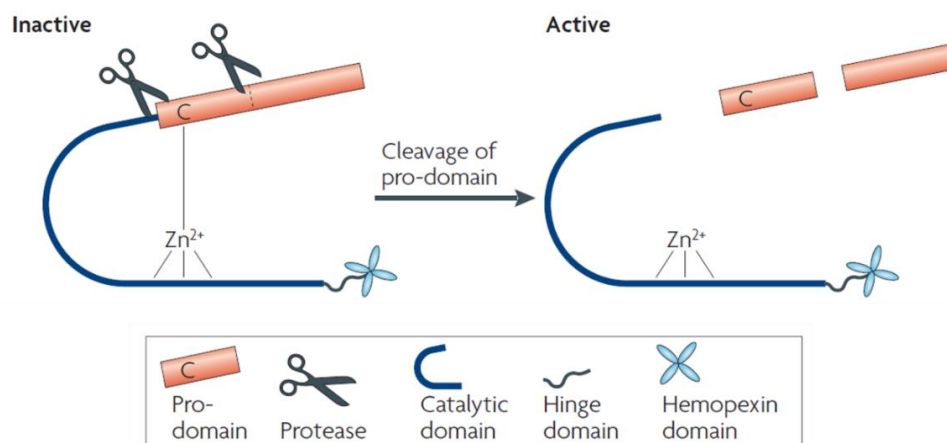


Figure 28 : Structure schématique des métalloprotéases matricielles (MMPs). Le clivage du pro-domaine permet de produire une forme active de l'enzyme (C : résidu cystéine conservé) (adapté de (Page-McCaw, Ewald et al. 2007)).

b. Les protéases à sérine : cathepsine G, élastase et protéinase 3

L'élastase, la cathepsine G et la protéinase 3 sont trois protéases à sérine. L'élastase humaine a été identifiée en 1968 par Janoff et Scherer, la cathepsine G en 1975 et la protéinase 3 en 1978. Ces trois protéases à sérine sont homologues et appartiennent à la superfamille de la chymotrypsine.

Ces protéases sont majoritairement présentes dans les granules azurophiles des neutrophiles sous leur forme active. Dans les neutrophiles, l'élastase a aussi été détectée sur l'enveloppe nucléaire et la protéinase 3 dans les vésicules sécrétoires et associée à la membrane cytoplasmique de manière

constitutionnelle. De plus, la protéinase 3 est retrouvée dans les basophiles et les mastocytes alors que la cathepsine G est présente dans les basophiles.

Ces trois enzymes ont des propriétés très semblables (Korkmaz, Horwitz et al. 2010). Elles constituent une des lignes de défense des neutrophiles contre les micro-organismes ou d'autres agressions non infectieuses de l'hôte. Ces protéases peuvent agir selon une voie intracellulaire au niveau du phagososome ou être sécrétées dans le milieu extracellulaire. Au niveau du phagososome, ces protéases à sérine contribuent, en association avec des peptides antimicrobiens et les espèces réactives de l'oxygène à la destruction des pathogènes phagocytés par le neutrophile. Lorsqu'elles sont sécrétées, elles peuvent dégrader la membrane basale et la matrice extracellulaire, cliver certains récepteurs ou médiateurs inflammatoires. On peut aussi noter que la protéinase 3 régule négativement la granulopoïèse et que la cathepsine G active les plaquettes.

Ces protéases constituent une défense efficace contre les infections, mais leur action demande une régulation fine pour ne pas mener à une destruction des tissus hôtes. En cas de sur-activation, elles peuvent être responsables de pathologies inflammatoires comme la broncho-pneumopathie-chronique-obstructive (BPCO).

Parmi leurs inhibiteurs endogènes, les serpins sont les principaux inhibiteurs des protéases à sérine et incluent la α 1-protéinase (ou α 1-antitrypsine) et la α 1-antichymotrypsine. D'autres types d'inhibiteurs sont aussi identifiés : l' α 2-macroglobuline, la *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI) pour l'élastase et la protéinase 3 et l'élafine pour l'élastase et la cathepsine G.

L'absence, la dysfonction, la surexpression ou la mauvaise localisation des protéases à sérine peuvent également être à l'origine de pathologies. Une mutation du gène *ELA2* (humain) ou *Elane* (souris) codant l'élastase est à l'origine d'une neutropénie congénitale. De plus, la protéinase 3 membranaire est la cible des anticorps de type ANCA (*Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies*) dans la maladie auto-immune granulomateuse de Wegener (vascularite).

Des différences entre les protéases à sérine humaines et murines existent (Kalupov, Brillard-Bourdet et al. 2009). Elles concernent principalement le nombre de charge et la place des résidus chargés au sein de chaque protéine. Ces différences peuvent partiellement expliquer les différences de spécificité de clivage des substrats. Cependant, les propriétés et fonctions de ces protéases sont conservées entre les deux espèces.

c. Autres peptides et enzymes

Les neutrophiles contiennent dans leurs granules d'autres protéines antimicrobiennes (Amulic, Cazalet et al. 2012) comme :

- des **peptides cationiques** : des α -défensines ou la BPI (*Bactericidal/permeability-increasing protein*),
- des **enzymes protéolytiques** avec un mode d'action indépendant de cette activité protéolytique comme l'azurocidine,
- des **protéines chélatrices des métaux** comme la lactoferrine (fer) et la calprotectine (manganèse et zinc).

3. La phagocytose

La phagocytose permet d'éliminer les pathogènes ou les débris cellulaires par leur internalisation et leur dégradation au sein d'un phagosome (**Figure 29**). Cette internalisation dépend d'une reconnaissance de la cible par des récepteurs spécifiques (PRRs, récepteurs Fc ou récepteurs du complément). Pour la destruction du pathogène, une étape de maturation du phagosome est nécessaire pour que celui-ci acquière ses propriétés antimicrobiennes. Les granules neutrophilaires fusionnent avec le phagosome et la NADPH oxydase s'assemble sur la membrane du phagosome pour générer des espèces réactives de l'oxygène. Le pH du phagosome est plutôt alcalin ou neutre, permettant une activité optimale des protéases à sérine et des ROS (Amulic, Cazalet et al. 2012).

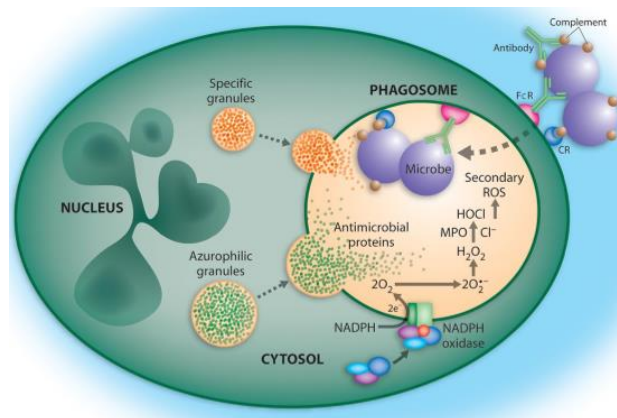


Figure 29 : La phagocytose. Les neutrophiles peuvent internaliser les pathogènes dans un phagosome après leur reconnaissance par les récepteurs du complément (CR) ou les récepteurs des immunoglobulines (FcR). Les facteurs contenus dans les granules neutrophilaires ainsi que la génération de ROS par la NADPH oxydase permettent d'éliminer ces pathogènes (Quinn, Ammons et al. 2006).

4. Production de cytokines et de chimiokines

Les neutrophiles ont également la capacité de synthétiser *de novo* des cytokines et/ou chimiokines : CXC- ou des CC- chimiokines, des cytokines pro- ou anti-inflammatoires, des cytokines immunorégulatrices, des facteurs de croissance, des facteurs angiogéniques et fibrogéniques ou des facteurs de la superfamille du TNF (*Tumor necrosis factor*) (Mantovani, Cassatella et al. 2011, Paul 2013). Elles peuvent être synthétisées en réponse à une activation des neutrophiles par des cytokines, des chimiokines ou des micro-organismes. Au-delà de la réponse inflammatoire, les neutrophiles participent ainsi à la régulation de l'immunité adaptative en favorisant par exemple la prolifération et la maturation des lymphocytes B ou la différenciation des lymphocytes T.

5. Activation des neutrophiles

L'activation des neutrophiles est progressive. Elle commence lors de l'extravasation des neutrophiles et se poursuit dans le tissu (Mayadas, Cullere et al. 2014). Pour une activation complète des neutrophiles, plusieurs stimuli sont requis. Suite à cette activation, les systèmes de défense des neutrophiles décrits précédemment sont déployés.

Les neutrophiles sont sensibles aux signaux pro-inflammatoires grâce à une diversité de récepteurs détectant les micro-organismes et molécules de l'immunité endogène (**Figure 30**) :

1- **Les Pattern-Recognition Receptors (PRRs)** reconnaissent des molécules associées aux pathogènes nommées *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Ce sont par exemple les lipopolysaccharides (LPS), certains peptidoglycanes, de l'ARN double brin ou de l'ADN microbien.

Les PRRs peuvent aussi détecter des molécules issues de la nécrose des cellules de l'hôte appelées *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) telles que l'ADN mitochondrial ou les peptides formylés qui sont formés lors de réactions inflammatoires stériles (brûlure par exemple).

Les PRRs les plus exprimés sur les neutrophiles sont la *dectine-1*, *triggering receptor expressed on myeloid cells 1* (TREM-1) et les *toll-like receptors* (TLRs).

2- **Les récepteurs aux opsonines** que sont les fractions du complément et les immunoglobulines G (IgG). Les neutrophiles expriment principalement les récepteurs CR3 (ou Mac-1), CR4, CR1 ainsi que les récepteurs de faible ou haute affinité à la fraction Fc des immunoglobulines G.

3- **Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)** sont nombreux et participent principalement à la diapédèse et à la pré-activation (*priming*) des neutrophiles. Ils reconnaissent des produits bactériens ou des molécules endogènes (cytokines, chimiokines, complément).

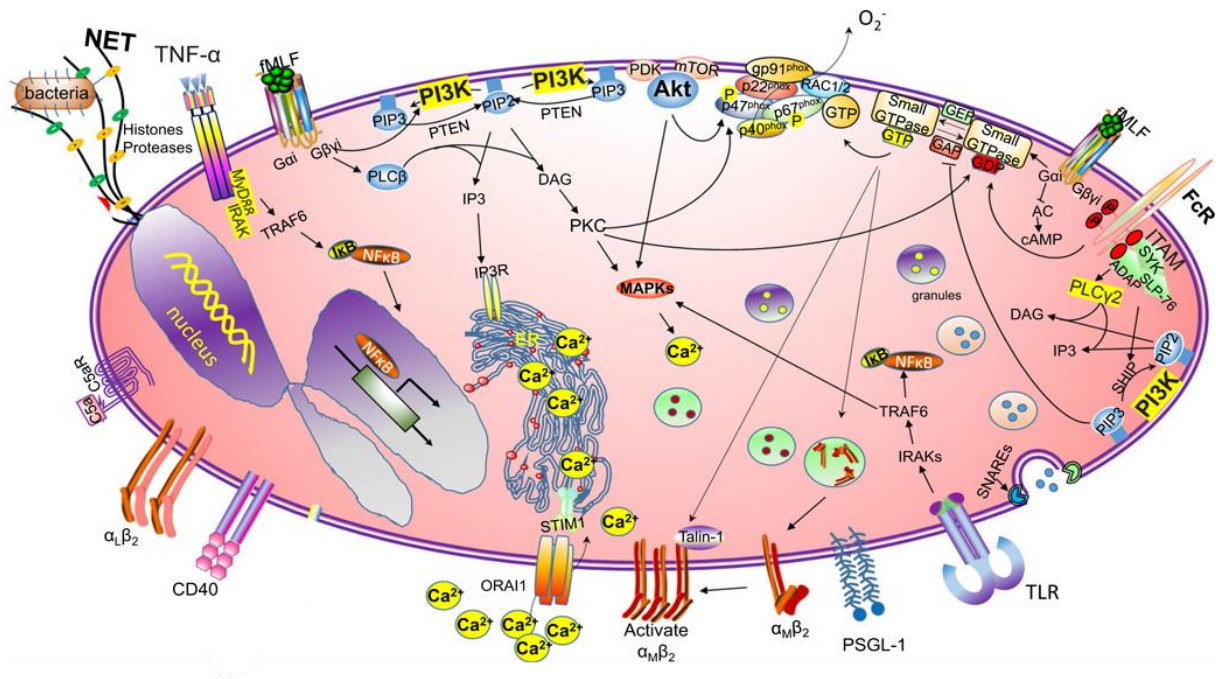


Figure 30 : Les principaux récepteurs exprimés par les neutrophiles et leurs voies de signalisation. La diversité des récepteurs exprimés par les neutrophiles permet la reconnaissance des nombreux stimuli inflammatoires d'origine endogène ou exogène. La liaison d'un ligand à son récepteur met en jeu une voie de signalisation spécifique qui aboutit à l'activation des différents systèmes de défense des neutrophiles (adapté de (Li, Kim et al. 2015)).

III. Recrutement des neutrophiles au site de la réaction inflammatoire

L'extravasation et l'infiltration des leucocytes, et plus particulièrement des neutrophiles, dans les tissus est une étape nécessaire pour une réponse immunitaire efficace. Les personnes atteintes d'un déficit d'adhésion leucocytaire (LAD, *Leukocyte adhesion deficiencies*) présentent des infections fréquentes et sévères engageant le pronostic vital. Cette transmigration endothéliale des neutrophiles (Amulic, Cazalet et al. 2012, Mayadas, Cullere et al. 2014, Nourshargh and Alon 2014, Vestweber 2015) comporte plusieurs étapes (**Figure 31**) :

- 1- La capture des leucocytes (*tethering*)
- 2- L'adhésion faible et réversible (*rolling*) des leucocytes
- 3- L'activation des leucocytes
- 4- L'adhésion stable et irréversible des leucocytes
- 5- La diapédèse trans- ou para-cellulaire des leucocytes

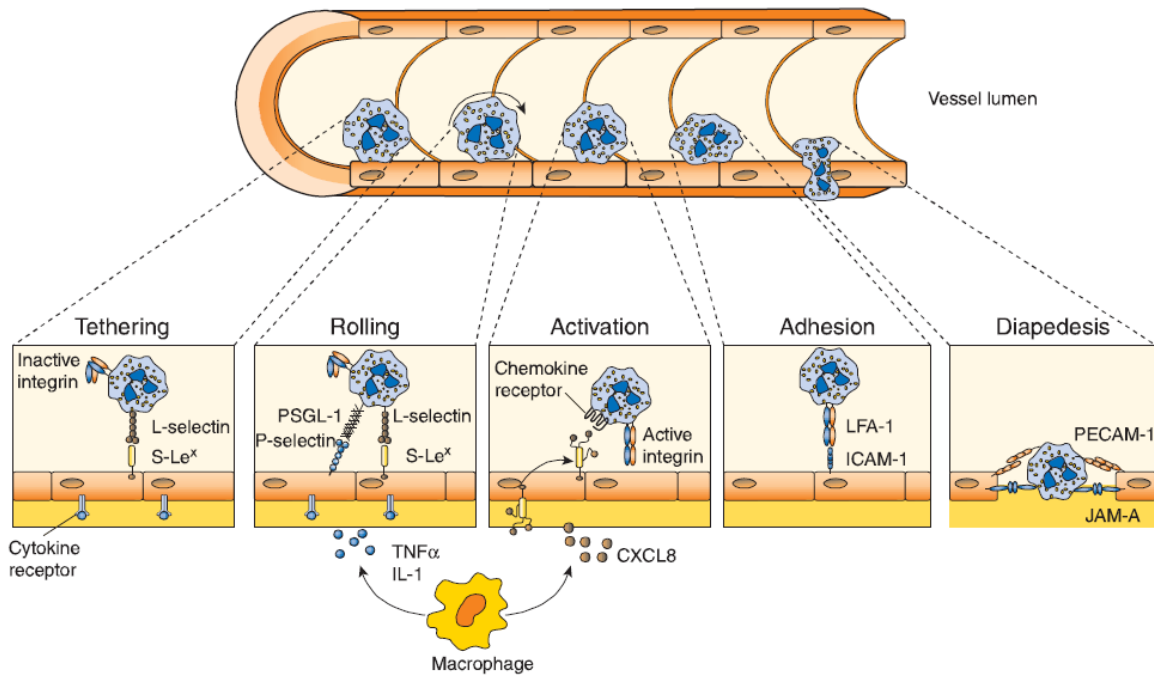


Figure 31 : Les étapes de l'extravasation des neutrophiles après la reconnaissance d'un signal de danger. En réponse à un stimulus inflammatoire, l'activation des cellules endothéliales permet le recrutement des neutrophiles. Pour parvenir à la diapédèse finale par migration paracellulaire ou transcellulaire, les neutrophiles adhèrent de manière instable puis stable aux cellules endothéliales (Paul 2013).

A. Capture et adhésion faible des leucocytes à l'endothélium

Le ralentissement du flux sanguin au niveau des veinules post-capillaires et l'exposition des E- et P-sélectines par les cellules endothéliales suite à leur activation permettent la capture (*tethering*) et l'adhésion réversible (*rolling*) des leucocytes. Les leucocytes expriment constitutivement la glycoprotéine PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*), un ligand des sélectines, ainsi que la L-sélectine. Les sélectines peuvent se lier au motif sialyl Lewis sulfaté (S-Le^x) porté par certaines glycoprotéines leucocytaires et endothéliales (**Tableau 3**). La PSGL-1 est aussi impliquée dans le recrutement d'autres leucocytes par une interaction L-sélectine/PSGL-1 avec des leucocytes déjà adhérents à l'endothélium.

Le déficit LAD de type II se caractérise par une mutation d'un transporteur GDP-fucose situé dans l'appareil de Golgi empêchant la synthèse des motifs S-Le^x ou assimilés. La capture et l'étape de *rolling* des neutrophiles sont alors compromises.

B. Adhésion stable des leucocytes

Cette première association de faible affinité entre les leucocytes et les cellules endothéliales contribue au changement de conformation des intégrines vers une forme de haute affinité pour leur ligand. Ces intégrines sont principalement activées par une signalisation *inside-out* suite à la liaison de chimiokines (CXCL8, ...), de cytokines (TNF- α , ...) ou de molécules exogènes (protéines bactériennes, ...) à leurs récepteurs. Les intégrines dans leur conformation active permettent alors l'adhésion stable et l'étalement des leucocytes sur l'endothélium (**Tableau 3**).

Les principales intégrines leucocytaires sont des intégrines portant une sous-unité $\beta 2$:

- 1- LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1* ou CD11a/CD18 ou $\alpha_L\beta_2$) est exprimée sur tous les leucocytes,
- 2- Mac-1 (*Macrophage-1 antigen* ou CD11b/CD18 ou $\alpha_M\beta_2$ ou CR3) est exprimée par les leucocytes de la lignée myéloïde,
- 3- CR4 (ou CD11c/CD18 ou $\alpha_X\beta_2$) est exprimée par la majorité des leucocytes (uniquement sur les cellules dendritiques chez la souris (Sandor, Lukacs et al. 2016)),
- 4- CD11d/CD18 (ou $\alpha_D\beta_2$) est exprimée par les monocytes, les macrophages et les éosinophiles.

Les récepteurs endothéliaux de ces intégrines sont les glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines ICAM-1 et ICAM-2 (*Intercellular adhesion molecule*).

Une mutation de l'intégrine $\beta 2$ ou d'une protéine de la voie d'activation des intégrines (la kindline-3) sont à l'origine des déficits LAD de type I et III.

Sur les lymphocytes et les monocytes, l'intégrine $\beta 1$ VLA-4 (*Very late antigen 4* ou $\alpha_4\beta_1$) contribue à cette phase d'adhésion grâce à sa liaison à son ligand VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*) sur les cellules endothéliales.

C. Diapédèse des leucocytes

Cette adhésion dépendante des intégrines $\beta 2$ permet aux leucocytes de s'extravaser et de s'infiltrer dans les tissus lésés. Cette extravasation est précédée par une étape de *crawling* pendant laquelle le leucocyte se déplace le long de l'endothélium à la recherche d'un site optimal pour transmigrer. A cette occasion, les leucocytes multiplient les contacts avec les cellules endothéliales par leurs intégrines et spécifiquement par l'interaction Mac-1/ICAM-1 sur les neutrophiles (Phillipson, Heit et al. 2006). Les péricytes, qui sont des cellules de la paroi vasculaire de forme allongée avec de nombreuses extensions

cytoplasmiques, participent également à la diapédèse des leucocytes en facilitant leur infiltration dans les tissus (Proebstl, Voisin et al. 2012, Stark, Eckart et al. 2013).

La diapédèse des leucocytes se fait très majoritairement par voie paracellulaire (70 à 80%), et peu par voie transcellulaire. La voie transcellulaire est principalement utilisée lorsque la densité de jonctions cellulaires entre les cellules endothéliales est élevée (Yang, Froio et al. 2005). Ainsi, le franchissement de la barrière hémato-encéphalique (cerveau et rétine) par les leucocytes se fait en grande partie par cette voie transcellulaire (Ransohoff and Engelhardt 2012, Nourshargh and Alon 2014). Selon le lit vasculaire les mécanismes mis en jeu lors de la diapédèse des leucocytes peuvent donc être différents.

La diapédèse des leucocytes est liée à l'établissement d'interactions homophiles entre les récepteurs JAMs (*Junctional adhesion molecule*), CD31 ou CD99 exprimés par les cellules endothéliales et par les leucocytes. Les intégrines leucocytaires $\beta 2$, en plus d'interagir avec leurs ligands ICAMs, peuvent aussi se lier aux molécules JAMs (Weber, Fraemohs et al. 2007, Woodfin, Voisin et al. 2009, Halai, Whiteford et al. 2014). La déstabilisation de certaines jonctions endothéliales contribue aussi à la transmigration des leucocytes. La VE-cadhérine (*Vascular endothelial cadherin*) est une protéine d'adhésion participant aux jonctions adhérentes des cellules endothéliales par des interactions homophiles. Pendant une réaction inflammatoire, la VE-cadhérine peut être clivée, internalisée et dégradée ou redistribuée au niveau de zones membranaires non impliquées dans les jonctions cellulaires (Schulte, Kuppers et al. 2011, Reglero-Real, Colom et al. 2016).

Etape de l'extravasation	Principaux Récepteurs leucocytaires	Principaux Récepteurs endothéliaux
Capture réversible ou tethering	L-sélectine	S-Le ^x
	PSGL-1	P et E-sélectines
	Intégrine $\beta 1$ (CD29) :	VCAM-1
	VLA-4 (ou $\alpha 4\beta 1$)	
Adhésion	Intégrine $\beta 2$ (CD18) :	
	LFA-1 (ou CD11a/CD18 ou $\alpha L\beta 2$)	ICAM-1 ; ICAM-2
	Mac-1 (ou CD11b/CD18 ou $\alpha M\beta 2$ ou CR3)	ICAM-1 ; ICAM-2
	CR4 (ou CD11c/CD18 ou $\alpha X\beta 2$)	ICAMs ; VCAM-1
	CD11d/CD18 (ou $\alpha D\beta 2$)	ICAM-1 ; VCAM-1
	Intégrine $\beta 1$ (CD29) :	
	VLA-4 (ou $\alpha 4\beta 1$)	VCAM-1
Diapédèse ou transmigration	CD31 (ou PECAM-1)	CD31 (ou PECAM-1)
	JAMs	JAMs
	CD99	CD99
	Mac-1 (ou CD11b/CD18 ou $\alpha M\beta 2$ ou CR3)	JAMs ; ICAMs
	LFA-1 (ou CD11a/CD18 ou $\alpha L\beta 2$)	
	CD11d/CD18 (ou $\alpha D\beta 2$)	ICAM-1 ; VCAM-1

Tableau 3 : Principaux récepteurs leucocytaires et endothéliaux mis en jeu dans l'extravasation des leucocytes. La capture, l'adhésion et la transmigration des leucocytes sont contrôlées par des interactions spécifiques entre les leucocytes et les cellules endothéliales (à partir de (Schulte, Kuppers et al. 2011, Amulic, Cazalet et al. 2012, Mayadas, Cullere et al. 2014, Nourshargh and Alon 2014, Vestweber 2015, Reglero-Real, Colom et al. 2016)).

D. Hétérogénéité des réactions inflammatoires

Les réactions inflammatoires sont hétérogènes et les mécanismes d'infiltration des leucocytes peuvent varier du schéma général présenté ci-dessus, en particulier selon l'organe et/ou le stimulus. En voici une illustration avec les réactions inflammatoires pulmonaires.

Contrairement à la plupart des organes, dans les poumons les leucocytes sont recrutés au niveau des capillaires alvéolaires et non au niveau de veinules post-capillaires (Burns, Smith et al. 2003). Ceci a des conséquences sur les mécanismes de recrutement des leucocytes dans cet organe. Une majorité de capillaires pulmonaires se caractérise par un diamètre (2 à 15 μ m) plus petit que celui des neutrophiles (6 à 8 μ m). Pour y circuler, les neutrophiles changent de forme grâce à un réarrangement de leur cytosquelette. L'étape initiale de capture des neutrophiles dépendante de la L-sélectine puis des intégrines $\beta 2$ n'est pas requise car les neutrophiles sont déjà piégés dans ces capillaires pulmonaires de

faible diamètre (Doerschuk, Beyers et al. 1993, Doerschuk 2001). Cependant ces deux molécules d'adhésion sont nécessaires pour une adhésion prolongée.

L'extravasation des leucocytes s'effectue ensuite selon des mécanismes dépendants ou indépendants des intégrines $\beta 2$ selon le stimulus inflammatoire et selon le modèle (Doerschuk, Winn et al. 1990, Mulligan, Wilson et al. 1993, Kumasaka, Doyle et al. 1996, Qin, Quinlan et al. 1996, Doerschuk 2001). Par exemple chez le lapin, en réponse au LPS de *Escherichia coli* ou au phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) l'extravasation est dépendante des intégrines $\beta 2$. A l'inverse, lors d'une inflammation induite par *Streptococcus pneumoniae* ou par l'acide chlorhydrique (HCl), la diapédèse des neutrophiles est indépendante des intégrines $\beta 2$.

L'indépendance ou non aux intégrines $\beta 2$ dans l'extravasation des neutrophiles suite à une infection avec *E. coli* ou *S. pneumoniae* dans le poumon est corrélée à l'expression de ICAM-1 par les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires murins (Burns, Takei et al. 1994). Cette observation suggère que le phénotype des cellules endothéliales conditionne les voies mises en jeu pour l'extravasation des leucocytes (Doerschuk 2001).

IV. La réaction passive d'Arthus : une réaction inflammatoire stérile

Le principal modèle d'inflammation utilisé *in vivo* dans nos études est une réaction immuno-induite ou réaction passive d'Arthus (rpA) qui conduit à un recrutement et à une infiltration massive des neutrophiles dans les tissus (Lauterbach, O'Donnell et al. 2008). La réaction d'Arthus est une réaction d'hypersensibilité de type III d'après la classification de Gell et Combs datant de 1975. Les réactions d'hypersensibilité sont des stratégies de défense de l'organisme qui, lorsqu'elles ne sont pas contrôlées, sont délétères pour l'hôte (Lotti, Ghersetich et al. 1998, Mayadas, Tsokos et al. 2009). L'hypersensibilité de type III est causée par la formation de complexes immuns dans la circulation générale. Des auto-anticorps, de type immunoglobulines G, sont produits contre un antigène étranger. Les complexes immuns formés se déposent ensuite classiquement au niveau des glomérules rénaux ou au niveau pulmonaire. Cette réaction est dite semi-retardée car la réaction inflammatoire ne se déclenche qu'une fois les complexes immuns constitués. Après la formation des complexes, la voie du complément est activée. Ces réactions se caractérisent par la formation d'un œdème, la libération des médiateurs de l'inflammation (amines vasoactives, cytokines, chimiokines), un afflux de neutrophiles et plus tardivement de saignement (Paul 2013).

La réaction d'Arthus a été décrite comme modèle expérimental pour la première fois par M. Arthus en 1903 (Arthus 1903) suite à l'injection répétée de sérum de cheval chez le lapin comme rapporté dans les comptes rendus de la société de biologie (**Figure 32**). Arthus décrit qu'après une première injection de sérum de cheval chez le lapin dans le péritoine, dans la peau ou dans la circulation par voie intraveineuse, aucune réaction n'est observée. En revanche, lorsque ces injections sont localement

répétées dans la peau à quelques jours d'intervalle, les lapins développent une réaction inflammatoire cutanée. Lorsque la dernière injection est pratiquée par voie intraveineuse, cette réaction est systémique et plus sévère (voire mortelle). Arthus conclut alors que « *le sérum de cheval est toxique pour le lapin anaphyllactisé par et pour le sérum de cheval* ».

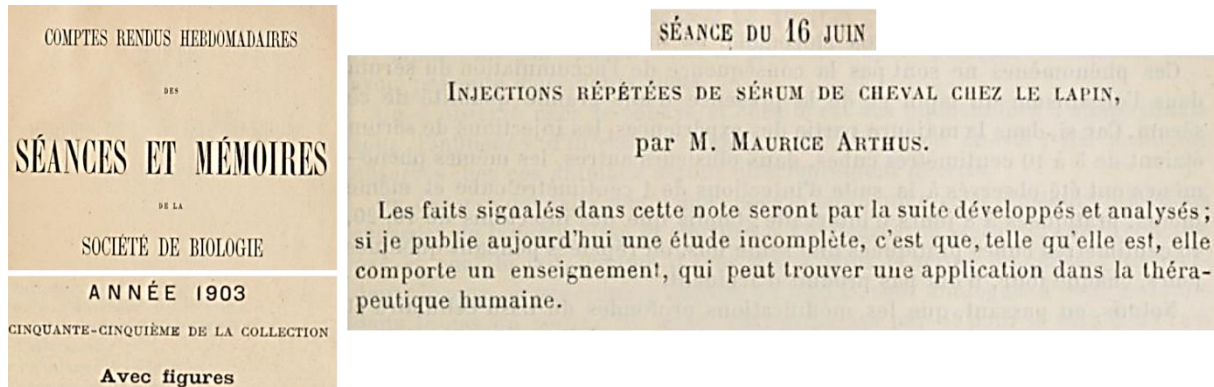


Figure 32 : Extrait des comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la société de biologie de l'année 1903. Extrait du compte rendu publié par M. Arthus décrivant son expérience (Arthus 1903).

La réaction passive d'Arthus (ou réaction immuno-induite) est plus communément utilisée comme modèle. Elle consiste à injecter l'antigène par voie intraveineuse dans la circulation et l'anticorps localement, évitant ainsi l'étape d'immunisation des animaux. Dès 1994, le rôle du récepteur Fc γ a été montré dans la formation de l'œdème, l'infiltration des neutrophiles et la survenue des hémorragies inflammatoires (Sylvestre and Ravetch 1994, Hazenbos, Gessner et al. 1996). Cette réaction est aussi dépendante de l'activation de la voie classique du complément, via la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-9 et la production des anaphylatoxines C3a et C5a. Des études ont aussi montré le rôle majeur de l'interaction C5-C5aR dans l'inflammation induite par complexes immuns (Heller, Hennecke et al. 1999, Baumann, Köhl et al. 2000).

V. Résolution de la phase inflammatoire

La réaction inflammatoire est un processus nécessaire pour l'intégrité de l'hôte mais cette réponse doit être limitée dans le temps et correctement régulée. Dans le cas contraire, la réaction aiguë devient chronique et mène à des pathologies dites inflammatoires chez l'hôte.

La résolution de l'inflammation conduit à un retour aux conditions homéostatiques après l'élimination du pathogène (**Figure 33**). Longtemps considérée comme un processus passif, on sait maintenant qu'il s'agit d'une étape complexe et régulée. Les études portant sur la résolution des réactions inflammatoires montrent qu'elle est déterminée dès la phase aiguë de la réaction

inflammatoire. Une fois l'agent à l'origine de la réaction éliminé, la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires est suspendue et les granulocytes contrôlent la conversion des prostaglandines et leucotriènes en lipoxines. Ceci entraîne l'arrêt du recrutement des leucocytes et de la formation de l'œdème. Alors que les métabolites pro-inflammatoires sont catabolisés, les cellules inflammatoires (neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes...) sont progressivement éliminées soit par nécrose ou apoptose soit par efferocytose, c'est-à-dire phagocytées par des macrophages. Ce processus est associé à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β . Ces macrophages sont ensuite éliminés du site par les vaisseaux lymphatiques et plus rarement par apoptose. Les lipides semblent coordonner l'ensemble de ce processus de résolution (Serhan and Savill 2005). Récemment, une phase de post-résolution a été décrite. Elle se caractérise par l'arrivée d'une seconde vague de leucocytes et plus spécifiquement de macrophages ou de lymphocytes T qui résident dans le tissu quelques semaines. Aucun neutrophile n'est observé à cette phase. Il est proposé que ces cellules soient impliquées dans la mise en place de l'immunité adaptative et de la mémoire immunitaire (Fullerton and Gilroy 2016).

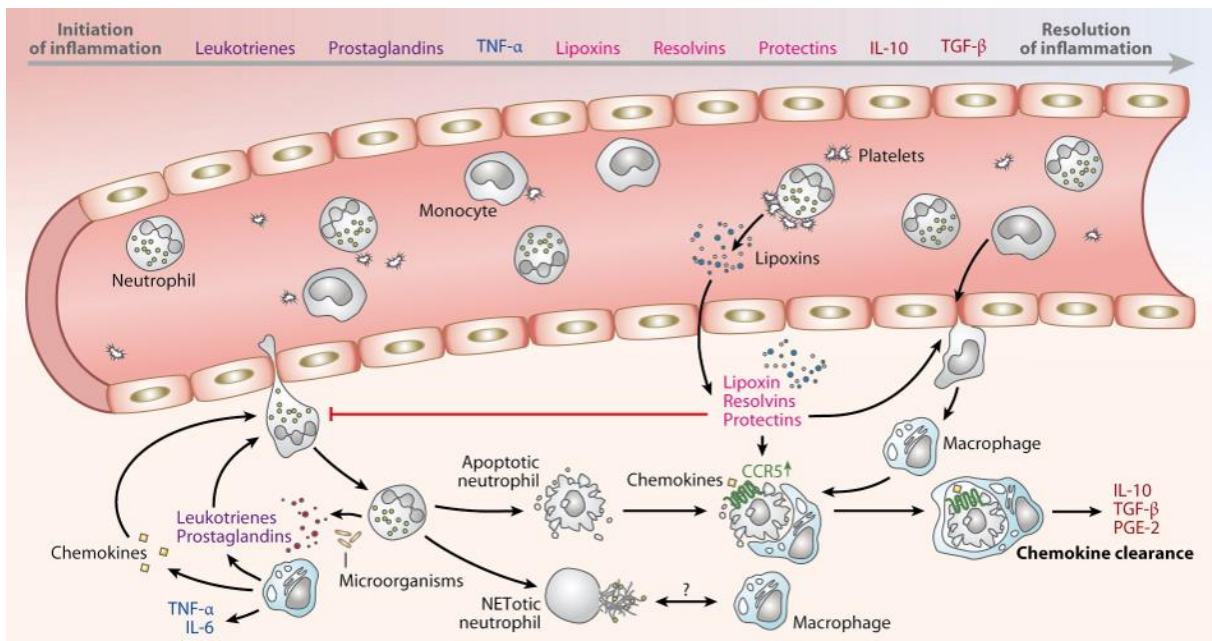


Figure 33 : La résolution de l'inflammation est un processus actif. Pendant une réaction inflammatoire, les cellules immunitaires résidentes (macrophages) sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, médiateurs lipidiques) favorisant l'infiltration des neutrophiles. Au cours de la réaction, des médiateurs lipidiques avec des propriétés anti-inflammatoires (lipoxines, résolvines, protectines) sont synthétisés, inhibant le recrutement des neutrophiles. La phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages est associée à la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (TGF- β , IL-10) et de prostaglandines E2 (PGE2) (Amulic, Cazalet et al. 2012).

Réactions inflammatoires, Immunité, Plaquettes et Vaisseaux

Chez les invertébrés, hémostasie et protection antibactérienne sont assurées par un seul type cellulaire, les hémocytes, qui circulent dans l'hémolymphe comme chez les arthropodes. Ces cellules s'agrègent en cas de blessure et en réponse aux lipopolysaccharides (LPS), ce qui en fait une caractéristique commune avec les plaquettes des vertébrés. Chez les vertébrés, la spécialisation cellulaire a conduit à la formation d'un système immunitaire distinct du système hémostatique, observable chez les poissons, les oiseaux et les amphibiens puis chez les mammifères et donc chez l'Homme (**Figure 34**). Les plaquettes conservent cependant un rôle dans l'immunité chez les mammifères (Weyrich, Lindemann et al. 2003).

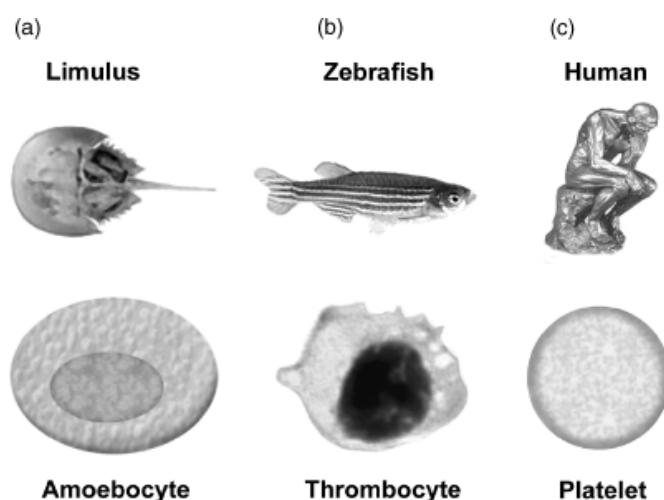


Figure 34 : Evolution du système hémostatique : des invertébrés aux mammifères. De l'hémocyte chez les arthropodes (a) assurant les fonctions hémostatiques et immunitaires au thrombocyte nucléé chez les poissons (b) et à la plaquette chez l'Homme (c) qui possède essentiellement un rôle hémostatique et conserve un rôle dans l'immunité innée (Weyrich, Lindemann et al. 2003).

I. Les plaquettes : des caractéristiques partagées avec les cellules immunitaires

A. Des récepteurs

Les plaquettes ont à leur surface de nombreux récepteurs qui peuvent interagir soit avec des agents pathogènes tels que les bactéries, les virus ou les champignons soit avec les cellules du système immunitaire (Semple, Italiano et al. 2011, Rondina and Garraud 2014). Ces récepteurs peuvent être

impliqués dans l'hémostase et/ou être des récepteurs spécifiques de l'immunité et classiquement exprimés par les leucocytes.

En plus d'exprimer le récepteur de faible affinité aux immunoglobulines G, Fc γ RIIA, comme exposé dans la première partie de cette introduction, les *toll-like receptors* (TLRs) font partie des premiers récepteurs de l'immunité décrits sur les plaquettes bien que leur expression plaquettaire ait tout d'abord été contestée (Montrucchio, Bosco et al. 2003). Différentes études ont depuis montré que plusieurs *toll-like receptors* (TRL1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR9) sont exprimés par les plaquettes (Rondina and Garraud 2014). Les TLR 3 (Anabel, Eduardo et al. 2014) et TLR7 (Koupenova, Vitseva et al. 2014) ont été plus récemment mis en évidence sur les plaquettes.

Les plaquettes expriment également des récepteurs spécifiques du complément comme C1qRp qui lie la fraction C1 du complément. Cette fraction peut aussi être reconnue par l'intégrine $\alpha_2\beta_1$. De plus, la fraction C3b se lie à la P-sélectine (Nurden 2011, Speth, Rambach et al. 2015). Ainsi, les plaquettes participent à la fois à l'activation du système du complément, de par les facteurs présents dans leurs granules comme les fractions C8 et C9, en même temps qu'elles en sont la cible (Del Conde, Cruz et al. 2005).

B. Des facteurs immunomodulateurs

En plus de posséder des récepteurs spécifiques du système immunitaire, les plaquettes peuvent sécréter des facteurs immunomodulateurs majoritairement contenus dans leurs granules. Parmi ces facteurs, on trouve de nombreuses chimiokines et cytokines (encore appelées kinocidines α/β) dont les principales sont le facteur plaquettaire 4 (PF4 ou CXCL4), RANTES (*Regulated on activation normal T cell expressed and secreted* ou CCL5), la β -thromboglobuline (ou CXCL7), SDF-1 α (*Stromal cell-derived factor 1 α* ou CXCL12), MIP-1 α (*Macrophage inflammatory protein 1 α* ou CCL3), GRO- α (*Growth related oncogene α* ou CXCL1), l'interleukine-1 β et l'interleukine-8 (ou CXCL8) (Karshovska, Weber et al. 2013, Stocker, Ishikawa-Ankerhold et al. 2017).

Un autre facteur d'importance dans les réactions immunitaires présent dans les granules plaquettaires est le CD40L (ou CD154). 95% du CD40L soluble (sCD40L) présent dans le plasma a une origine plaquettaire (Henn, Slupsky et al. 1998, Andre, Nannizzi-Alaimo et al. 2002). Le CD40L est en particulier impliqué dans les synapses immunologiques avec les lymphocytes B. Le clivage protéolytique de CD40L par une métalloprotéase, qui pourrait être MMP9, résulte en la libération de sCD40L qui peut agir de manière paracrine et autocrine sur les plaquettes qui expriment également son récepteur CD40.

Les plaquettes contiennent également des facteurs solubles bactéricides (thrombocidines) mis en évidence pour la première fois en 1887 par Fodor avec la détection d'une sécrétion de la β -lysine par les

plaquettes (Yeaman 2014). Les β -défensines 1, 2 et 3 peuvent aussi être sécrétées en réponse, par exemple, à une exposition à *Staphylococcus aureus* (Hamzeh-Cognasse, Damien et al. 2015).

D'autres médiateurs solubles sont contenus dans les plaquettes et interviennent lors des réactions inflammatoires. Dans les granules alpha, on trouve les facteurs de croissance PDGF (*Platelet-derived growth factor*), TGF- β (*Transforming growth factor β*), ou VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), l'angiopoïétine 1 (Thurston, Rudge et al. 2000, Li, Huang et al. 2001), les métalloprotéases MMP2 et MMP9 (Seizer and May 2013). Dans les granules denses, la sérotonine (Shepro, Welles et al. 1984), le glutamate, les polyphosphates, l'ADP ou encore l'histamine (Masini, Di Bello et al. 1994) sont capables de moduler les réactions inflammatoires (Morrell, Aggrey et al. 2014). Le PAF (*Platelet-activating factor*) (Kulkarni, Woollard et al. 2007), le thromboxane A2 et la sphingosine-1-phosphate (Igarashi and Yatomi 1998, Gazit, Mariko et al. 2016) sont aussi des médiateurs inflammatoires présents dans les plaquettes.

C. Production d'espèces réactives de l'oxygène

Les plaquettes expriment NOX1 et NOX2 (Carrim, Arthur et al. 2015) et ont la capacité de générer des espèces réactives de l'oxygène. Dans les plaquettes, ces ROS participent à la signalisation en aval de la glycoprotéine VI et de Fc γ RIIA (Arthur, Qiao et al. 2012). La stimulation simultanée des récepteurs GPIIb α et PAR4 par la thrombine chez l'humain conduit aussi à la production de ROS (Carrim, Arthur et al. 2015). Cependant, l'impact de cette production plaquettaire de ROS n'a pas encore été évalué dans les réactions immunitaires.

D. Plaquettes et microparticules

En situation inflammatoire comme en cas de forte activation, les plaquettes produisent des microparticules de 100 nm à 1 μ m de diamètre. La présence de protéines adhésives et de lipides pro-coagulants à leur surface, ainsi que leur contenu en médiateurs solubles en font des facteurs pro-thrombotiques et pro-inflammatoires.

Les microparticules plaquettaires représentent la majorité des microparticules circulantes (Burnier, Fontana et al. 2009). Dans l'arthrite rhumatoïde, des microparticules plaquettaires ont été identifiées dans le liquide synovial de patients. Ces microparticules sont riches en interleukine-1 (IL-1) et favorisent la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8) par les fibroblastes synoviaux (Boilard, Nigrovic et al. 2010). Dans le sepsis, des études mettent en évidence la présence de CD40L ou d'interleukine-1 associés aux microparticules d'origine plaquettaire posant la question de leur rôle dans le développement de la réaction inflammatoire : cause ou conséquence ? (Hamzeh-Cognasse, Damien et al. 2015).

Les fonctions dans la réponse inflammatoire de ces médiateurs solubles et récepteurs plaquettaires, dont la liste n'est pas exhaustive, seront illustrées par la suite.

E. Plaquettes et pathogènes

Selon la nature du micro-organisme, différents récepteurs plaquettaires peuvent interagir avec ce pathogène (Assinger 2014).

Par exemple, de nombreux virus (**Figure 35**) sont reconnus par les plaquettes par :

- Des récepteurs de l'hémostase tels que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), GPVI
- Des récepteurs spécifiques de l'immunité comme le récepteur du complément CR2
- Des récepteurs spécifiques de certains virus comme le récepteur de l'adénovirus Coxsackie (CAR) et celui de la dengue (DV)
- Des récepteurs de chimiokines comme CXCR4
- Des *Toll-like receptors* (TLRs)
- Indirectement par le récepteur des immunoglobulines G Fc γ RIIA après opsonisation des virus par des IgGs

Les bactéries sont aussi reconnues par de nombreux récepteurs plaquettaires. Des bactéries de type staphylocoque (*Staphylococcus aureus*), pseudomonas (*Pseudomonas aeruginosa*), helicobacter (*Helicobacter pylori*) ont été décrites comme interagissant avec les plaquettes via les intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, la glycoprotéine GPIb ou les TLRs. Ces interactions peuvent se faire directement ou par l'intermédiaire d'une protéine adhésive comme le fibrinogène ou le facteur von Willebrand. Les récepteurs du complément exprimés par les plaquettes favorisent également ces interactions entre les plaquettes et les bactéries après activation de la cascade du complément. Les plaquettes peuvent aussi interagir avec les bactéries via les toxines qu'elles produisent. C'est ainsi que la gingipaïne, toxine sécrétée par *Porphyromonas gingivalis*, active le récepteur PAR1 (*Protease-activator receptor*) (Hamzeh-Cognasse, Damien et al. 2015).

De plus, les plaquettes sont capables d'internaliser les virus ou les bactéries comme le montre l'observation par microscopie électronique du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et de *Staphylococcus aureus* au sein des plaquettes (Youssefian, Drouin et al. 2002). Les plaquettes peuvent donc agir comme des cellules phagocytaires. Cette phagocytose n'est néanmoins pas synonyme de destruction de la bactérie. En effet, ce mécanisme pourrait aussi bien permettre au micro-organisme d'échapper au système immunitaire que de permettre sa destruction par fusion de l'endosome avec les granules alpha.

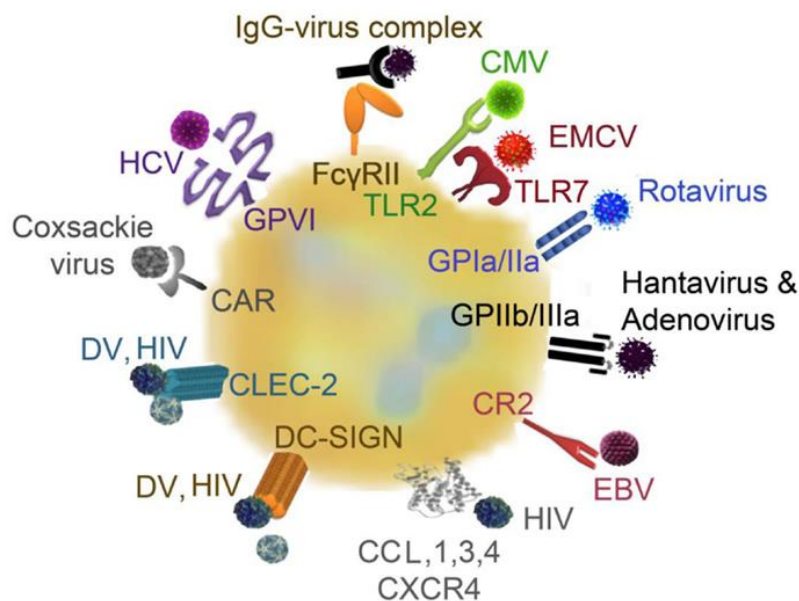


Figure 35 : Schéma des récepteurs plaquettaire mis en jeu dans les interactions avec les virus. De nombreux virus peuvent se lier aux plaquettes par l'intermédiaire de récepteurs avec une fonction hémostatique et/ou immunitaire. CAR, Coxsackie-adenovirus receptor; CLEC-2, C-type lectin domain family 2; CCL, chemokine (C-C motif) ligand; CMV, cytomegalovirus; CR, complement receptor; CXCR4, C-X-C chemokine receptor type 4; EBV, Epstein-Barr virus; EMCV, encephalomyocarditis virus; DC-SIGN, dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grapping non-integrin; DV, Dengue virus; FcγRII, Fc receptor γ II; GP, glycoprotein; HCV, hepatitis virus C; HIV, human immunodeficient virus; IgG, immunoglobulin G; TLR, toll-like receptor (Assinger 2014).

II. Les plaquettes participent à toutes les étapes des réactions inflammatoires

Les plaquettes participent à la réponse immunitaire et plus particulièrement à la réponse inflammatoire ; elles interviennent à toutes les étapes de la réaction inflammatoire (Semple, Italiano et al. 2011). Elles interagissent avec tous les acteurs de celle-ci, de la cellule endothéliale aux leucocytes. Les plaquettes sont en effet recrutées à l'endothélium dès les temps précoces de la réaction. Après une étape de *rolling*, les plaquettes adhèrent de façon précoce à l'endothélium des veinules post-capillaires et de ses jonctions. Cette étape est indépendante d'un processus hémostatique puisque les plaquettes individualisées adhèrent à un endothélium non discontinu et avant la survenue de saignement. Ce recrutement est indépendant de la formation d'un thrombus (**Figure 36**). Les récepteurs plaquettaire et/ou endothéliaux ou leucocytaires mis en jeu dans le recrutement à la paroi sont différents selon le modèle physiopathologique. Une autre caractéristique du recrutement plaquettaire est qu'il peut être dépendant des leucocytes et en particulier des neutrophiles comme le montre la réduction de l'adhésion

des plaquettes à l'endothélium après une déplétion des neutrophiles (Clark, Ma et al. 2007, Devi, Kuligowski et al. 2010) ou l'inhibition de certains de leurs récepteurs d'adhésion comme PSGL-1 (Cooper, Chitman et al. 2003, Ishikawa, Cooper et al. 2004), ICAM-1 (Devi, Kuligowski et al. 2010) ou ESL-1 (*E-selectine ligand 1*) (Hidalgo, Chang et al. 2009).

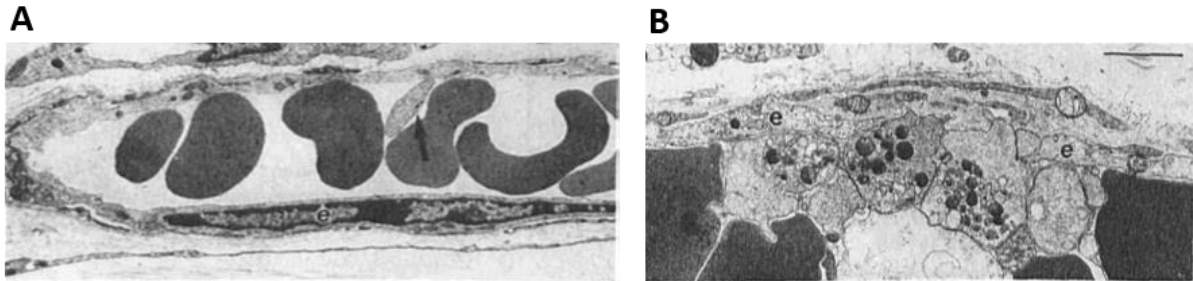


Figure 36 : Observation en microscopie électronique du recrutement des plaquettes avant (A) et lors (B) d'une dermatite irritante chez la souris. Dans une veinule post-capillaire, aucune plaquette n'est observée avant la réaction tandis que 4 heures après le début de la dermatite, des plaquettes encore individualisées adhèrent à un endothélium continu (e) (Senaldi and Piguet 1997).

Les plaquettes sont ainsi présentes au site de la réaction inflammatoire et régulent la perméabilité endothéliale, le recrutement des leucocytes et leurs fonctions effectrices. Elles sont également indispensables à la prévention des saignements inflammatoires.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de rédiger une revue sur les fonctions plaquettaires dans les réactions inflammatoires. Cette revue détaille les fonctions des plaquettes dans :

A. Le recrutement des plaquettes à l'endothélium

B. La perméabilité endothéliale

C. L'infiltration des leucocytes

D. La régulation des activités des neutrophiles et monocytes



Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair

Angèle Gros^{1,2†}, Véronique Ollivier^{1,2†} and Benoît Ho-Tin-Noé^{1,2*}

¹ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

² Unit 1148, Laboratory for Vascular Translational Science, INSERM, Paris, France

Edited by:

Olivier Garraud, Institut National de la Transfusion Sanguine, France

Reviewed by:

Daniel Duerschmied, University of Freiburg, Germany

Steve P. Watson, University of Birmingham, UK

*Correspondence:

Benoît Ho-Tin-Noé, Unit 1148, INSERM, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, Paris Cedex 18 75877, France

e-mail: benoit.ho-tin-noe@inserm.fr

[†] Angèle Gros and Véronique Ollivier have contributed equally to this work.

There is now a large body of evidence that platelets are central actors of inflammatory reactions. Indeed, platelets play a significant role in a variety of inflammatory diseases. These diseases include conditions as varied as atherosclerosis, arthritis, dermatitis, glomerulonephritis, or acute lung injury. In this context, one can note that inflammation is a convenient but imprecise catch-all term that is used to cover a wide range of situations. Therefore, when discussing the role of platelets in inflammation, it is important to clearly define the pathophysiological context and the exact stage of the reaction. Inflammatory reactions are indeed multistep processes that can be either acute or chronic, and their sequence can vary greatly depending on the situation and organ concerned. Here, we focus on how platelets contribute to inflammatory reactions involving recruitment of neutrophils and/or macrophages. Specifically, we review past and recent data showing that platelets intervene at various stages of these reactions to regulate parameters such as endothelial permeability, the recruitment of neutrophils and macrophages and their effector functions, as well as inflammatory bleeding. The mechanisms underlying these various modulating effect of platelets are also discussed.

Keywords: neutrophils, platelets, inflammation, monocytes, vascular permeability, bleeding, thrombocytopenia, ITAM

PLATELETS CONTROL ENDOTHELIAL PERMEABILITY AND LEUKOCYTE INFILTRATION

While platelets have long been known to promote the semi-permeable barrier function of the resting endothelium (1), it has become equally clear that under inflammatory conditions, platelets can promote vascular permeability. Indeed, both edema formation and leukocyte infiltration have been shown to be markedly reduced by thrombocytopenia in multiple models of acute or chronic inflammation. For instance, immunodepletion of platelets was shown to inhibit neutrophil extravasation and the efflux of Evans blue from mesenteric venules in a mouse model of thioglycollate-induced peritonitis (2). Thrombocytopenia also resulted in reduced skin edema and infiltration of neutrophils, eosinophils, and mast cells in models of cutaneous leukocytoclastic vasculitis (3) and of chronic contact hypersensitivity (4). These pro-inflammatory effects of platelets were also reported in the inflamed lungs (5–7), the very same organ where the anti-permeability effect of platelets was demonstrated in unchallenged thrombocytopenic animals (8).

Notably, while in the above-cited examples the efflux of leukocytes and plasma were both promoted by platelets, situations where only one of these parameters was impacted by platelet depletion have also been reported. In a mouse model of irritant contact dermatitis, experimental thrombocytopenia led to reduced edema formation without affecting neutrophil infiltration (9). Platelet depletion also resulted in complete abrogation of protein leakage without affecting neutrophil recruitment to the lungs in a model of transfusion-related acute lung injury (7). Concordantly,

thrombocytopenia fully prevented endothelial gap formation and vascular leakage during experimental arthritis but only partially reduced the overall arthritis severity (10). Therefore, although promotion of plasma and leukocyte extravasation by platelets may share common mechanistic aspects, they are clearly distinct parameters with their own distinct regulatory mechanisms. Interestingly, it was recently shown that leukocyte extravasation and vascular permeability can be controlled separately by different tyrosine residues of VE-cadherin (11). Whether such a mechanism contributes to differential regulation of vascular permeability and leukocyte infiltration by platelets remains to be demonstrated but these results suggest that distinct and selective regulation of these two parameters is possible at the endothelial junction level.

Recruitment of platelets to the inflamed vasculature and local release of soluble compounds from activated platelets likely constitute the predominant basic mechanisms common to regulation of both vascular permeability and leukocyte extravasation by platelets. Interactions between platelets and inflamed vessels have been shown to be an early event in various models of acute and chronic inflammation (7, 9, 10, 12–19). Various adhesion receptors can support the early recruitment of platelets to inflamed microvessels and the subsequent actions of platelets on vascular permeability and leukocyte extravasation. The nature of these receptors is highly dependent on the inflammatory context. While platelet P-selectin was crucial for platelet recruitment and leukocyte extravasation in experimental colitis (20), acute lung injury (5), chronic cutaneous hypersensitivity (4), allergic asthma (21), glomerulonephritis (17), and cerebral and intestinal

ischemia/reperfusion (13, 14), it played only a minor role in the recruitment of neutrophils in thioglycollate-induced peritonitis (2). Likewise, GPIb was critical for platelet recruitment and leukocyte invasion at atheromatous lesion-prone sites in hypercholesterolemic mice (12) and during peritonitis (2) but dispensable for early recruitment of platelets to the inflamed glomerulus (19). In addition to P-selectin and GPIb, GPVI, GPIIb–IIIa, CD40L are among the other platelet receptors that have been reported to be involved in platelet recruitment and action on vascular permeability and/or leukocyte recruitment (Table 1).

Remarkably, immunohistological and intravital analyses have revealed that platelet recruitment during the early phase of the inflammatory reaction mostly occurs through transient and firm adhesion of individual platelets to endothelial cells and gaps in the endothelial lining, and/or to adherent leukocytes rather than through platelet aggregation and thrombus formation (7, 9, 10, 12–14, 16, 18–20). Binding of platelets to adherent leukocytes illustrates the fact that while platelets support the recruitment of leukocytes during inflammatory reactions, the opposite is also

true. Inhibition of neutrophil recruitment by immunodepletion of neutrophils or by pharmacological or genetic targeting of their adhesion receptors was indeed shown to induce a reduction in platelet recruitment in various inflammation models (7, 13, 14, 19, 27). It is also noteworthy that interactions between activated platelets and leukocytes do not only occur at the inflammatory site but also in the circulation. The signals triggered by these interactions notably induce integrin activation, thus priming leukocytes for adhesion to inflamed vessels (24, 28). Increased formation of neutrophil/platelet and/or monocyte/platelet complexes has been reported in patients with various inflammatory diseases including rheumatoid and psoriatic arthritis (29–31), allergic asthma (32), perionitis (33), ulcerative colitis (34), ischemic stroke (35), dengue infection (36), and atherosclerosis (37). Considering the contribution of platelet/leukocyte interactions to the pathogenesis of various inflammatory diseases in experimental models, in part, via promotion of neutrophil infiltration, increased platelet/leukocyte complexes in human diseases may not only reflect platelet activation but also participate in disease regulation.

Table 1 | Regulation of vascular permeability and leukocyte recruitment by platelets.

	Inflammatory model	Receptors and/or soluble factors involved	References
Vascular permeability	Arthritis	GPVI /Serotonin	Cloutier et al. (10)
	Peritonitis	GPIb /vWF	Petri et al. (2)
	Leukocytoclastic vasculitis	P-selectin /PSGL1	Hara et al. (3)
	Chronic cutaneous hypersensitivity	ND	Tamagawa-Mineoka et al. (4)
	Acute lung inflammation	P-selectin	Hidalgo et al. (7), Zarbock et al. (5)
Leukocyte recruitment	Glomerulonephritis	P-selectin /PSGL-1	Kuligowski et al. (17)
		P-selectin	Devi et al. (19)
	Atherosclerosis	GPVI /EMMPRIN	Schulz et al. (22)
		CD40L and MCP-1	Lievens et al. (23)
		GPIb , GPIIb/IIIa	Massberg et al. (12)
		P-selectin	Huo et al. (24)
	Cerebral I/R	GPIIb/IIIa	Massberg et al. (15)
		CD40/CD40L/sCD40L	Ishikawa et al. (14)
	Intestinal I/R	P-selectin	Ishikawa et al. (14)
	Abdominal sepsis	Serotonin	Duerschmied et al. (25)
		ND/Mac-1	Asaduzzaman et al. (6)
	Peritonitis	GPIb /vWF	Petri et al. (2)
		Serotonin	Duerschmied et al. (25)
	Experimental colitis	CD40L	Vowinkel et al. (20)
		P-selectin /PSGL-1	Vowinkel et al. (20)
	Aseptic wound	Serotonin	Duerschmied et al. (25)
	Acute Lung inflammation	Serotonin , TXA₂ , P-selectin	Duerschmied et al. (25), Hidalgo et al. (7), Zarbock et al. (5)
Leukocytoclastic vasculitis	P-selectin /PSGL-1	Hara et al. (3)	
Chronic cutaneous hypersensitivity	P-selectin	Tamagawa-Mineoka et al. (4)	
Allergic asthma	P-selectin , Serotonin	Pitchford et al. (21), Durk et al. (26)	

Examples of various inflammatory situations in which platelets were shown to regulate vascular permeability and/or leukocyte recruitment. If identified, the adhesion receptors and/or soluble factors involved are indicated. Platelet-derived factors are underlined.

CD40, cluster of differentiation 40, CD40L, cluster of differentiation 40 ligand, EMMPRIN, extracellular matrix metalloproteinase inducer, Mac-1, macrophage-1 antigen, MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1, ND, non-determined, PAF, platelet-activating factor, PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand 1, sCD40L, soluble cluster of differentiation 40 ligand, TXA₂, thromboxane A₂, VEGF, vascular endothelial growth factor, vWF, von Willebrand factor.

The release of soluble factors by platelets is also central to their ability to modulate endothelial permeability and leukocyte infiltration. In the same way, platelets contain endothelial barrier-enhancing factors [e.g., angiopoietin-1 and sphingosine-1-phosphate (S1P)] (1), they also contain a large range of chemokines, cytokines, and other soluble mediators capable of loosening endothelial junctions and/or of activating or attracting leukocytes. Among the platelet factors that can open interendothelial junctions are factors that are not specific to platelets such as vascular endothelial growth factor (38) or platelet-activating factor (PAF) (39, 40), and serotonin, for which platelets are the major peripheral source (41). In particular, platelet serotonin was recently shown to mediate the GPVI-dependent pro-permeability effect of platelets in inflamed joints during arthritis (10) and the recruitment of neutrophils and/or eosinophils in various models of acute inflammation (25, 26).

The panel of chemokines found in platelets is extensive and includes platelet factor 4, stromal cell-derived factor-1, macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), and thymus and activation-regulated chemokine (TARC), to name but a few (4, 24, 42). Like P-selectin, these chemokines are stored in platelet granules and their contribution to recruitment of leukocytes by platelets highlights the need for platelet activation in this process. In agreement, ADP-dependent platelet activation was required for glomerular recruitment of leukocytes by platelets (19). Moreover, while some platelet-derived soluble factors directly target endothelial cells and/or leukocytes, others like PAF, S1P, and serotonin also target platelets themselves and could therefore amplify their regulatory effects on vascular permeability and/or leukocyte recruitment. Finally, another mechanism reported for the stimulation of neutrophil recruitment by activated platelets is the up-regulation of the expression of adhesion molecules on the endothelium. Activated platelets were shown to increase the expression of ICAM-1 and α v β 3 on endothelial cells through the secretion of IL-1 β (43), and to induce the secretion of Weibel-Palade bodies (44). Importantly, together, these observations that platelets can engage their adhesion receptors and release bioactive factors independently of aggregation substantiate the concept that platelet activation is a finely tuned and graduated process that allows context-dependent responses (27, 45–48).

PLATELETS REGULATE NEUTROPHIL AND MACROPHAGE EFFECTOR FUNCTIONS

Many studies have demonstrated the ability of platelets to regulate most of the effector functions of neutrophils and macrophages such as the production of reactive oxygen species (ROS), the secretion of neutrophil granule content, phagocytosis, or the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). Thrombin-activated platelets were shown to stimulate the respiratory burst in unstimulated monocytes and neutrophils *in vitro* (49–51). Zalavary et al. showed that resting platelets enhanced the respiratory burst of neutrophils stimulated with IgG-opsonized yeast particles (52). However, the opposite effect was found when the chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine was used as an agonist (53–56). The fact that the pro- or anti-ROS effect of platelets depends on experimental conditions such as

the platelet and neutrophil agonists used again highlights how the action of platelets may ultimately be context-dependent. Several non-mutually exclusive mechanisms have been proposed to support the modulation of the oxidative burst in innate immune cells by platelets. The release of adenine nucleotide derivatives by platelets has been consistently shown to inhibit ROS generation in neutrophils (49, 53, 54). Evidence that direct cell–cell contact between platelets and monocytes/neutrophils is also important for regulation of the oxidative burst in these cells has also been provided. Prevention of platelet adhesion to neutrophils was indeed shown to suppress the modulatory effect exerted by platelets on ROS generation by neutrophils, whether it was stimulatory (50, 51, 54, 57, 58) or inhibitory (58). *In vivo* data on the actual contribution of platelets to modulation of ROS generation by innate immune cells during inflammatory reactions are, however, scarce. Nevertheless, binding of platelets to adherent neutrophils induced the generation of ROS by neutrophils in a mouse model of transfusion-related acute lung injury (7), a mechanism that might contribute to vascular damage and lung injury. Stimulation of the neutrophil respiratory burst by platelets was also proposed to contribute to proteinuria during immune-complex-induced experimental glomerulonephritis (51), as ROS were previously shown to be one of the main causes of glomerular damage in this model (59).

Several *in vitro* studies have shown that platelets can inhibit the release of myeloperoxidase and neutrophil elastase (57, 60). In contrast, platelets amplified lysozyme secretion by neutrophils stimulated with opsonized zymosan (61, 62). It is likely that as for ROS generation and endothelial permeability, platelets regulate neutrophil degranulation in a stimulus-specific manner. Some groups have demonstrated that in addition to regulating neutrophil degranulation and ROS production, platelets can also stimulate neutrophil phagocytosis by both contact-dependent and contact-independent mechanisms (52, 57). More recently, it was shown that the uptake of oxidized low-density lipoproteins (OxLDL) by monocytes was increased by direct platelet–monocyte interactions *in vitro* and *in vivo* (63). These findings partly echoed those of previous studies with the difference that the earlier studies focused on the ability of platelet secretion products to enhance macrophage uptake of OxLDL (64–66).

The production and release of cytokines by monocytes can also be regulated by platelets. Thrombin-activated platelets were shown to induce expression and secretion of MCP-1 and IL-8 by monocytes in a P-selectin-dependent manner (67). The contribution of P-selectin-mediated platelet–monocyte interactions to cytokine responses was recently investigated in patients with dengue infection. Whereas P-selectin-dependent binding of platelets from patients with dengue to monocytes from healthy volunteers induced the secretion of the IL-1 β , IL-8, IL-10, and MCP-1, platelets from healthy volunteers only induced the secretion of MCP-1 (36). Modulation of cytokine levels by platelets was also reported in the cecal ligation and puncture mouse model of sepsis, a model in which deficiency in platelet GPIIb α led to reduced platelet–monocyte and platelet–neutrophil interactions, and to increased circulating levels of TNF- α , MCP-1, IL-6, and MIP-1 β (68). A substantial contribution of platelets to the regulation of systemic inflammatory responses was also shown in

a model of pneumonia-derived sepsis (69) and in a model of thermal injury (70). In this latter model, plasma levels of TNF- α , IL-6, and MCP-1 were increased in thrombocytopenic mice, which also displayed reduced levels of TGF- β compared to control mice. In line with these studies, it was shown that secretion of PDGF by activated platelets was required for the release of MCP-1 and subsequent monocyte infiltration and killing in tissues infected with *Leishmania* parasites (71). It should be noted that thrombocytopenia led to a higher mortality rate in sepsis and thermal injury, and to reduced elimination of *Leishmania* parasites, thus demonstrating an overall beneficial role of platelets in these models. Thrombocytopenia also increased the mortality of mice infected with encephalomyocarditis virus, a situation in which platelet-TLR7-dependent formation of platelet–neutrophil aggregates played a protective role (72). These various examples where platelets exerted a beneficial effect under inflammatory conditions in some way balance those where platelets were shown to play a pathogenic role, as in glomerulonephritis (51), acute lung injury (5), atherosclerosis (12, 15), and rheumatoid arthritis (10, 73).

Neutrophil extracellular traps are extracellular webs made of DNA fibers decorated with neutrophil granule proteins that form according to a specific cell death process (74, 75). The contribution of platelets to NET formation was first demonstrated by a series of experiments showing that TLR4- and integrin-dependent platelet–neutrophil interactions led to the production of NETs capable of trapping bacteria and also causing tissue damage in models of endotoxemia and sepsis (27, 76). Stimulation of NET formation by platelets has since been shown in models of sterile acute lung injury where NETs contribute to lung endothelial damage (77, 78). Importantly, while platelets stimulate NET formation, in return, NETs cause platelet activation and aggregation, thus linking inflammation and thrombosis (79). This form of thrombosis triggered by neutrophil–platelet interactions has been called immunothrombosis and helps fight bacterial infection (80, 81). The downside of immunothrombosis is that it can also initiate deep vein thrombosis (82, 83) and contribute to cancer-associated thrombosis (84). Finally, immunothrombosis illustrates how interactions between platelets and leukocytes lead to reciprocal regulation, a notion previously introduced by earlier *in vitro* studies showing the modulation of platelet reactivity and adhesion properties by neutrophils and/or macrophages (48, 85–89).

PLATELETS PREVENT INFLAMMATORY BLEEDING

Inflammatory reactions have been identified as a cause of spontaneous bleeding during thrombocytopenia, thus demonstrating that platelets also intervene to prevent bleeding during inflammation. This protective role of platelets was notably established in situations where platelets were also shown to promote vascular permeability and/or leukocyte infiltration. For example, induction of thrombocytopenia resulted in immediate and severe skin bleeding during cutaneous leukocytoclastic vasculitis (90), the same model in which it caused reduced skin edema and neutrophil infiltration (3). Again, this highlights the duality of platelets that can exert apparently opposed effects during the course of a given inflammatory reaction. Nonetheless, though regulation of plasma leakage and prevention of bleeding can both be referred to as maintenance of vascular integrity, the mechanisms underlying edema

formation and bleeding are essentially different. Opening of intercellular junctions favors edema formation by allowing plasma fluid and small molecules to filter out through endothelial gaps and the basement membrane. Larger elements like platelets and red blood cells are, however, retained by the vascular wall (91). For this reason, injection of the pro-permeability factor vascular endothelial growth factor (VEGF) did not cause any skin bleeding when injected in thrombocytopenic mice (92). In a similar manner, mice lacking the anti-permeability factor, S1P, in plasma exhibited basal vascular leakage of proteins and fluid in the lungs, but no bleeding (93). Therefore, while vascular permeability is tightly regulated and controlled through modulation of endothelial junctions bleeding implies vascular damage with rupture or distortion of the basement membrane mesh. There is strong evidence suggesting that neutrophils may cause this damage: in various inflammatory models, bleeding in inflamed organs of thrombocytopenic mice was prevented by depletion of neutrophils (18, 92). Prevention of inflammatory bleeding by platelets most likely relies on the inhibition or repair of neutrophil-dependent injury. Although this is unlikely to provide the full explanation, this vasculoprotective action of platelets has been shown to be independent of their ability to form thrombi. Indeed, it has been reported that platelet interactions with inflamed microvessels occur before any sign of thrombosis, and that prevention of this early initial platelet deposition results in accelerated and exacerbated local hemorrhage (18, 90). Moreover, mice lacking platelet adhesion receptors required for thrombus formation or with impaired G-protein coupled receptor (GPCR) signaling in platelets have shown no bleeding at sites of inflammation despite their compromised ability to form platelet plugs and to ensure classical hemostasis (90, 94). A recent study indicates that instead, the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-associated GPVI and C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2) play a predominant role in the prevention of inflammatory bleeding by platelets (94, 95). Given that GPVI is the main platelet receptor for collagen, this suggests that platelets could stop bleeding by covering small areas where the basement membrane gets exposed and disrupted by recruited neutrophils. Whereas non-aggregated adherent platelets could exert a purely mechanical action by plugging small holes in the endothelial lining, recent results suggest that the release of soluble factors by platelets could further help seal vessel lesions induced by neutrophils. We have shown that even when not causing aggregation, engagement of GPVI by collagen leads to the release of soluble platelet factors capable of tightening interendothelial junctions such as angiopoietin-1 (48). Furthermore, platelets lacking the adapter protein SLP-76, which mediates GPVI-dependent platelet responses to collagen including degranulation and spreading, were shown to be unable to prevent inflammatory bleeding (94). Also, although absence of S1P is not in itself a cause of bleeding, it was shown to sensitize peripheral lymph nodes to bleeding in a mouse model of immunization characterized by high lymphocyte trafficking (95). Whether this protective role of S1P and, more specifically, of platelet S1P also applies to other inflammatory models remains to be verified but in any case, results from this study indicate that factors stimulating closure of interendothelial junctions can help stop bleeding associated with leukocyte trafficking.

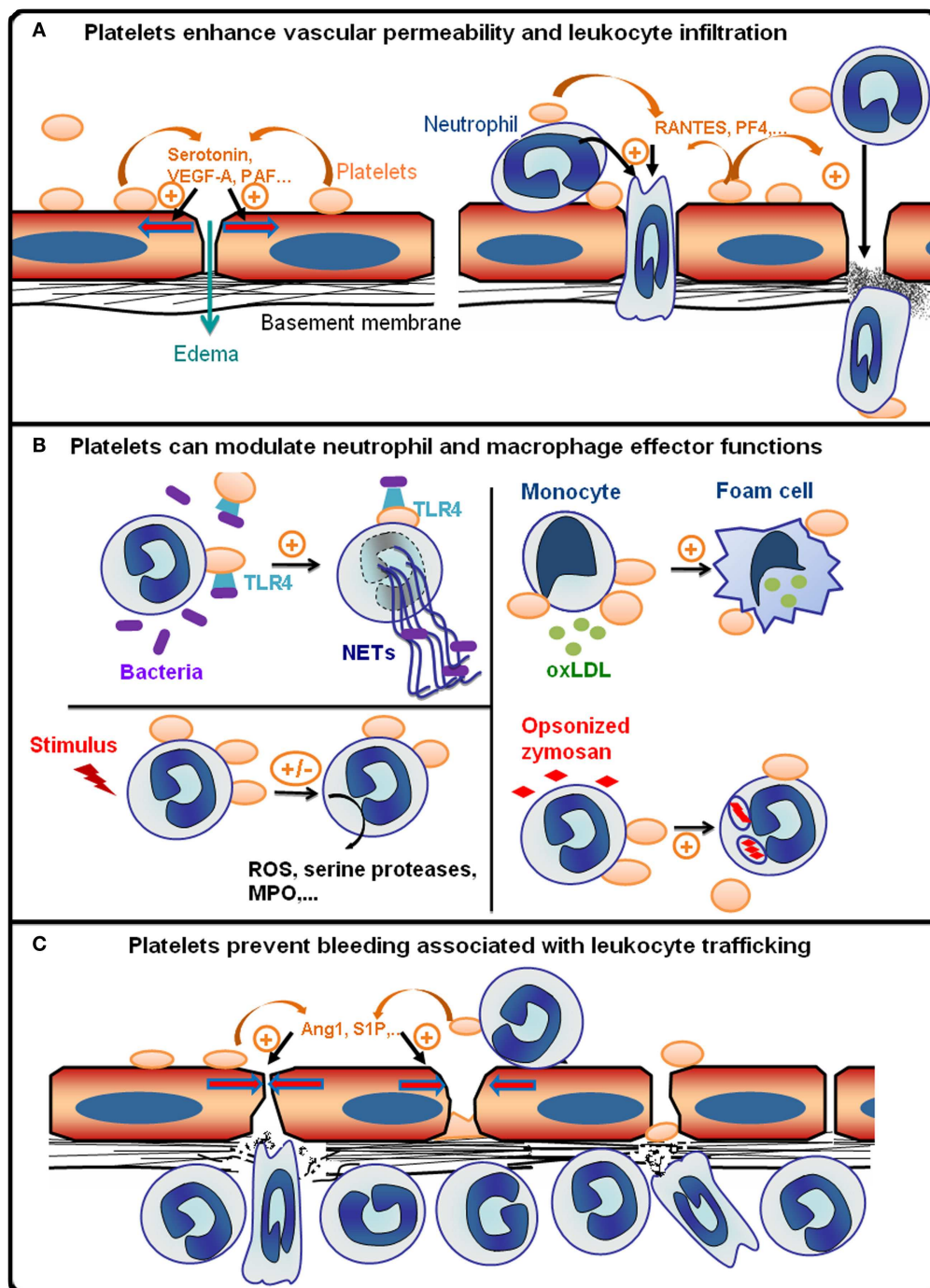


FIGURE 1 | Platelets are integral players of inflammatory reactions.

(A) During the early phase of inflammatory reactions, platelets are recruited to inflamed vessels and enhance vascular permeability by secreting pro-permeability factors such as serotonin, vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), or platelet-activating factor (PAF). Platelets further enhance the recruitment and infiltration of leukocytes by secreting chemokines [e.g., activation or normal T cell expressed and secreted (RANTES) or platelet factor 4 (PF-4)], and by upregulating the expression and/or activation of adhesion molecules on leukocytes and endothelial cells via direct cell–cell contacts and secretion of pro-inflammatory cytokines. The platelet receptors (e.g., GPVI, GPIb, GPIIb/IIIa, or P-selectin) supporting the interactions of platelets with inflamed vessels and/or leukocytes vary with the organ and inflammatory reactions concerned. **(B)** Platelets can modulate various leukocyte effector

functions: toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent activation of platelets promotes the formation of antibacterial neutrophil extracellular traps (NETs); platelets can also either stimulate or inhibit the production of reactive oxygen species (ROS) and/or secretion of cytokines and cytotoxic enzymes [e.g., myeloperoxidase (MPO), serine proteases] by neutrophils and macrophages depending on the inflammatory situation; platelets can stimulate phagocytosis and thus enhance foam cell formation by promoting the uptake of oxidized low-density lipoprotein by monocytes/macrophages (oxLDL). **(C)** Platelets prevent bleeding associated with leukocyte trafficking. This protective action of platelets has been shown to be independent of thrombus formation and to rely on the engagement of platelet ITAM receptors, which might cause secretion of anti-permeability factors such as angiotensin-1 (Ang1) and sphingosine-1-phosphate (S1P) by platelets.

The ITAM-dependent vasculoprotective action of platelets could also depend on their interactions with leukocytes. As mentioned above, platelets recruited to inflamed vessels bind to adherent leukocytes. The extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRN) was recently identified as a counter-receptor for GPVI and is present on neutrophils and macrophages (22, 96). Additionally, podoplanin, the ligand for CLEC-2, is absent on blood endothelial cells but is expressed by inflammatory macrophages (97). ITAM-mediated interactions between platelets and innate immune cells thus represent another potential trigger for the anti-permeability and/or “neutrophil-dampening” effect of platelets.

In conclusion, all these data showing that in a given situation, platelets can intervene to regulate vascular permeability, leukocyte infiltration, and effector functions, as well as bleeding associated with leukocyte trafficking, demonstrate that platelets are integral players of inflammatory reactions (Figure 1). Also, it appears that the pro- or anti-inflammatory character of platelets is highly dependent on parameters such as the cause of inflammation, which defines the pathways and extent of leukocyte, platelet, and endothelial cell activation, and the stage and/or endpoint readouts of the inflammatory reaction considered. In a similar manner, the overall impact of platelets on inflammatory diseases can either be beneficial or deleterious depending on the pathophysiological situation. Finally, as illustrated by the increasing interest in platelets as potential targets for the treatment of allergic inflammation (26, 98, 99), the availability of numerous anti-platelet drugs could open up new therapeutic perspectives for the many inflammatory diseases where platelets have been shown to play a pathogenic role (100).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Mary J. Osborne-Pellegrin and Dr. Richard Bayles for their help in editing this manuscript. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by grants from La Fondation de France, DHU FIRE, and CORDDIM Région Ile de France to Benoît Ho-Tin-Noé.

REFERENCES

- Ho-Tin-Noe B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost* (2011) **9**(Suppl 1):56–65. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04317.x
- Petri B, Broermann A, Li H, Khandoga AG, Zarbock A, Krombach F, et al. von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood* (2010) **116**:4712–9. doi:10.1182/blood-2010-03-276311
- Hara T, Shimizu K, Ogawa F, Yanaba K, Iwata Y, Muroi E, et al. Platelets control leukocyte recruitment in a murine model of cutaneous arthus reaction. *Am J Pathol* (2010) **176**:259–69. doi:10.2353/ajpath.2010.081117
- Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, Takenaka H, Kita M, Kishimoto S. The role of platelets in leukocyte recruitment in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. *Am J Pathol* (2007) **170**:2019–29. doi:10.2353/ajpath.2007.060881
- Zarbock A, Singbartl K, Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest* (2006) **116**:3211–9. doi:10.1172/JCI29499
- Asaduzzaman M, Lavasani S, Rahman M, Zhang S, Braun OO, Jeppsson B, et al. Platelets support pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis. *Crit Care Med* (2009) **37**:1389–96. doi:10.1097/CCM.0b013e31819ceb71
- Hidalgo A, Chang J, Jang JE, Peired AJ, Chiang EY, Frenette PS. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat Med* (2009) **15**:384–91. doi:10.1038/nm.1939
- Lo SK, Burhop KE, Kaplan JE, Malik AB. Role of platelets in maintenance of pulmonary vascular permeability to protein. *Am J Physiol* (1988) **254**:H763–71.
- Senaldi G, Pigué PF. Platelets play a role in the pathogenesis of the irritant reaction in mice. *J Invest Dermatol* (1997) **108**:248–52. doi:10.1111/1523-1747.ep12286444
- Cloutier N, Pare A, Farndale RW, Schumacher HR, Nigrovic PA, Lacroix S, et al. Platelets can enhance vascular permeability. *Blood* (2012) **120**:1334–43. doi:10.1182/blood-2012-02-413047
- Wessel F, Winderlich M, Holm M, Frye M, Rivera-Galdos R, Vockel M, et al. Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol* (2014) **15**:223–30. doi:10.1038/ni.2824
- Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* (2002) **196**:887–96. doi:10.1084/jem.20012044
- Cooper D, Chitman KD, Williams MC, Granger DN. Time-dependent platelet-vessel wall interactions induced by intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2003) **284**:G1027–33. doi:10.1152/ajpgi.00457.2002
- Ishikawa M, Cooper D, Arumugam TV, Zhang JH, Nanda A, Granger DN. Platelet-leukocyte-endothelial cell interactions after middle cerebral artery occlusion and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* (2004) **24**:907–15. doi:10.1097/01.WCB.0000132690.96836.7F
- Massberg S, Schurzinger K, Lorenz M, Konrad I, Schulz C, Plesnila N, et al. Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprotection and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation* (2005) **112**:1180–8. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.539221
- Schmitt-Sody M, Klose A, Gottschalk O, Metz P, Gebhard H, Zysk S, et al. Platelet-endothelial cell interactions in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)* (2005) **44**:885–9. doi:10.1093/rheumatology/keh638
- Kuligowski MP, Kitching AR, Hickey MJ. Leukocyte recruitment to the inflamed glomerulus: a critical role for platelet-derived P-selectin in the absence of rolling. *J Immunol* (2006) **176**:6991–9. doi:10.4049/jimmunol.176.11.6991
- Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, Simon DI, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation* (2009) **120**:1255–65. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.873695
- Devi S, Kuligowski MP, Kwan RY, Westein E, Jackson SP, Kitching AR, et al. Platelet recruitment to the inflamed glomerulus occurs via an alphaIIb beta3/GPVI-dependent pathway. *Am J Pathol* (2010) **177**:1131–42. doi:10.2353/ajpath.2010.091143
- Vowinkel T, Wood KC, Stokes KY, Russell J, Tailor A, Anthoni C, et al. Mechanisms of platelet and leukocyte recruitment in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2007) **293**:G1054–60. doi:10.1152/ajpgi.00350.2007
- Pitchford SC, Momi S, Giannini S, Casali L, Spina D, Page CB, et al. Platelet P-selectin is required for pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment in a murine model of allergic inflammation. *Blood* (2005) **105**:2074–81. doi:10.1182/blood-2004-06-2282
- Schulz C, Von Bruhl ML, Barocke V, Cullen P, Mayer K, Okrojek R, et al. EMMPRN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *J Thromb Haemost* (2011) **9**:1007–19. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04235.x
- Lievens D, Zerneck A, Seijkens T, Soehnlein O, Beckers L, Munnix IC, et al. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood* (2010) **116**(20):4317–27. doi:10.1182/blood-2010-01-261206
- Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DE, Hyman MC, Jung S, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* (2003) **9**:61–7. doi:10.1038/nm810
- Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, Herr N, Carbo C, Brill A, et al. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* (2013) **121**:1008–15. doi:10.1182/blood-2012-06-437392
- Durk T, Duerschmied D, Muller T, Grimm M, Reuter S, Vieira RP, et al. Production of serotonin by tryptophan hydroxylase 1 and release via platelets contribute to allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* (2013) **187**:476–85. doi:10.1164/rccm.201208-1440OC
- Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* (2007) **13**:463–9. doi:10.1038/nm1565

28. Totani L, Evangelista V. Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2010) **30**:2357–61. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207480
29. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol* (2001) **115**:451–9. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.03101.x
30. Bunescu A, Seideman P, Lenkei R, Levin K, Egberg N. Enhanced Fcγ receptor I, αMβ2 integrin receptor expression by monocytes and neutrophils in rheumatoid arthritis: interaction with platelets. *J Rheumatol* (2004) **31**:2347–55.
31. Pamuk GE, Nuri Pamuk O, Orum H, Arican O, Turgut B, Demir M. Elevated platelet-monocyte complexes in patients with psoriatic arthritis. *Platelets* (2009) **20**:493–7. doi:10.3109/09537100903165174
32. Pitchford SC, Yano H, Lever R, Riffo-Vasquez Y, Ciferri S, Rose MJ, et al. Platelets are essential for leukocyte recruitment in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* (2003) **112**:109–18. doi:10.1067/mai.2003.1514
33. Nicu EA, Van Der Velden U, Nieuwland R, Everts V, Loos BG. Elevated platelet and leukocyte response to oral bacteria in periodontitis. *J Thromb Haemost* (2009) **7**:162–70. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03219.x
34. Pamuk GE, Vural O, Turgut B, Demir M, Umit H, Tezel A. Increased circulating platelet-neutrophil, platelet-monocyte complexes, and platelet activation in patients with ulcerative colitis: a comparative study. *Am J Hematol* (2006) **81**:753–9. doi:10.1002/ajh.20655
35. McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, et al. Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Br J Haematol* (2004) **125**:777–87. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04983.x
36. Hottz ED, Medeiros-De-Moraes IM, Vieira-De-Abreu A, De Assis EF, Vals-De-Souza R, Castro-Faria-Neto HC, et al. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J Immunol* (2014) **193**:1864–72. doi:10.4049/jimmunol.1400091
37. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, et al. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* (1998) **31**:352–8. doi:10.1016/S0735-1097(97)00510-X
38. Nachman RL, Raffi S. Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. *N Engl J Med* (2008) **359**:1261–70. doi:10.1056/NEJMra0800887
39. Vargafitg BB, Chignard M, Lefort J, Benveniste J. Platelet-tissue interaction: role of platelet-activating factor (PAF-acether). *Agents Actions* (1980) **10**:502–6. doi:10.1007/BF02024151
40. Knezevic II, Predescu SA, Neamu RF, Gorovoy MS, Knezevic NM, Easington C, et al. Tiam1 and Rac1 are required for platelet-activating factor-induced endothelial junctional disassembly and increase in vascular permeability. *J Biol Chem* (2009) **284**:5381–94. doi:10.1074/jbc.M808958200
41. Vanhoutte PM, Luscher TF. Serotonin and the blood vessel wall. *J Hypertens Suppl* (1986) **4**:S29–35.
42. Strussmann T, Tillmann S, Wirtz T, Bucala R, Von Hundelshausen P, Bernhagen J. Platelets are a previously unrecognized source of MIF. *Thromb Haemost* (2013) **110**:1004–13. doi:10.1160/TH13-01-0049
43. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, et al. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* (2000) **148**:75–85. doi:10.1016/S0021-9150(99)00241-5
44. Dole VS, Bergmeier W, Mitchell HA, Eichenberger SC, Wagner DD. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood* (2005) **106**:2334–9. doi:10.1182/blood-2005-04-1530
45. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A, et al. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br J Haematol* (2008) **141**:84–91. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.06999.x
46. Italiano JE Jr, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet {α} granules and differentially released. *Blood* (2008) **111**:1227–33. doi:10.1182/blood-2007-09-113837
47. Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, Voronov R, et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood* (2013) **121**:1875–85. doi:10.1182/blood-2012-09-457739
48. Ollivier V, Syvannarath V, Gros A, Butt A, Loyau S, Jandrot-Perrus M, et al. Collagen can selectively trigger a platelet secretory phenotype via glycoprotein VI. *PLoS One* (2014) **9**:e104712. doi:10.1371/journal.pone.0104712
49. Moon DG, Van Der Zee H, Weston LK, Gudewicz PW, Fenton JW II, Kaplan JE. Platelet modulation of neutrophil superoxide anion production. *Thromb Haemost* (1990) **63**:91–6.
50. Tsuji T, Nagata K, Koike J, Todoroki N, Irimura T. Induction of superoxide anion production from monocytes and neutrophils by activated platelets through the P-selectin-sialyl Lewis X interaction. *J Leukoc Biol* (1994) **56**:583–7.
51. Wu X, Helfrich MH, Horton MA, Feigen LP, Lefkowitz JB. Fibrinogen mediates platelet-polymorphonuclear leukocyte cooperation during immune-complex glomerulonephritis in rats. *J Clin Invest* (1994) **94**:928–36. doi:10.1172/JCI117459
52. Zalavary S, Grenegard M, Stendahl O, Bengtsson T. Platelets enhance Fc(γ) receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization. *J Leukoc Biol* (1996) **60**:58–68.
53. McGarrity ST, Stephenson AH, Hyers TM, Webster RO. Inhibition of neutrophil superoxide anion generation by platelet products: role of adenine nucleotides. *J Leukoc Biol* (1988) **44**:411–21.
54. Bengtsson T, Zalavary S, Stendahl O, Grenegard M. Release of oxygen metabolites from chemoattractant-stimulated neutrophils is inhibited by resting platelets: role of extracellular adenosine and actin polymerization. *Blood* (1996) **87**:4411–23.
55. Jancinova V, Drabikova K, Nosal R, Danihelova E. Platelet-dependent modulation of polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence. *Platelets* (2000) **11**:278–85. doi:10.1080/09537100050129297
56. Herbertsson H, Bengtsson T. Role of platelets and the arachidonic acid pathway in the regulation of neutrophil oxidase activity. *Scand J Clin Lab Invest* (2001) **61**:641–9. doi:10.1080/003655101753268008
57. Losche W, Dressel M, Krause S, Redlich H, Spangenberg P, Heptinstall S. Contact-induced modulation of neutrophil elastase secretion and phagocytic activity by platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* (1996) **7**:210–3. doi:10.1097/00001721-199603000-00025
58. Losche W, Temmler U, Redlich H, Vickers J, Krause S, Spangenberg P. Inhibition of leukocyte chemiluminescence by platelets: role of platelet-bound fibrinogen. *Platelets* (2001) **12**:15–9. doi:10.1080/09537100020031171
59. Shah SV. Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int* (1989) **35**:1093–106. doi:10.1038/ki.1989.96
60. Del Principe D, Menichelli A, Di Giulio S, De Matteis W, Giordani M, Pentassoglio AM, et al. Stimulated platelets release factor(s) affecting the in vitro response of human polymorphonuclear cells. *J Leukoc Biol* (1990) **48**:7–14.
61. Del Maschio A, Maclouf J, Corvazier E, Grange MJ, Borgeat P. Activated platelets stimulate human neutrophils functions. *Nouv Rev Fr Hematol* (1985) **27**:275–8.
62. Del Maschio A, Corvazier E, Maillet F, Kazatchkine MD, Maclouf J. Platelet-dependent induction and amplification of polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release. *Br J Haematol* (1989) **72**:329–35. doi:10.1111/j.1365-2141.1989.tb07712.x
63. Badryna S, Schrottmaier WC, Kral JB, Yaiw KC, Volf I, Schabbauer G, et al. Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2014) **34**:571–80. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302919
64. Hussein O, Brook GJ, Aviram M. Intraperitoneal injection of platelet secretory products into mice increases macrophage uptake of oxidized low density lipoprotein. *Isr J Med Sci* (1993) **29**:453–9.
65. Aviram M. LDL-platelet interaction under oxidative stress induces macrophage foam cell formation. *Thromb Haemost* (1995) **74**:560–4.
66. Aviram M, Hussein O, Rosenblat M, Schlezinger S, Hayek T, Keidar S. Interactions of platelets, macrophages, and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-CoA reductase inhibitor therapy. *J Cardiovasc Pharmacol* (1998) **31**:39–45. doi:10.1097/00005344-199801000-00006

67. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, et al. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* (1996) **97**:1525–34. doi:10.1172/jci118575
68. Corken A, Russell S, Dent J, Post SR, Ware J. Platelet glycoprotein Ib-IX as a regulator of systemic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2014) **34**:996–1001. doi:10.1161/ATVBAHA.113.303113
69. de Stoppelaar SF, van 't Veer C, Clausshuis TA, Albersen BJ, Roelofs JJ, Van Der Poll T. Thrombocytopenia impairs host defense in Gram-negative pneumonia derived sepsis. *Blood* (2014) **124**(25):3781–90. doi:10.1182/blood-2014-05-573915
70. Fujimi S, Macconmara MP, Maung AA, Zang Y, Mannick JA, Lederer JA, et al. Platelet depletion in mice increases mortality after thermal injury. *Blood* (2006) **107**:4399–406. doi:10.1182/blood-2005-09-3776
71. Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med* (2011) **208**:1253–65. doi:10.1084/jem.20101751
72. Koupenova M, Vitseva O, Mackay CR, Beaulieu LM, Benjamin EJ, Mick E, et al. Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. *Blood* (2014) **124**:791–802. doi:10.1182/blood-2013-11-536003
73. Boillard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* (2010) **327**:580–3. doi:10.1126/science.1181928
74. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* (2004) **303**:1532–5. doi:10.1126/science.1092385
75. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* (2007) **176**:231–41. doi:10.1083/jcb.200606027
76. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubers P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* (2012) **12**:324–33. doi:10.1016/j.chom.2012.06.011
77. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* (2012) **122**:2661–71. doi:10.1172/jci61303
78. Rossaint J, Herter JM, Van Aken H, Napirei M, Doring Y, Weber C, et al. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. *Blood* (2014) **123**:2573–84. doi:10.1182/blood-2013-07-516484
79. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**:15880–5. doi:10.1073/pnas.1005743107
80. Massberg S, Gahl L, Von Bruhl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* (2010) **16**:887–96. doi:10.1038/nm.2184
81. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* (2013) **13**:34–45. doi:10.1038/nri3345
82. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* (2012) **10**:136–44. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x
83. Von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* (2012) **209**:819–35. doi:10.1084/jem.20112322
84. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) **109**:13076–81. doi:10.1073/pnas.1200419109
85. Evangelista V, Piccardoni P, White JG, De Gaetano G, Cerletti C. Cathepsin G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by antiproteases: role of P-selectin-mediated cell-cell adhesion. *Blood* (1993) **81**:2947–57.
86. Valles J, Santos MT, Marcus AJ, Safer LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Downregulation of human platelet reactivity by neutrophils. Participation of lipoxygenase derivatives and adhesive proteins. *J Clin Invest* (1993) **92**:1357–65. doi:10.1172/JCI116709
87. Pidard D, Renesto P, Rabhi S, Chignard M. Regulation of the structure and activity of platelet adhesion receptors by leukocyte proteinases. *Nouv Rev Fr Hematol* (1994) **36**(Suppl 1):S99–101.
88. Renesto P, Si-Tahar M, Moniatte M, Balloy V, Van Dorsselaer A, Pidard D, et al. Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood* (1997) **89**:1944–53.
89. Ilton MK, Taylor ML, Misso NL, Thompson PJ, Hung J. Neutrophil cathepsin G modulates platelet P-selectin expression and inhibits P-selectin-mediated platelet-neutrophil adhesion. *Clin Sci (Lond)* (1998) **94**:437–45.
90. George T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zhao BQ, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* (2008) **111**:4958–64. doi:10.1182/blood-2007-11-123620
91. Majno G, Palade GE. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* (1961) **11**:571–605. doi:10.1083/jcb.11.3.607
92. Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Demers M, Cifuni SM, Goerge T, Wagner DD. Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *Am J Pathol* (2009) **175**:1699–708. doi:10.2353/ajpath.2009.090460
93. Camerer E, Regard JB, Cornelissen I, Srinivasan Y, Duong DN, Palmer D, et al. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J Clin Invest* (2009) **119**:1871–9. doi:10.1172/JCI38575
94. Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, Cholka A, Stolla M, Mackman N, et al. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest* (2013) **123**(2):908–16. doi:10.1172/JCI65154
95. Herzog BH, Fu J, Wilson SJ, Hess PR, Sen A, McDaniel JM, et al. Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature* (2013) **502**:105–9. doi:10.1038/nature12501
96. Wang CH, Dai JY, Wang L, Jia JF, Zheng ZH, Ding J, et al. Expression of CD147 (EMMPRIN) on neutrophils in rheumatoid arthritis enhances chemotaxis, matrix metalloproteinase production and invasiveness of synovial cells. *J Cell Mol Med* (2011) **15**:850–60. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01084.x
97. Kerrigan AM, Navarro-Nunez L, Pyz E, Finney BA, Willment JA, Watson SP, et al. Podoplanin-expressing inflammatory macrophages activate murine platelets via CLEC-2. *J Thromb Haemost* (2012) **10**:484–6. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04614.x
98. Kornerup KN, Page CP. The role of platelets in the pathophysiology of asthma. *Platelets* (2007) **18**:319–28. doi:10.1080/09537100701230436
99. Pitchford SC. Defining a role for platelets in allergic inflammation. *Biochem Soc Trans* (2007) **35**:1104–8. doi:10.1042/BST0351104
100. Pitchford SC. Novel uses for anti-platelet agents as anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol* (2007) **152**:987–1002. doi:10.1038/sj.bjp.0707364

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 03 November 2014; paper pending published: 24 November 2014; accepted: 16 December 2014; published online: 06 January 2015.

Citation: Gros A, Ollivier V and Ho-Tin-Noé B (2015) Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair. *Front. Immunol.* **5**:678. doi: 10.3389/fimmu.2014.00678

This article was submitted to *Inflammation*, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2015 Gros, Ollivier and Ho-Tin-Noé. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

III. Perméabilité endothéliale, infiltration des leucocytes et saignements inflammatoires : trois processus distincts

A. Perméabilité endothéliale et infiltration des leucocytes

La perméabilité vasculaire ne doit pas être confondue avec la transmigration des neutrophiles. Ces deux phénomènes sont caractéristiques d'un état inflammatoire mais ils sont distincts et contrôlés indépendamment.

Une étude parue en 1998 (Baluk, Bolton et al. 1998) a montré dans un modèle de rat soumis à un allergène par voie aérienne que l'augmentation de la perméabilité vasculaire était spatialement dissociée de l'extravasation des neutrophiles. Dans les phases précoces et tardives, les veinules post-capillaires étaient les vaisseaux les plus sensibles à cette augmentation de la perméabilité vasculaire. Les leucocytes étaient observés principalement dans les veinules collectrices (situées entre le réseau capillaire et les veinules). Ainsi dans ce modèle inflammatoire l'augmentation de la perméabilité endothéliale s'observe au niveau des veinules post-capillaires tandis que les leucocytes adhèrent et s'infiltrent principalement au niveau des veinules collectrices.

D'autres mécanismes moléculaires distinguant la perméabilité endothéliale de la diapédèse des leucocytes ont été rapportés. Par exemple, les différentes isoformes de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) contrôlent différemment l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la diapédèse des leucocytes (Cain, Vanhaesebroeck et al. 2012). Une autre étude (Cullere, Shaw et al. 2005) montre que Epac1 (*Exchange protein directly activated by cAMP 1*) est impliqué dans l'augmentation de la perméabilité des cellules HUVECs (*Human umbilical venous endothelial cells*) mais pas dans la transmigration des leucocytes.

Récemment, dans une élégante étude sur les fonctions de la VE-cadhérine endothéliale lors d'une réaction inflammatoire, Wessel *et al.* (Wessel, Winderlich et al. 2014) montrent que la perméabilité endothéliale et la diapédèse des leucocytes sont régulées de manière indépendante par la phosphorylation de résidus tyrosine distincts Y685 et Y731 de la VE-cadhérine.

Dans une première série d'expérience, les auteurs ont mis des cellules endothéliales cultivées *in vitro* en présence de leucocytes ou de facteur augmentant la perméabilité vasculaire (histamine, VEGF). Puis, *in vivo* des souris portant la mutation Y685F ou Y731F sur la VE-cadhérine ont été soumises à l'injection d'interleukine-1 β , de TNF- α ou d'histamine et de VEGF au niveau des vaisseaux du muscle crémaster.

Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* démontrent que l'augmentation de la perméabilité vasculaire est contrôlée par la phosphorylation de Y685 et que la déphosphorylation de Y731 est impliquée dans l'extravasation des leucocytes. De fait les leucocytes mis en présence des cellules endothéliales induisent une déphosphorylation de Y731 de la VE-cadhérine par la phosphatase SHP-2 (*Src homology protein tyrosine phosphatase*) qui permet l'endocytose de la VE-cadhérine et le passage des leucocytes (**Figure 37**).

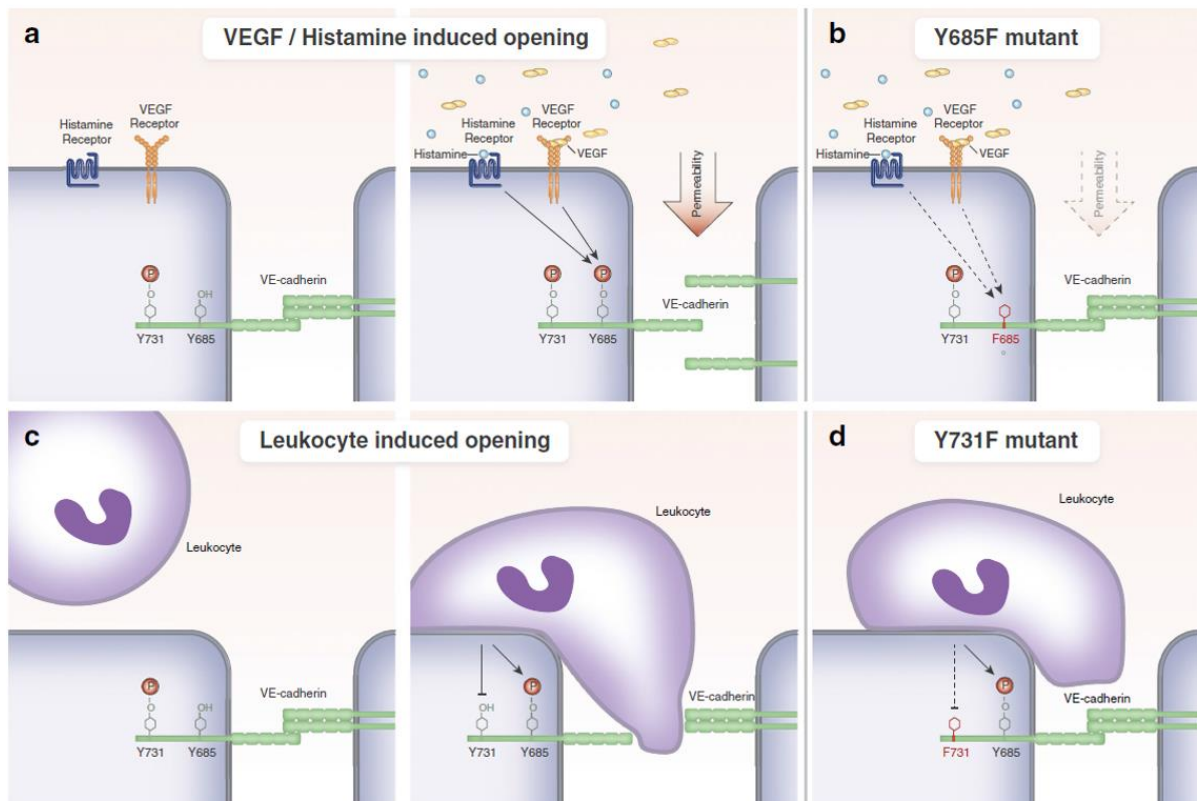


Figure 37 : Perméabilité endothéliale et diapédèse des leucocytes sont deux processus distincts. La VE-cadhérine est impliquée à la fois dans le contrôle de la perméabilité endothéliale et dans la diapédèse des leucocytes mais selon des régulations différentes : l'augmentation de la perméabilité vasculaire est contrôlée par la phosphorylation de Y685 tandis que la diapédèse des leucocytes dépend de la déphosphorylation de Y731. *In vivo*, à l'état basal, la VE-cadhérine est phosphorylée sur son résidu Y731, mais pas sur Y685. Les facteurs solubles tels que le VEGF ou l'histamine augmentant la perméabilité endothéliale induisent la phosphorylation de Y685 (a). L'utilisation de souris portant la mutation Y685F sur la VE-cadhérine démontre que seul le résidu Y685 est requis pour induire une augmentation de la perméabilité endothéliale (b). Les leucocytes induisent une déphosphorylation rapide de Y731 par la phosphatase SHP-2, entraînant l'endocytose de la VE-cadhérine (c). L'utilisation de souris portant la mutation Y731F sur la VE-cadhérine confirme que Y731 et non Y685 permet la diapédèse des leucocytes(d) ((Sidibe and Imhof 2014, Vestweber, Wessel et al. 2014, Wessel, Winderlich et al. 2014)).

B. Perméabilité endothéliale et saignements inflammatoires

La perméabilité endothéliale et les saignements inflammatoires sont également des processus indépendants même s'il est possible de les observer dans un même vaisseau. En effet, pour qu'il y ait saignement, la rupture de la membrane basale est nécessaire. Une simple ouverture des jonctions endothéliales ne permet pas le passage des globules rouges du vaisseau vers les tissus.

En 1961, Majno et Palade (Majno and Palade 1961) réalisent une étude sur les effets de l'histamine et de la sérotonine sur la perméabilité vasculaire des vaisseaux du muscle crémaster de rat. Une à douze minutes après l'injection par voie sous-cutanée de ces deux molécules, les auteurs ont observé par microscopie électronique une ouverture des jonctions endothéliales dans les veinules. Les particules de sulfure de mercure (HgS) injectées par voie intraveineuse pour visualiser l'ouverture des jonctions cellulaires sont majoritairement retenues par la membrane basale au sein du vaisseau. Il en est de même des globules rouges et des plaquettes qui sont maintenus dans les vaisseaux. Aucun leucocyte n'est observé dans ces vaisseaux. La membrane basale vasculaire conserve son intégrité et aucun saignement n'est remarqué (**Figure 38**).

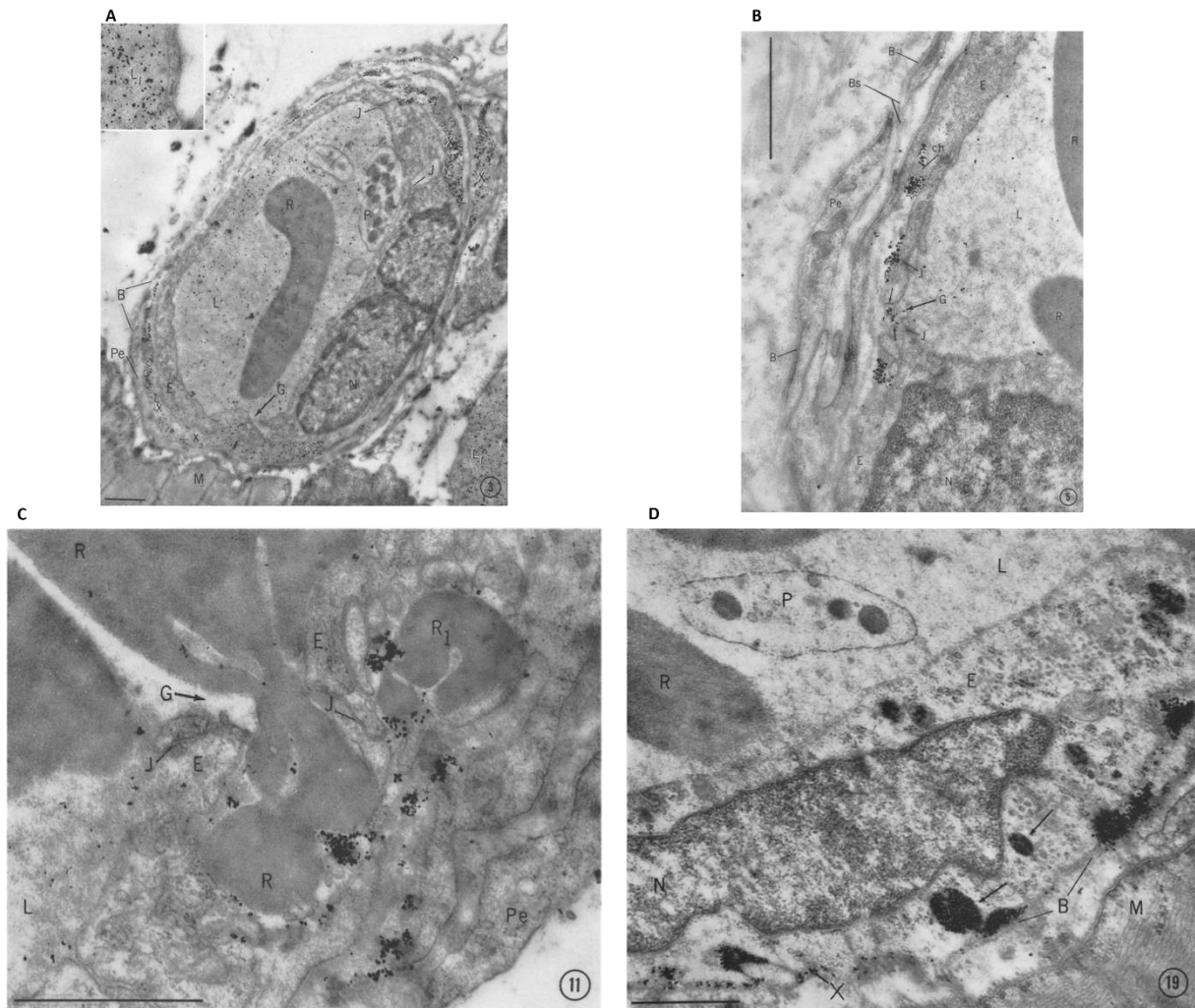


Figure 38 : Observation par microscopie électronique des vaisseaux du muscle crémaster de rat après injection de sérotonine ou d’histamine. L’injection sous-cutanée d’histamine ou de sérotonine induit une augmentation de la perméabilité endothéliale avec une ouverture (G) des jonctions endothéliales (J), observable par le passage de particules de sulfure de mercure (HgS, entre 70 et 350 angström de diamètre) denses aux électrons (X) et de chylomicrons (ch). La membrane basale (B et Bs) conserve son intégrité. Les particules d’HgS comme les globules rouges (R) sont présents au sein du vaisseau et observables dans la lumière vasculaire (L) ou retenus par la membrane basale. On observe également les cellules endothéliales (E) avec leur noyau (N), les péricytes (Pe), les plaquettes (P) et les fibres musculaires striées (M). L’augmentation de la perméabilité vasculaire ne provoque pas de saignements. A et C : Observations réalisées 3min (A) et 4 min (C) après injection de sérotonine. B et D : Observations réalisées 4min (B) et 3 heures (D) après injection d’histamine. La barre représente 1µm (adapté de (Majno and Palade 1961)).

Dans son étude Cochrane (Cochrane and Aikin 1966) provoque une dermatite par formation locale de complexes immuns chez des lapins. Il observe une augmentation de la perméabilité vasculaire une heure avant l'accumulation des neutrophiles et il identifie les neutrophiles comme étant responsables de la destruction de la membrane basale (**Figure 39**). Cette altération de la membrane basale permet alors le passage des neutrophiles et des globules rouges dans les tissus. Les auteurs montrent comme Majno et Palade qu'en induisant une augmentation de la perméabilité endothéliale avec des amines vasoactives (histamine ou bradykinine) la membrane basale n'est pas endommagée et aucun saignement n'est observé.

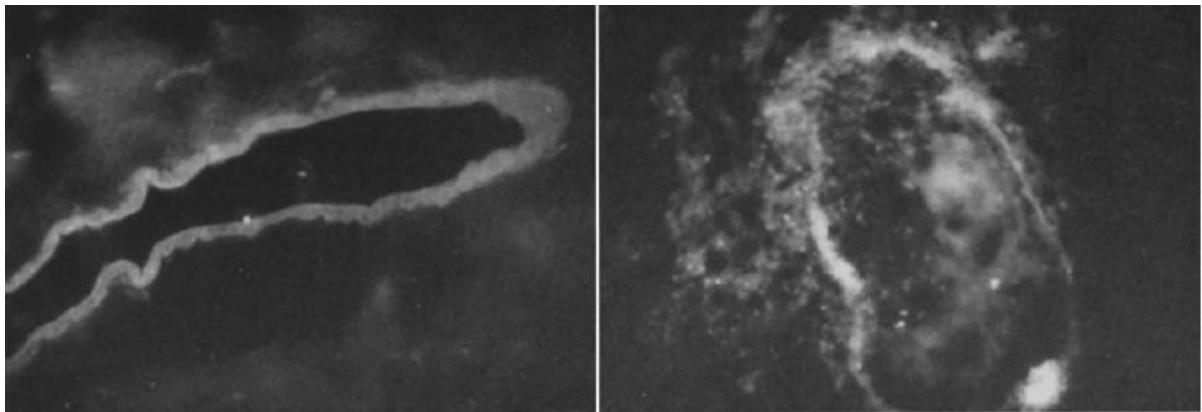


Figure 39 : Observation microscopique après immuno-marquage de la membrane basale des vaisseaux cutanés de lapin après une réaction immunologique. A gauche : après 1 heure de réaction, la perméabilité endothéliale est augmentée mais en absence d'infiltration des neutrophiles, l'intégrité de la membrane basale est encore préservée. A droite : après 8 heures de réaction, la membrane basale est endommagée dans la partie supérieure du vaisseau (Cochrane and Aikin 1966).

IV. Le maintien de l'intégrité vasculaire par les plaquettes dans les réactions inflammatoires

Comme abordé dans la revue, les plaquettes interviennent dans le maintien de l'intégrité vasculaire dans les réactions inflammatoires c'est-à-dire dans la prévention des saignements inflammatoires. Cette fonction plaquettaire a été mise en évidence sur des souris rendues thrombopéniques et soumises à différents modèles de réactions inflammatoires : dermatite immuno-induite (réaction passive d'Arthus, rpA) ou de contact (huile de croton), inflammation pulmonaire induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* et ischémie/reperfusion cérébrale (modèle *Transient middle cerebral artery occlusion*, tMCAO). De manière systématique, les souris thrombopéniques ne saignent pas spontanément et les pétéchies ne sont observés que dans l'organe soumis à la réaction inflammatoire (**Figure 40**).

Ces observations ont depuis été confirmées dans des modèles de glomérulonéphrite (Hirahashi, Hishikawa et al. 2009), de tumeurs solides (Ho-Tin-Noe, Goerge et al. 2008), d'infection par un arenavirus murin chorioméningite lymphocytaire LCMV (Loria, Romagnoli et al. 2013) ou d'exposition aux ultraviolets (UVs) (Hillgruber, Pöppelmann et al. 2015). Cette fonction des plaquettes a aussi été observée chez l'Homme comme chez un patient thrombopénique après un coup de soleil. Des pétéchies ont été observés uniquement au niveau de la zone exposée au soleil (Carbo, del Conde et al. 2009). Ceci a été confirmé après exposition de patients thrombopéniques à des doses contrôlées d'UVs (Hillgruber, Pöppelmann et al. 2015).

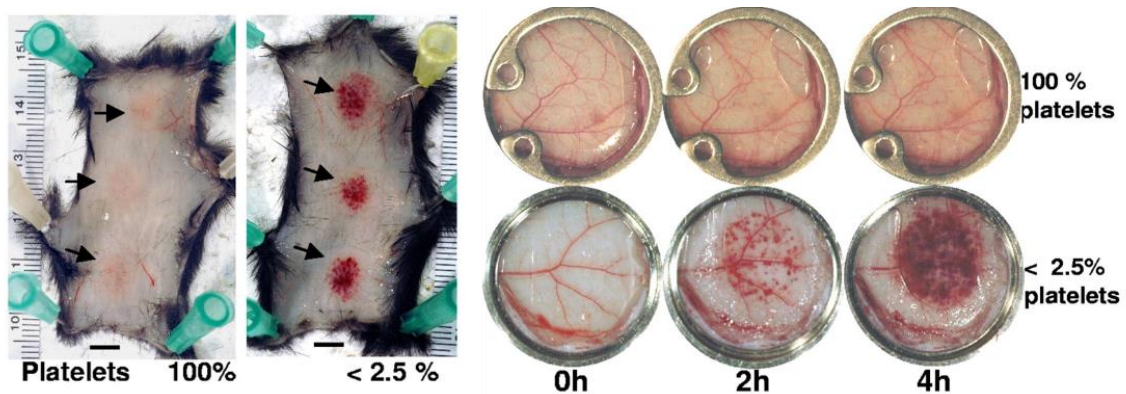


Figure 40 : Les plaquettes préviennent la survenue des saignements inflammatoires. Dans un modèle de dermatite immuno-induite (réaction passive d'Arthus), seules les souris thrombopéniques présentent des pétéchies et uniquement au site de la réaction (à gauche de la figure). La pose de skinfold permet d'observer le développement de ces saignements au cours du temps et montre que ceux-ci se développent rapidement et sont observables très clairement deux heures après l'initiation de la réaction (à droite de la figure) (adapté de (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008)).

Ces saignements inflammatoires ne surviennent qu'en cas de thrombopénie sévère avec un compte plaquettaire au moins inférieur à 10% de la normale (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008). Cette même observation a été faite dans un modèle d'infection bactérienne pulmonaire (de Stoppelaar, van 't Veer et al. 2014). Des saignements localisés au niveau pulmonaire ont alors été observés uniquement chez les souris avec un compte plaquettaire inférieur à $5 \times 10^9/L$ (**Figure 41**).

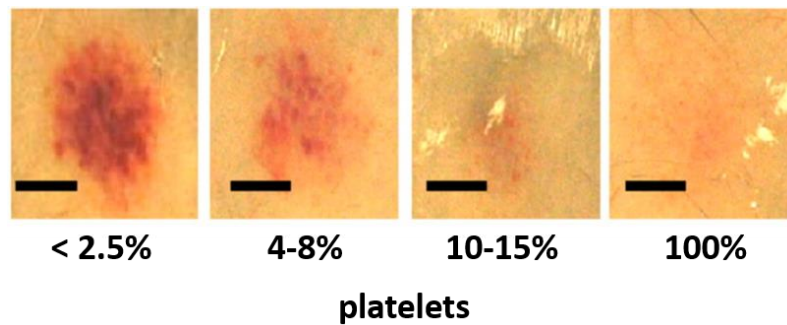


Figure 41 : Seule une thrombopénie sévère conduit à des saignements inflammatoires. Des souris avec des niveaux de thrombopénie différents sont soumises à une dermatite immuno-induite. Des pétéchies apparaissent uniquement chez les souris avec moins de 10% de plaquettes. Une souris contrôle a un compte plaquettaire de $1150 (\pm 231) \times 10^9/L$ (100% de plaquettes) tandis qu'après induction de la thrombopénie ce compte plaquettaire est de $25 (\pm 0.1) \times 10^9/L$ (< 2.5%) (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008).

Les récepteurs et mécanismes plaquettaire impliqués dans cet effet protecteur ont été recherchés. Dans le modèle de dermatite immuno-induite dans la peau, GPIb, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et CALDAG-GEF1 ne sont pas requis puisque les souris présentant un déficit en ces protéines ne montrent pas de saignement au site inflammatoire (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008). Ceci suggère que la prévention des saignements d'origine inflammatoire par les plaquettes serait indépendante de l'agrégation plaquettaire et de la formation d'un thrombus.

Les souris hIL4R α /GPIb α (Kanaji, Russell et al. 2002) sont des souris chez lesquelles le domaine extracellulaire de GPIb est remplacé par celui du récepteur humain de l'interleukine-4 (hIL4R) ce qui évite la formation de plaquettes géantes (**Figure 42**). Ces souris transgéniques peuvent également être déplétées de leurs plaquettes avec un anticorps dirigé contre hIL4R avant d'être transfusées avec des plaquettes sans que celles-ci ne soient détruites par l'anti-hIL4R.

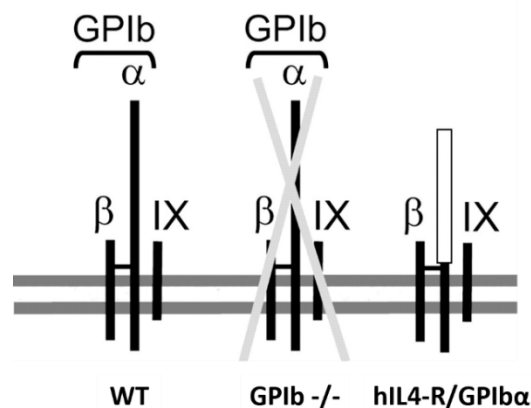


Figure 42 : Construction de la souris hIL4R α /GPIb α . (adapté de (Jain, Zuka et al. 2007)).

Des souris *hIL4R α /GPIb α* ont par la suite été rendues thrombopéniques puis partiellement reconstituées avec des plaquettes contrôles ou traitées avec des agents pharmacologiques. Ces expériences suggèrent que les récepteurs RCPG ne contribueraient pas à la prévention des saignements inflammatoires. En revanche, les deux récepteurs à ITAM, GPVI et CLEC-2, seraient indispensables pour prévenir les saignements inflammatoires (**Figure 43**). Le rôle de la voie ITAM dans cet effet protecteur est aussi suggéré par l'observation de saignements inflammatoires chez les souris transfusées avec des plaquettes *SLP76*^{-/-}, une protéine de cette voie de signalisation ITAM. Ces observations ont été réalisées dans un modèle de dermatite immuno-induite et dans un modèle d'inflammation pulmonaire aigüe au LPS (Boulaftali, Hess et al. 2013, Boulaftali, Hess et al. 2014).

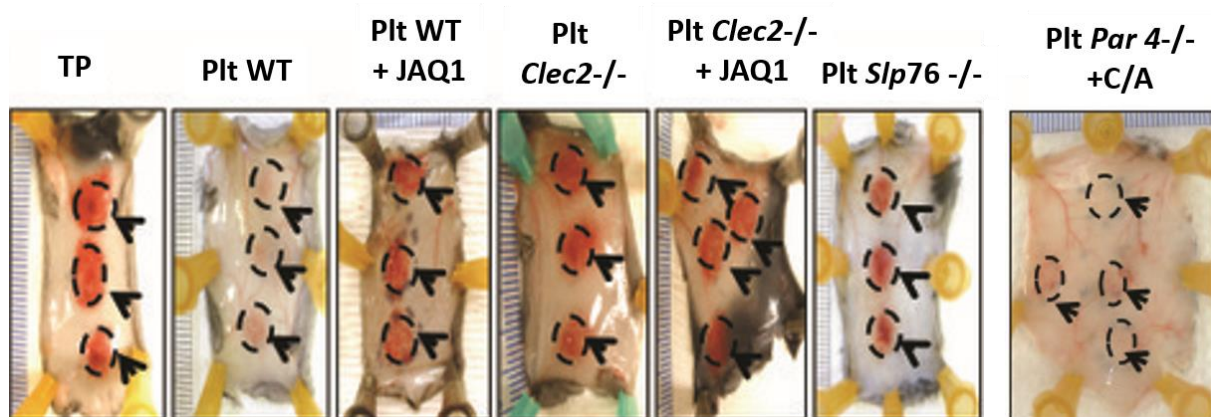


Figure 43 : Les récepteurs plaquettaire avec un motif ITAM préviennent les saignements inflammatoires cutanés. Des souris *hIL4R α /GPIb α* sont rendues thrombopéniques (TP) et sont partiellement reconstituées par une transfusion de plaquettes (Plt) contrôles (WT), de plaquettes traitées avec l'anticorps anti-GPVI JAQ1 et/ou présentant un déficit en CLEC-2, ou de plaquettes avec un déficit en SLP76. Les souris ont aussi été transfusées avec des plaquettes *Par 4*^{-/-} traitées par le clopidogrel (C) et l'aspirine (A) (adapté de (Boulaftali, Hess et al. 2013)).

Le récepteur CLEC-2 est aussi impliqué dans le maintien de la perméabilité vasculaire et la prévention des saignements au niveau des HEVs (*High endothelial venules* ou veinules post-capillaires spécialisées au niveau des organes lymphoïdes secondaires) dans une réaction d'immunisation induite par l'ovalbumine couplée à l'adjuvant complet de Freund. Cette réaction conduit à un important *trafficking* des lymphocytes au niveau des ganglions lymphatiques. Dans ce contexte, le récepteur CLEC-2 exprimé à la surface des plaquettes interagirait avec la podoplanine des fibroblastes réticulaires (FRCs) bordant ces vaisseaux. Cette interaction entrainerait la sécrétion de sphingosine-1-phosphate (S1P) par les plaquettes. La S1P stimulerait alors l'expression de la VE-cadhérine par les HEVs (Herzog, Fu et al. 2013). Cependant, ces résultats sont à confirmer car en condition contrôle les souris *CLEC-2^{fl/fl}PF4-Cre⁺*, permettant la délétion spécifique du gène *Clec1b* de la lignée mégacaryocytaire par la technologie Cre /Lox par croisement des souris *PF4-Cre* avec des souris *Clec-2^{fllox/fllox}*, présentent

déjà des saignements au niveau de leurs ganglions lymphatiques du fait de la mauvaise séparation de leurs vaisseaux sanguins et lymphatiques, ce qui peut créer un facteur de confusion dans l'origine des saignements. De plus, dans ces travaux des souris avec un déficit en sphingosine-1-phosphate dans l'ensemble de la lignée hématopoïétique ont été utilisées or la S1P peut être produite par d'autres types cellulaires que les plaquettes. En effet, la S1P est synthétisée par des cellules de la lignée hématopoïétique (globule rouge, mastocyte) ou non hématopoïétique (cellules endothéliales, astrocyte) (Camerer, Regard et al. 2009). La contribution spécifique de la sphingosine-1-phosphate d'origine plaquettaire pour le maintien de l'intégrité vasculaire dans ce modèle a donc été recherchée. L'induction de cette même réaction d'immunisation sur des souris avec un déficit en sphingosine-1-phosphate restreint à la lignée mégacaryocytaire a montré que la source plaquettaire de S1P n'est pas nécessaire pour prévenir les saignements inflammatoires dans ce modèle (Gazit, Mariko et al. 2016).

Les plaquettes préservent aussi l'intégrité des vaisseaux dans d'autres situations pathologiques et notamment dans les tumeurs solides qui constituent un foyer inflammatoire important. Ce rôle des plaquettes pourrait mener au développement de nouveaux traitements.

En effet, dans des modèles de tumeur solide *Lung Lewis Carcinoma* (LLC) ou mélanome de la lignée B16F10, l'absence de plaquette déstabilise les vaisseaux tumoraux menant à des hémorragies intratumorales (**Figure 44**). Comme dans les autres modèles, les saignements sont localisés exclusivement au site inflammatoire, ici dans la tumeur, et dans aucun autre territoire. Dans ce contexte, l'hémorragie est également un processus distinct d'une augmentation de la perméabilité des vaisseaux tumoraux ; en effet seules les souris thrombopéniques présentent des saignements alors qu'une augmentation significative de la perméabilité vasculaire est notée chez les souris contrôles comme chez les souris thrombopéniques. La transfusion de plaquettes au repos, contrôles ou présentant un déficit pour certains récepteurs d'adhésion chez des souris thrombopéniques, permet d'empêcher ces hémorragies. Au contraire, la transfusion de plaquettes préalablement activées ne permet pas cette prévention soulignant ainsi que les facteurs solubles contenus dans les plaquettes jouent un rôle essentiel dans la stabilisation des vaisseaux tumoraux (Ho-Tin-Noe, Goerge et al. 2008). De manière intéressante, la déstabilisation des vaisseaux tumoraux induite par l'absence des plaquettes augmente l'efficacité des traitements anti-tumoraux classiques chez l'animal (Demers, Ho-Tin-Noe et al. 2011). Les récepteurs impliqués dans cette fonction restent à identifier.

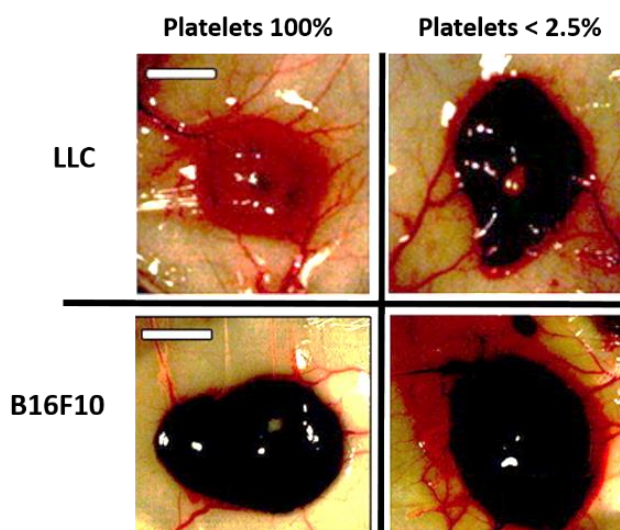


Figure 44 : Les plaquettes assurent la stabilité des vaisseaux tumoraux. Dans les tumeurs solides de Lung Lewis Carcinoma (LLC) ou de mélanome de type B16F10, l'absence de plaquettes mène à des saignements intra-tumoraux (adapté de (Ho-Tin-Noe, Goerge et al. 2008)).

L'origine de ces saignements a été recherchée et les données obtenues suggèrent que les leucocytes en sont la cause indiquant qu'il s'agirait de saignements inflammatoires. Effectivement, des souris rendues thrombopéniques et neutropéniques sont protégées des dégâts vasculaires provoqués par une injection sous-cutanée de TNF- α . De plus, les saignements intra-tumoraux chez les souris thrombopéniques sont partiellement prévenus par la délétion de l'intégrine $\beta 2$ (CD18 $^{-/-}$) impliquée dans l'adhésion et la transmigration des neutrophiles. Cette prévention est d'autant plus importante lorsque les neutrophiles sont immuno-déplétés chez des souris portant des tumeurs de type LLC. Des résultats similaires sont observés chez des souris thrombopéniques portant des tumeurs mammaires 4T1 et déficientes pour l'intégrine $\beta 3$ nécessaire à la transmigration des monocytes/macrophages et qui ont donc un contenu en macrophages associés à la tumeur TAMs (*Tumor-associated macrophages*) significativement réduit (Ho-Tin-Noe, Carbo et al. 2009, Ho-Tin-Noe, Goerge et al. 2009).

Objectifs de la thèse

Comme exposé dans l'introduction, les plaquettes ont été décrites en premier lieu pour leur fonction dans l'hémostase primaire. Cependant, elles sont aussi engagées dans d'autres processus physiopathologiques et en particulier dans les réactions inflammatoires et leur régulation. Les plaquettes interviennent à toutes les étapes de ces réactions et ce dès leur initiation en régulant la perméabilité endothéliale, l'infiltration des leucocytes ainsi que leurs fonctions effectrices. Les plaquettes ont également un rôle crucial dans ces réactions inflammatoires en prévenant la survenue des saignements inflammatoires.

Les mécanismes impliqués dans ces fonctions « inflammatoires » des plaquettes restent peu connus et il est nécessaire de les caractériser. Leur élucidation pourrait aboutir à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter certaines maladies inflammatoires. Des molécules ciblant spécifiquement certains récepteurs/ facteurs plaquettaires pourraient ainsi être utilisées.

Les objectifs de mes travaux de thèse ont été :

- De caractériser différents états d'activation des plaquettes (**Publication 1**)
- De caractériser les mécanismes plaquettaires impliqués dans la prévention des saignements inflammatoires (**Publications 2 et 3**)
- De caractériser les déterminants de la régulation des activités cytotoxiques des neutrophiles par les plaquettes (**Publication 4**)

Ces travaux sont présentés sous la forme d'articles publiés ou en préparation.

Résultats expérimentaux

PUBLICATION 1

Collagen Can Selectively Trigger a Platelet Secretory Phenotype via Glycoprotein VI

Véronique Ollivier, Varouna Syvannarath, Angèle Gros, Amena Butt, Stéphane Loyau,
Martine Jandrot-Perrus and Benoît Ho-Tin-Noé

Publié dans *Plos One*, Août 2014

Contribution : Mise au point, réalisation, analyse et interprétation des expériences sur la mobilisation du calcium intra-cytoplasmique (Figures 6 et S2).

Introduction

Les plaquettes jouent un rôle central dans l'hémostase. Cette réponse hémostatique repose principalement sur l'activation des plaquettes après leur interaction avec les protéines adhésives du sous-endothélium (collagène, facteur von Willebrand) et/ou les facteurs solubles circulants (thrombine ou adénosine diphosphate) suite à une lésion vasculaire. Les plaquettes, de forme discoïde au repos, deviennent alors sphériques et émettent de nombreux pseudopodes. La stimulation des plaquettes conduit à l'activation des récepteurs d'adhésion et des intégrines, à l'exposition des phospholipides anioniques pro-coagulants et à la sécrétion des facteurs solubles contenus dans leurs granules (Broos, Feys et al. 2011, Broos, De Meyer et al. 2012, Versteeg, Heemskerk et al. 2013). Les plaquettes acquièrent ainsi un phénotype pro-thrombotique et pro-coagulant menant à la formation d'un thrombus.

Cependant, en plus de leur rôle hémostatique, les plaquettes sont engagées dans d'autres processus physiologiques tels que la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives (Semple, Italiano et al. 2011, Li, Li et al. 2012), de l'angiogenèse (Brill, Elinav et al. 2004, Kisucka, Butterfield et al. 2006), de la cicatrisation (Nurden 2011). La présence de plaquettes individualisées prévient notamment la survenue des saignements inflammatoires dans plusieurs organes (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008, Ho-Tin-Noe, Goerge et al. 2008, Hirahashi, Hishikawa et al. 2009, Boulaftali, Hess et al. 2013). Les mécanismes sous-jacents sont encore peu connus mais ces fonctions « non classiques » des plaquettes semblent indépendantes de la formation d'un thrombus.

Ces observations suggèrent l'existence d'état(s) alternatif(s) et intermédiaire(s) d'activation des plaquettes, indépendants d'un phénotype pro-thrombotique et pro-coagulant. Pour tester cette hypothèse, nous avons stimulé des plaquettes lavées humaines avec des concentrations croissantes de collagène de type I ou de thrombine et caractérisé leurs réponses en analysant plusieurs paramètres : la morphologie, l'agrégation, l'exposition de la P-sélectine et de la phosphatidylsérine, l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, la sécrétion des facteurs solubles et la mobilisation du calcium intra-cytoplasmique.



Collagen Can Selectively Trigger a Platelet Secretory Phenotype via Glycoprotein VI

Véronique Ollivier^{1,2,3}, Varouna Syvannarath^{1,2,3}, Angèle Gros^{1,2}, Amena Butt^{1,3}, Stéphane Loyau^{1,2}, Martine Jandrot-Perrus^{1,2,4}, Benoît Ho-Tin-Noé^{1,2*}

1 Inserm Unit 1148, Laboratory for Vascular Translational Science, Paris, France, **2** Paris Diderot University, Paris, France, **3** Paris 13 University, Villetaneuse, France, **4** Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris, France

Abstract

Platelets are not only central actors of hemostasis and thrombosis but also of other processes including inflammation, angiogenesis, and tissue regeneration. Accumulating evidence indicates that these “non classical” functions of platelets do not necessarily rely on their well-known ability to form thrombi upon activation. This suggests the existence of non-thrombotic alternative states of platelets activation. We investigated this possibility through dose-response analysis of thrombin- and collagen-induced changes in platelet phenotype, with regards to morphological and functional markers of platelet activation including shape change, aggregation, P-selectin and phosphatidylserine surface expression, integrin activation, and release of soluble factors. We show that collagen at low dose (0.25 µg/mL) selectively triggers a platelet secretory phenotype characterized by the release of dense- and alpha granule-derived soluble factors without causing any of the other major platelet changes that usually accompany thrombus formation. Using a blocking antibody to glycoprotein VI (GPVI), we further show that this response is mediated by GPVI. Taken together, our results show that platelet activation goes beyond the mechanisms leading to platelet aggregation and also includes alternative platelet phenotypes that might contribute to their thrombus-independent functions.

Citation: Ollivier V, Syvannarath V, Gros A, Butt A, Loyau S, et al. (2014) Collagen Can Selectively Trigger a Platelet Secretory Phenotype via Glycoprotein VI. *PLoS ONE* 9(8): e104712. doi:10.1371/journal.pone.0104712

Editor: Christian Schulz, King's College London School of Medicine, United Kingdom

Received: March 13, 2014; **Accepted:** July 11, 2014; **Published:** August 12, 2014

Copyright: © 2014 Ollivier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by grants from DHU FIRE, la Fondation de France, and CORDDIM Région Ile de France to Benoît Ho-Tin-Noé. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: benoit.ho-tin-noe@inserm.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Platelets are most commonly known for their central role in hemostasis and thrombosis, both of which rely on the so-called mechanism of platelet activation. More precisely, current knowledge of platelet activation describes it as the transition from a functionally resting state to a procoagulant and prothrombotic platelet phenotype. This multistep process is initially evoked by interactions of platelets with adhesive components of the subendothelial extracellular matrix at sites of vascular injury or by soluble platelet agonists. Such stimulated platelets go through morphological changes but above all, they undergo functional changes, with activation and surface expression of integrins and other adhesion molecules, exposure of procoagulant phosphatidylserine, and secretion of thrombogenic substances from their storage granules. Altogether, these changes result in the formation of either the primary hemostatic plug or a pathologic thrombus [1–3]. This pattern of platelet activation has been extensively studied and is now widely accepted as the mechanism supporting platelet contribution to primary hemostasis and thrombosis. For this reason, when talking about platelet activation, one usually refers to this stereotypic adhesive, procoagulant and prothrombo-

tic platelet state. Nevertheless, evidence that platelets can present various levels of activation has been clearly provided by *in vitro* and *in vivo* experiments showing that the acquisition of their aggregative function is a sequential and gradual process, with reversible and irreversible steps [4–7]. The concept of differential platelet activation is further supported by recent results showing that hemostatic plugs are heterogeneous in composition, with regional differences in the extent of platelet activation [8]. Moreover, it has been shown *in vitro* that platelets can differentially release cytokines [9] and angiogenic factors [10–12] in an agonist dependent-manner.

The relevance of alternative states of platelet activation becomes very likely if one considers that currently platelets are not only recognized as central actors of hemostasis and thrombosis, but also as regulators of many other pathophysiological processes including innate and adaptive immune responses [13,14], angiogenesis [15,16], or wound healing [17]. Although the exact mechanisms underlying these “non classical” functions of platelets have not been fully elucidated, there is substantial evidence that they do not necessarily rely on the classically described activation state of platelets. For example, platelets have been shown to exert a vasculoprotective action in various inflamed organs including the

skin, lungs, kidneys, and solid tumors, and this, before any signs of thrombosis are evident [18–21]. The fact that thrombus formation is dispensable for this beneficial action of platelets suggests the existence of alternative states of platelet activation that might be uncoupled from their procoagulant and/or prothrombotic activities. Here, we investigated this possibility through dose-response analysis of thrombin- and collagen-induced changes in platelet phenotype, with regards to morphological and functional markers of platelet activation including shape change, aggregation, integrin activation, P-selectin surface expression, and secretion of soluble compounds. Our results show that collagen at low dose triggers a non-thrombotic platelet secretory phenotype characterized by the release of various soluble platelet factors in the absence of the classical activation-associated changes.

Methods

Ethics Statement

All blood donors were volunteers who gave their free and informed written consent to this research study, which conforms to the ethical standards of the Declaration of Helsinki. Legal and ethical authorization for research use of collected blood was obtained through a national convention between the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm) and the French Blood Institute (EFS) (convention number I/DAJ/C2675).

Washed platelet preparation and stimulation

Blood from healthy volunteers who had taken no medication during the previous two weeks, was drawn into 15% (v/v) trisodium citrate acid–citric–dextrose (ACD-A, Vacutainer system; Beckton Dickinson, Le Pont-de-Clais, France). Washed platelets were prepared from isolated platelet rich plasma as previously reported [22] and resuspended at a final concentration of 2.10^8 /mL in platelet reaction buffer (Hepes 5 mM, NaHCO_3 12 mM, NaCl 137 mM, KCl 2 mM, CaCl_2 2 mM, NaH_2PO_4 0.3 mM, MgCl_2 1 mM, glucose 5.5 mM, pH 7.4). At the end of the platelet preparation and before adding the agonists, platelets were allowed to recover from PGE1 and apyrase treatments for 20 min at 37°C. Washed platelets were then incubated with increasing doses of thrombin (purified human α -thrombin, 0.1 NIH unit/nM [23]) or fibrillar collagen from equine tendon (Horm collagen, Nycomed, Munich, Germany), either in static or stirring (500 rpm) conditions for 15 min at 37°C. In an alternative set of experiments, platelets ($400 \mu\text{L}$ at 2.10^8 /mL) were stimulated in Millicell culture inserts ($0.4 \mu\text{m}$ pore size, polycarbonate membrane, Millipore, Billerica, MA, USA) placed into 24-well plates containing $800 \mu\text{L}$ of reaction buffer, and incubated for 30 min at 37°C on an orbital shaker.

Analysis of platelet morphology and P-selectin immunostaining

At the end of the incubation, $50 \mu\text{L}$ of resting or stimulated washed platelets were fixed in $950 \mu\text{L}$ of 3.7% paraformaldehyde (PFA) and centrifuged onto glass slides (15 min, 1200 g) for analysis by differential interference contrast (DIC) microscopy. For P-selectin immunostaining, platelets were permeabilized on ice with 0.1% Triton X-100 in 0.1 M citrate buffer, pH 6.0 and subjected to saturation with PBS at 3% bovine serum albumin (BSA), prior to incubation with a mouse monoclonal antibody to human P-selectin (BD Biosciences, San Jose, CA) at $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS 1% BSA and 0.1% Tween 20. An Alexa Fluor 488-conjugated rabbit polyclonal antibody to mouse IgG (Life Technologies, Saint Aubin, France) at $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ was used as a

secondary antibody. The slides were mounted with fluorescence mounting medium (Dako, Carpinteria, CA). Observation and acquisition of DIC and fluorescence microscopy images were made using a Zeiss Axio Observer microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France).

Flow Cytometry

Resting and stimulated platelets ($5 \mu\text{L}$) were incubated with a FITC-conjugated anti-P-selectin antibody or corresponding isotype-matched control (Beckman Coulter Immunotech, Marseille, France) in a final volume of $50 \mu\text{L}$ PBS. Integrin activation was assessed in a similar manner using the FITC-conjugated PAC1 antibody to activated glycoprotein IIb/IIIa. Phosphatidylserine exposure was quantified by annexin V labeling using Cy5-coupled annexin V (BD Pharmingen, San Diego, CA). A cell sample to which 5 mM EDTA was added just prior to staining with Cy5-coupled annexin V was used as a negative control. Samples were analyzed by flow cytometry using a LSRII apparatus (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

For measurement of soluble PF4 directly in platelet suspensions, we used a fluorescent microsphere-based flow cytometric immunoassay. Briefly, COOH-functionalized green fluorescent microspheres (Estapor F1XC-200, $2.45 \mu\text{m}$ diameter, Millipore) were coated with a mouse anti-human PF4 antibody ($9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bead surface area, R&D systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. At the end of the incubation of stirred platelets, microspheres were added to $50 \mu\text{L}$ platelet suspension aliquots at a final concentration of 20 000 microspheres/ μL , together with biotinylated goat IgG to human PF4 (R&D systems) and Alexa Fluor 647 streptavidin (Life Technologies). Microspheres in platelet suspensions were identified in flow cytometry by their green fluorescence and light-scattering characteristics, and their mean Alexa 647 fluorescence intensity was measured. Mean Alexa 647 fluorescence intensities were then converted into PF4 concentration according to a standard curve determined by incubating microspheres with known amounts of recombinant human PF4 (R&D systems).

Platelet aggregation

Platelet aggregation was measured by turbidimetry at 37°C under stirring conditions in the absence of exogenous fibrinogen. Washed platelets (2.10^8 /mL) in platelet reaction buffer were activated by addition of the agonists and aggregation was followed for 8 min using an ARACT-4004 aggregometer (LABiTec, Ahrensburg, Germany).

Calcium Signaling

Washed platelets (3.10^8 /mL) in 5 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.3 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 5.5 mM glucose, pH 7.4 (assay buffer) were incubated at 37°C for 30 min with $5 \mu\text{M}$ Oregon Green 488 BAPTA-1AM (Life Technologies, St Aubin, France). ACD-A (1/10 vol), apyrase (0.30 U/mL), PGE-1 ($0.1 \mu\text{M}$) and five volumes of wash buffer (36 mM citric acid, 5 mM glucose, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 103 mM NaCl, 0.3 U/mL apyrase, 0.1 μM PGE-1, 0.1% BSA, pH 6.5) were then added to platelets before a 12 min centrifugation step at 1200 g. Platelets were resuspended at 2.10^8 /mL in assay buffer supplemented with 2 mM CaCl_2 , and distributed in 96-well flat-bottomed plates. Basal fluorescence of Oregon Green 488 BAPTA-1AM-loaded platelets was followed for 2 min and calcium-dependent changes in fluorescence intensity were then recorded for 5 min after adding the agonists using a 96-well plate fluorimeter (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems, Dreieich, Germany).

ELISA analysis of platelet releasates

At the end of the incubation of platelets with or without the agonists and after taking platelet samples for analysis in flow cytometry and microscopy, supernatants of the remaining platelets were collected after two centrifugation steps: 12 min, 1200 g at RT and 3 min, 13000 g at RT. Aliquots of supernatants were kept frozen at -80°C until analysis. The following ELISAs were used in accordance with the manufacturer's instructions: serotonin (GenWay, San Diego, CA, USA), platelet factor 4 (PF4) (RayBiotech, Norcross, GA, USA), TGF- β 1 (Enzo Life Science, Villeurbanne, France) and angiopoietin-1 (Abcam, Paris, France).

Measurement of ATP levels

ATP levels were measured by chemiluminescence using the ATPLite Assay System (PerkinElmer, Boston, MA). ATPLite reagent was added directly to platelet suspensions or supernatants at a 1:10 dilution and luminescence was read using a SpectraFluor Plus plate reader (Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria).

Statistics

Data are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM) and were compared by the non-parametric Mann-Whitney test using Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, PA). P-values < 0.05 were regarded as statistically significant.

Results

Dose-response analysis of thrombin- and collagen-induced platelet aggregation and shape change

To assess platelet activation and triggering of their thrombogenic phenotype by thrombin and collagen, we first analyzed aggregation and shape changes of human washed platelets in response to increasing concentrations of these two primary platelet agonists. Aggregation of stirred platelets was induced by thrombin at the highest concentration tested (5 nM), but not at the intermediate (0.5 nM) or low concentration (0.05 nM) (Figures 1A, C). To determine individual platelet morphological response, human washed platelets were incubated with the agonists without stirring and analyzed by DIC microscopy. All three thrombin concentrations provoked obvious changes in platelet shape, with membrane protrusions being already visible at the lowest thrombin concentration (Figure 1D). In addition to intensifying the formation of membrane protrusions, increasing thrombin concentration further led to platelet swelling and emission of microvesicles (Figure 1D). Thus, at low and intermediate doses of thrombin, despite the absence of an aggregative response, platelets already showed signs of activation at the individual level.

In response to collagen, platelet aggregation occurred at both the intermediate (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and high concentration (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), but not at the low concentration (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figures 1B, C). Regarding platelet shape, collagen led to much more discrete changes than thrombin, with the sole induction of membrane protrusions at both intermediate and high concentrations, and no changes at the low concentration (Figure 1E).

Phosphatidylserine exposure

Clot formation does not only rely on the adhesive and aggregative properties of activated platelets but also on their ability to support coagulation, notably through the exposure of phosphatidylserine at their surface [24]. Therefore, to further evaluate the thrombogenic phenotype and activity of human platelets exposed to various concentrations of collagen or

thrombin, we compared their level of surface phosphatidylserine to that of resting platelets. Annexin V binding to platelets, a well established marker of phosphatidylserine surface exposure [25], was not modified by low (0.05 nM) concentration of thrombin (Figures 2A, B). However, at the highest concentration of thrombin (5 nM), which caused platelet aggregation (Figures 1A, C) and important shape changes (Figure 1D), a significant increase in annexin V binding to platelets was observed, thus indicating the induction of phosphatidylserine externalisation (Figures 2A, B). A modest but statistically significant increase in annexin V binding was also observed in response to the intermediate dose of thrombin (0.5 nM). Regarding collagen-stimulated platelets, annexin V binding to platelet was also observed at concentrations inducing aggregation (5 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) but not at 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figures 2A, B).

P-selectin surface expression

P-selectin, a transmembrane protein anchored in the membrane of platelet alpha-granules, is translocated to the platelet surface during activation-associated alpha-granule secretion [26,27]. For this reason, measurement of P-selectin surface expression by flow cytometry is widely used as a marker of platelet activation and degranulation, and this, both in clinical and experimental settings [28–30]. When assessing platelet activation status and alpha-granule secretion by this method, we observed that P-selectin surface expression was induced by thrombin at the highest dose of 5 nM, and also, though much more slightly, at the intermediate dose of 0.5 nM (Figures 3A–B). Collagen significantly increased P-selectin exposure only at the highest dose (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figures 3A–B). These results were confirmed by immunostaining. A granule-like punctiform staining was observed on control resting platelets (Figure 3C). The same punctiform staining was obtained for platelets treated with 0.25 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ collagen (Figure 3C). In contrast, platelets that had been activated by 5 nM thrombin showed a clear peripheral distribution of P-selectin. An “intermediate” staining pattern was observed for platelets activated by 0.5 nM thrombin or 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ collagen, with a more diffuse staining and a loss of granular pattern (Figure 3C).

Secretion of dense and alpha granule-derived bioactive agents

In addition to provoking platelet shape change, aggregation and procoagulant activity, platelet activation is also known to induce the secretion of a multitude of soluble bioactive agents from platelet storage granules. Therefore, in order to further characterize the activation status of platelets exposed to various doses of thrombin and collagen, we measured and compared the release of soluble factors by control and agonist-stimulated platelets. Supernatants recovered from the very same platelet samples that were analyzed in flow cytometry and in DIC and fluorescence microscopy were then analyzed for the presence of platelet-derived soluble factors. For this analysis, we focused on factors for which platelets represent the main source in blood: serotonin and ATP, which are stored in platelet dense granules [19,31], and PF4, TGF- β 1, and angiopoietin-1, all of which are abundantly stored in platelet alpha-granules [19,32–35]. The release of serotonin by platelets was increased in a dose-dependent manner by thrombin with statistical significance being reached already at the lowest concentration tested (0.05 nM) (Figure 4A). In contrast, there was no real dose–response effect for collagen. In fact, collagen at the lowest dose (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly and substantially stimulated serotonin secretion with no notable further increase at higher doses (Figure 4A). Notably, the response profiles of platelets to thrombin and collagen were confirmed when dense granule

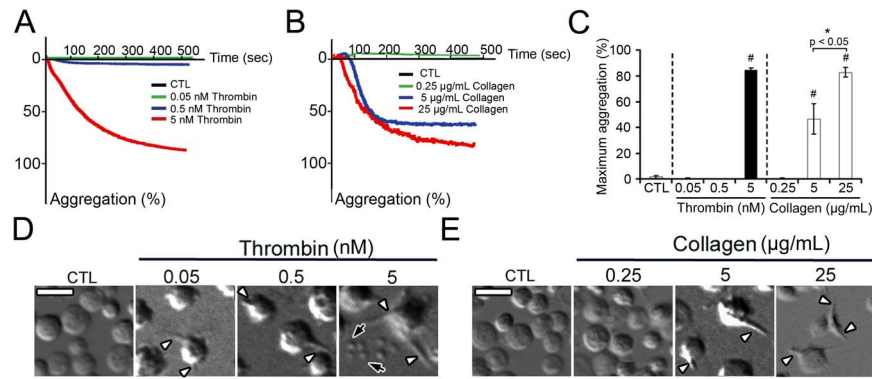


Figure 1. Dose-response analysis of thrombin- and collagen-induced platelet aggregation and shape change. The aggregation of human washed platelets in response to various concentrations of thrombin or collagen was analyzed by turbidimetry under stirring conditions in the absence of exogenous fibrinogen. In parallel, the individual morphological changes induced by the same concentrations of agonists were analyzed by DIC microscopy. **A–B.** Diagrams showing representative dose-response aggregation tracings obtained for thrombin (**A**) and collagen (**B**). CTL corresponds to non-treated resting platelets. **C.** Bar graph showing the mean maximum platelet aggregation in response to various doses of thrombin or collagen. # indicates a significant statistical difference ($p < 0.05$) from non-stimulated resting human washed platelets (CTL). $n = 5$ different blood donors. **D–E.** DIC microscopy images of the morphological aspect of platelets after incubation with or without the indicated concentrations of thrombin (**D**) or collagen (**E**). The images shown are representative of 6 independent experiments performed with different blood donors. Scale bars = 5 μm . White arrowheads indicate platelet membrane protrusions, black arrows indicate microvesicles. doi:10.1371/journal.pone.0104712.g001

secretion was assessed by measurement of ATP levels (Figure 4B). For PF4, TGF- β 1, and angiopoietin-1, stimulation of platelets with thrombin and collagen led to secretion patterns comparable to those obtained for serotonin (Figures 4A–E), with a clear dose-response effect for thrombin and an almost maximum effect of collagen from the lowest dose used.

Taken together, these results suggest that collagen at low dose can efficiently induce the release of dense- and alpha granule-derived soluble factors without triggering aggregation (Figure 1B), phosphatidylserine exposure (Figure 2), or P-selectin surface expression (Figure 3). However, because centrifugations were required for the preparation of platelet supernatants while all other parameters were measured in the absence or before centrifugation, we investigated whether the release of soluble factors by platelets in response to low-dose collagen in the absence

of any other notable changes could be linked to this technical issue. To recover platelet releasates without the need for centrifugation, experiments using transwell systems (0.4 μm pore size) were performed. Platelets were placed and stimulated into the upper chamber (transwell insert) and, at the end of the incubation, the cell-free medium containing diffusible secretion products was directly collected from the lower chamber while platelets were recovered from the upper chamber for flow cytometric analysis. In these conditions, the results from flow cytometry analysis of P-selectin and phosphatidylserine expression were identical to those presented in Figure 2 and 3 (and therefore not shown). As for the release of soluble factors, while the response pattern of platelets to thrombin remained unchanged (not shown), that to collagen, on the other hand, was appreciably modified. Indeed, although in these conditions collagen did induce a statistically significant

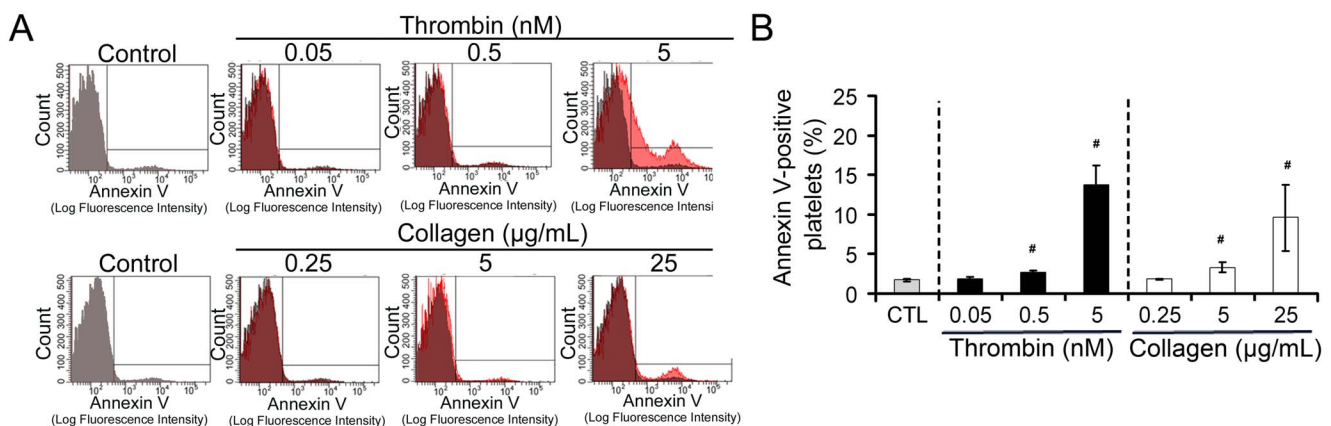


Figure 2. Dose-response analysis of thrombin- and collagen-induced phosphatidylserine exposure in human platelets. Phosphatidylserine exposure by human washed platelets was quantified by measurement of fluorescent annexin V binding in flow cytometry. **A.** Representative flow cytometry histograms of annexin V binding to non-stimulated resting (control) platelets or to platelets incubated with various concentration of thrombin or collagen, as indicated above the charts. The histogram obtained for control platelets was superimposed in grey to that of stimulated platelets for better visualization of fluorescence shifts. **B.** Bar graph representing the mean annexin V binding to non-treated control platelets (CTL) and to thrombin- or collagen-stimulated platelets. Results are expressed as percent relative to the mean fluorescence intensity of CTL platelets. $n = 4$ different blood donors, # indicates a significant statistical difference ($p < 0.05$) from CTL platelets. doi:10.1371/journal.pone.0104712.g002

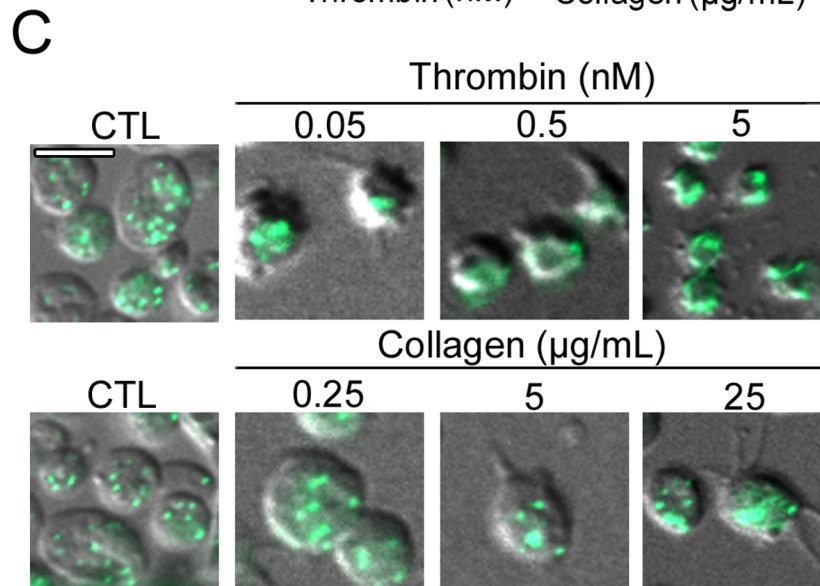
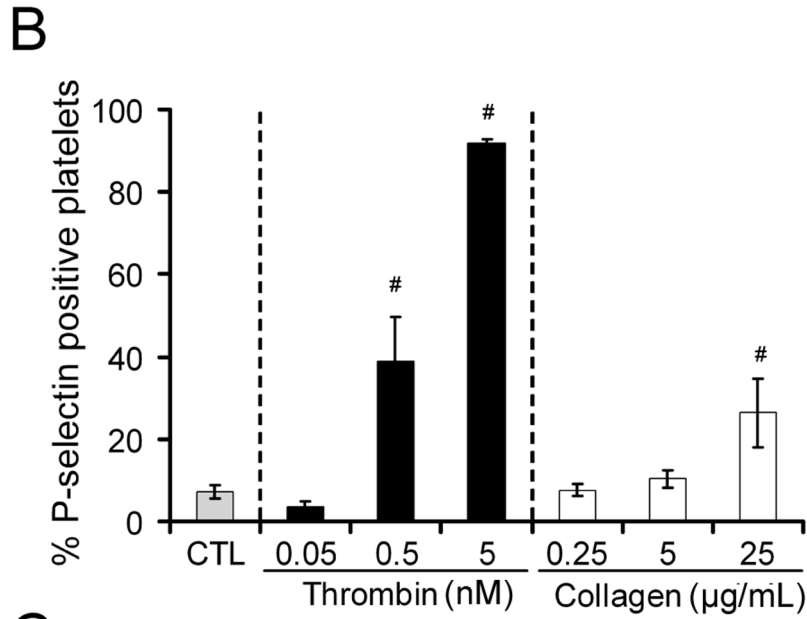
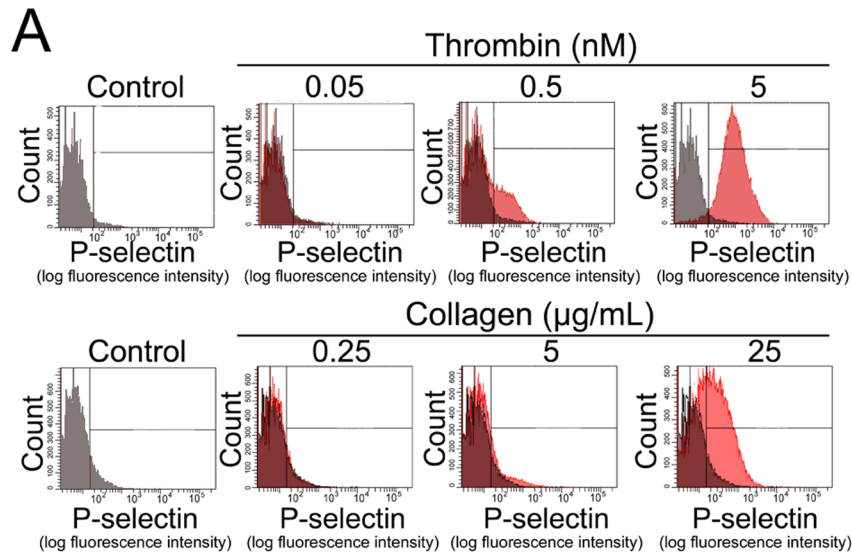


Figure 3. Dose-response analysis of thrombin- and collagen-induced P-selectin surface expression. **A.** Representative flow cytometry histograms of P-selectin surface expression of non-treated (control) and thrombin- or collagen-treated platelets, as indicated. The histogram obtained for control platelets was superimposed in grey to that of stimulated platelets for better visualization of fluorescence shifts. **B.** Bar graph representing the mean percentage of P-selectin-positive cells of non-treated control (CTL) and thrombin- or collagen-stimulated platelets. $n=8$ independent experiments with different blood donors, # indicates a significant statistical difference ($p<0.05$) from CTL. **C.** Immunolocalization of P-selectin (green) in permeabilized control and agonist-stimulated platelets. Merged images of DIC and green fluorescence are shown. Bar = 5 μm . doi:10.1371/journal.pone.0104712.g003

increase in the release of dense and alpha granule-derived soluble factors from the lowest concentration tested (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a dose-dependent profile was observed (Figure S1), contrasting with the maximal effect already obtained at the lowest collagen dose when analysing centrifugation supernatants (Figures 4A–D). This dose-dependent profile was further confirmed by experiments in which platelets were stimulated under stirring conditions. In these experiments, the release of soluble factors from dense and alpha granules was assessed directly in platelet suspensions. Dense granule secretion was estimated by measuring ATP levels using a luminescence-based assay and for quantification of alpha granule secretion, we developed a microspheres-based flow cytometric immunoassay. Stimulation of stirred platelets with collagen induced a dose-dependent increase in the release of ATP and PF4, with statistical significance being reached from the lowest collagen dose (Figure 5A–B). Again, the release of these soluble factors in response to 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ collagen occurred in the absence of significant P-selectin or phosphatidylserine surface exposure, and of integrin activation as assessed by PAC-1 binding to platelets (Figure 5C–E). Such a secretory response was not obtained for collagen at 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (not shown). Notably, and in contrast to what was observed on platelets stimulated in static conditions (Figure 2), a significant increase in P-selectin surface expression was induced by collagen at 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 5C), a concentration that induced platelet aggregation (Figure 1). Taken together, these results show that collagen at low dose can efficiently induce the release of dense- and alpha granule-derived soluble factors without triggering aggregation, phosphatidylserine exposure, or P-selectin surface expression. They further show that this secretory response is exaggerated by centrifugation of platelets.

Role of calcium and GPVI signaling in low-dose collagen-induced platelet secretion

Activation of platelets by most stimulatory agents leads to a rise in the concentration of cytosolic Ca^{2+} which can elicit various platelet responses including shape change, spreading, adhesion, aggregation, procoagulant activity, and granule secretion [36,37]. Therefore, we verified whether or not stimulation of platelets with low-dose collagen (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), which led to secretion of platelet soluble factors in the absence of other notable changes (Figures 1, 2, 3, 4, 5), was associated with an increase in cytosolic Ca^{2+} . Collagen at intermediate and high concentration triggered an initial continuous rise followed by oscillations in intraplatelet Ca^{2+} (Figure 6A) while thrombin at intermediate and high concentration provoked a steep and transient calcium peak (Figure S2). In contrast, no change in intraplatelet Ca^{2+} levels occurred after addition of collagen at 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 6A). Similar absence of calcium was also observed when stimulating platelets with 0.05 nM thrombin (Figure S2), a concentration for which the only notable changes observed were a slight shape change and a discrete release of serotonin (Figures 1, 2, 3, 4, 5). These results show that low-dose collagen-induced platelet activation is not associated with a substantial rise in intracellular Ca^{2+} .

Since GPVI is the major collagen receptor on platelets and mediates collagen-induced platelet activation in regard to platelet aggregation and procoagulant activity, we assessed the contribution

of GPVI-signalling to low-dose collagen-induced secretion of platelet soluble factors. For this, platelets were stimulated with 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ collagen in the presence or absence of a GPVI blocking Fab fragment antibody (Fab 9O12, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the levels of serotonin, TGF- β 1, and angiotensin-1 were then measured in platelet supernatants. For all three factors, the secretory response of platelets to low-dose collagen was completely inhibited by blocking of GPVI (Figure 6B–D), thus demonstrating its dependency on GPVI signalling.

Discussion

In the present study, we investigated whether or not platelets could display state(s) of activation different from that known to support their role in primary hemostasis and thrombosis. To answer this question, we analyzed and compared the changes in platelet phenotype caused by various doses of thrombin and collagen which represent the two strongest physiological primary agonists of platelets. We found that collagen at low dose (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) selectively triggers a platelet secretory response without causing any of the other major changes that usually accompany platelet activation and that were observed at higher collagen concentrations. More precisely, stimulation of platelets with low-dose collagen led to significant secretion of dense- and alpha granule-derived soluble factors, and this without causing platelet aggregation or surface exposure of phosphatidylserine and P-selectin. Notably, such a selective secretory response of platelets was not observed when thrombin was used as an agonist. In fact, thrombin at low dose only slightly increased serotonin secretion by platelets and did not lead to secretion of alpha granule-derived PF4, TGF- β 1, or angiotensin-1. Furthermore, this secretory response was associated with a clear induction of platelet shape change. Although at higher concentrations thrombin did induce a significant release of both dense and alpha granule-derived soluble factors, this response was associated with one or more additional platelet activation-associated changes. Taken together, these results show that as previously described for P-selectin and phosphatidylserine exposure [25,38], selective triggering of the platelet secretory response is dependent on both the agonist used and its concentration. In addition to support the idea that the response pattern of activated platelets is context-related, our data indicates that platelet activation includes situations in which the secretory activity of platelets is dissociated from their ability to form thrombi.

Interestingly, we found that the release of various alpha granule-derived soluble factors by platelets exposed to low-dose collagen was not associated with an increase in the surface expression of P-selectin, a transmembrane protein widely known to reside in the alpha granule membrane. This discrepancy between the secretion pattern of membrane P-selectin and alpha granule-derived soluble factors might have several implications. First, it might reflect differences in the kinetics of secretion between soluble and transmembrane factors that would however be released from similar granules. Results from a recent study by Jonnalagadda *et al.* have shown that molecules stored in presumably similar granules could display differences in their rate of secretion due to

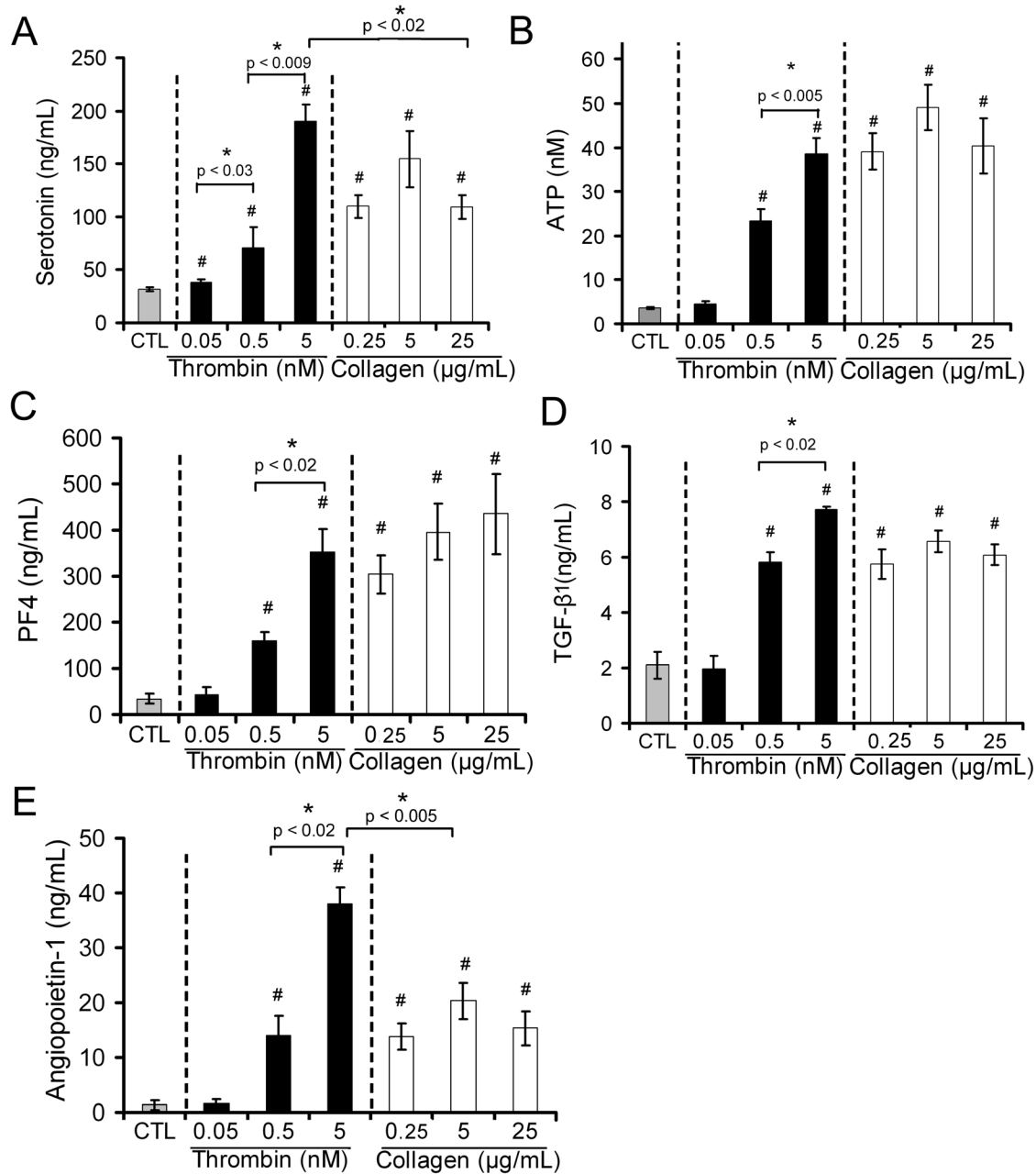


Figure 4. Dose-response relationship between agonist concentration and secretion of dense and alpha-granule-derived bioactive agents. The release of dense and alpha-granule components by human platelets in response to various concentrations of thrombin and collagen was assessed and compared by measuring serotonin (A), ATP (B), platelet factor 4 (PF4) (C), TGF-β1 (D), and angiopoietin-1 (E) levels in platelet supernatants. All bar graphs represent the mean levels calculated from 6 independent experiments performed with different blood donors. # indicates a significant statistical difference ($p < 0.05$) from CTL. doi:10.1371/journal.pone.0104712.g004

possible differences in solubility, granule shape, and/or granule-plasma membrane fusion routes [39]. One can then imagine that it might be easier for a soluble factor to diffuse out of the open canalicular system (OCS) into the extracellular medium than for a transmembrane protein to migrate from the OCS to the surface within the membrane lipid bilayer. Moreover, immunolocalisation of P-selectin in low-dose collagen-treated platelets revealed a granular staining pattern similar to that of untreated platelets. Therefore, the absence of surface P-selectin on low-dose collagen-stimulated platelets might just reflect the need for platelet contraction and shape change for P-selectin to be externalized

together with the OCS. Also, another possibility is the existence of various subtypes of and/or subdomains in alpha granules whose cargo molecule secretion would be differentially regulated in a dose- and agonist-dependent manner. Several studies have shown that differential sorting of alpha granule cargo in distinct subtypes or domains of alpha granules can result in their differential release [10,40–43]. In this context, it is noteworthy that the maximum effect of thrombin on serotonin and angiopoietin-1 secretion was higher than that of collagen, showing that thrombin can specifically increase the secretion of these factors. This could be achieved by complete versus partial emptying of similar alpha

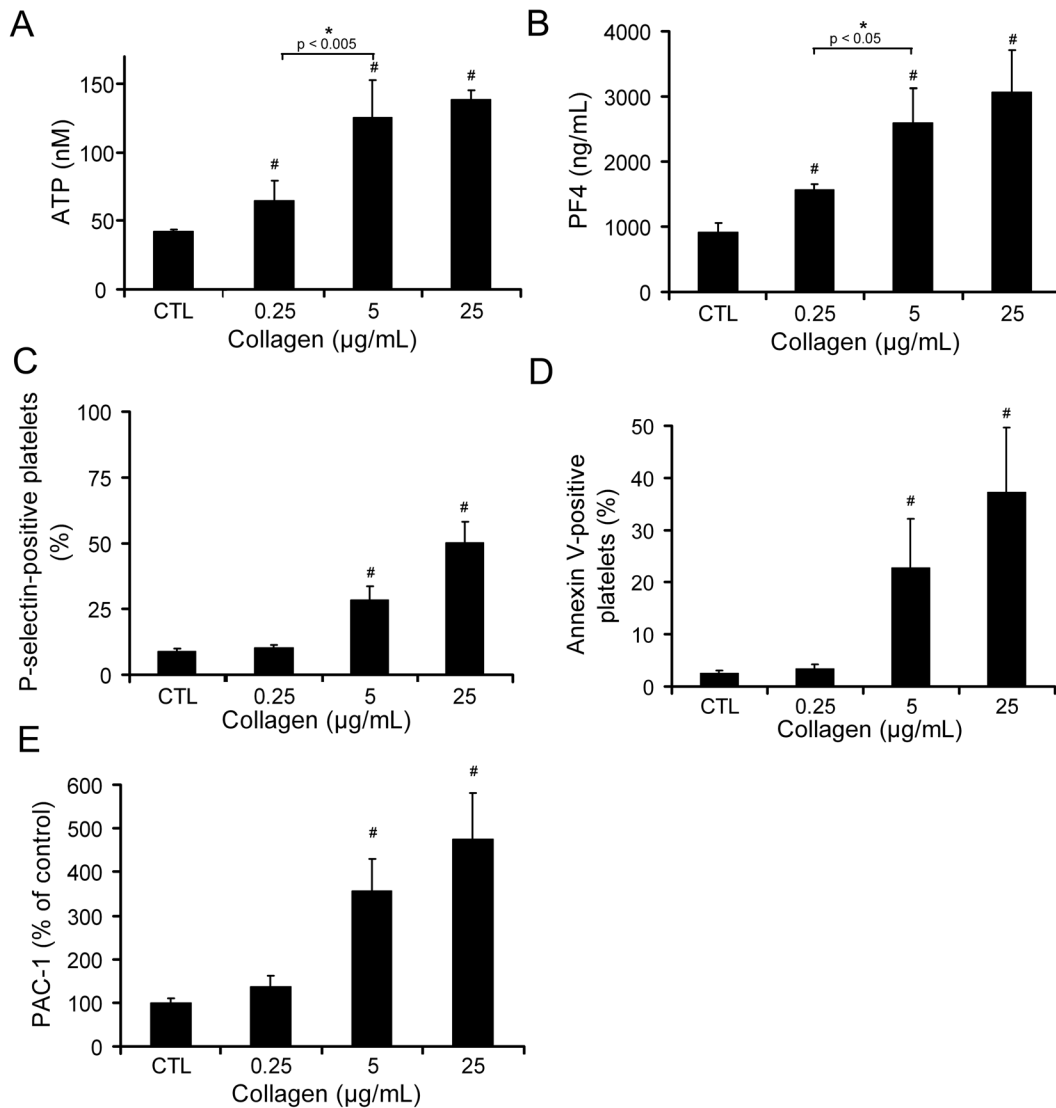


Figure 5. Comparison of soluble factor release and surface activation marker expression by stirred platelets exposed to collagen. **A.** ATP levels in suspensions of stirred platelets as determined using a luminescence-based assay. **B.** PF4 levels in suspensions of stirred platelets as determined using a fluorescent microspheres-based flow cytometric immunoassay. **C–E.** Surface exposure of P-selectin (**C**) and phosphatidylserine (**D**), as well as binding of the PAC-1 antibody to activated GPIIb/IIIa (**E**) on stirred platelets were measured by flow cytometry. All bar graphs represent means calculated from a minimum of 4 independent experiments performed with different blood donors. # indicates a significant statistical difference ($p < 0.05$) from CTL.

doi:10.1371/journal.pone.0104712.g005

granules, or by mobilization of additional and/or different alpha granules by thrombin as compared to collagen. All in all, these differences in the release of diffusible factors in response to various stimuli that all cause maximal aggregation reinforces the idea that platelet activation is far from being univocal [8,39].

Considering the fact that platelets have been shown to exert thrombus-independent regulatory actions in various inflamed organs and solid tumors [18,19,44], our findings bring new mechanistic insights that might partly explain these effects. Previous studies have suggested the implication of platelet granule content in the prevention of tumor hemorrhage by platelets, possibly through regulation of vascular permeability and immune cell activities [19,44,45]. Also, platelet-derived serotonin has been shown to mediate liver regeneration [46]. We show here that collagen at low dose leads platelets to release serotonin, PF4, angiotensin-1, and TGF- β 1, all of which have immunomodula-

tory properties and/or the ability to regulate endothelial permeability. Moreover, it was shown recently that the vasculo-protective action of platelets in inflamed organs is dependent on ITAM receptors including GPVI [21], a receptor which we found to mediate the secretory response of platelets to low-dose collagen.

Furthermore, we observed that this selective secretory response of platelets to low-dose collagen was not associated with a sustained rise in intracellular calcium. In a similar manner, the prevention of inflammatory bleeding by platelets was shown previously to be independent of the calcium and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor 1 (CalDAG-GEF1) [18,19,21], a molecule which is central to calcium signalling in platelets [47]. Whether or not the collagen-induced platelet secretory phenotype we described here does actually contribute to the prevention of inflammatory bleeding by platelets however remains to be verified. The absence of substantial rise in

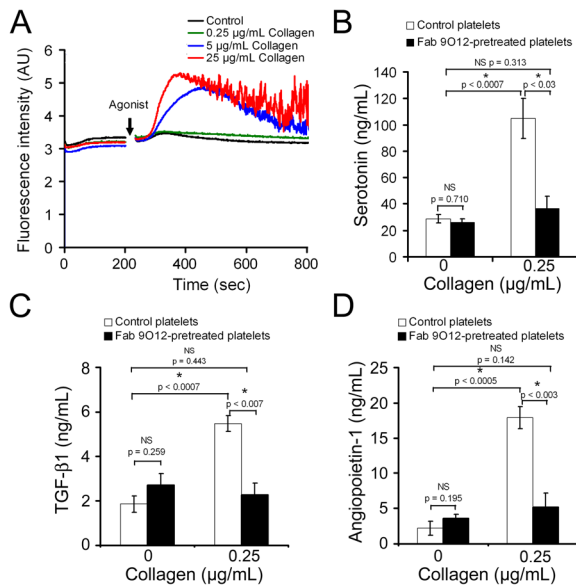


Figure 6. Low dose collagen-induced platelet secretion requires GPVI signalling. **A.** Intracellular calcium levels in collagen-stimulated platelets as assessed by measurement of calcium-dependent fluorescence of Oregon Green 488 BAPTA-1AM-loaded platelets. The calcium curves shown are representative of four independent experiments using different blood donors. **B–D.** To assess the contribution of GPVI-signalling to low-dose collagen-induced secretion of platelet soluble factors, platelets were stimulated with 0.25 µg/mL collagen in the presence or absence of a GPVI blocking Fab fragment antibody (Fab 9O12, 50 µg/mL) and the levels of serotonin (**B**), TGF-β1 (**C**), and angiopoietin-1 (**D**) were then measured in platelet supernatants. All bar graphs represent the mean levels from a minimum of 4 independent experiments. NS: non-statistically significant. doi:10.1371/journal.pone.0104712.g006

intracellular calcium might also indicate that basal calcium levels are sufficient to promote the secretory response induced by low-dose collagen. Studies of secretory cells such as adrenal chromaffin cells and neurons have shown that secretion can occur at low intracellular calcium levels through a mechanism of incomplete and transient fusion of secretory vesicles with the plasma membrane. The shift from this so-called “kiss-and-run” mechanism to full exocytosis occurs when cell stimulation is accompanied by high intracellular calcium levels [48,49]. A kiss-and-run mechanism, for which evidence of its existence in platelets has been brought by single-cell amperometry studies [50,51], could thus explain the secretory response of platelets to low-dose collagen while full collapse fusion with externalization of P-selectin

References

- Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H (2011) Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews* 25: 155–167.
- Broos K, De Meyer SF, Feys HB, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H (2012) Blood platelet biochemistry. *Thrombosis research* 129: 245–249.
- Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH (2013) New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 93: 327–358.
- Trumel C, Payraastre B, Plantavid M, Hechler B, Viala C, et al. (1999) A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 94: 4156–4165.
- Ohlmann P, Eckly A, Freund M, Cazenave JP, Offermanns S, et al. (2000) ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of Galphaq. *Blood* 96: 2134–2139.
- Missy K, Plantavid M, Pacaud P, Viala C, Chap H, et al. (2001) Rho-kinase is involved in the sustained phosphorylation of myosin and the irreversible platelet aggregation induced by PAR1 activating peptide. *Thromb Haemost* 85: 514–520.
- Maxwell MJ, Westein E, Nesbitt WS, Giuliano S, Doppeide SM, et al. (2007) Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood* 109: 566–576.
- Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, et al. (2013) Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood* 121: 1875–1885.
- Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, et al. (2008) Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *British journal of haematology* 141: 84–91.
- Italiano JE, Jr., Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, et al. (2008) Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet {alpha} granules and differentially released. *Blood* 111: 1227–1233.
- Bambace NM, Levis JE, Holmes CE (2010) The effect of P2Y-mediated platelet activation on the release of VEGF and endostatin from platelets. *Platelets* 21: 85–93.

would occur at higher agonist concentrations associated with a marked increase in intracellular calcium.

In conclusion, our results show that platelet activation goes beyond the mechanisms leading to thrombus formation and also includes alternative platelet phenotypes that might contribute to their thrombus-independent functions. Also, the fact that GPVI can mediate the release of potent immunomodulators and regulators of vascular permeability without evoking platelet aggregation or procoagulant activity provides a new conceptual view on GPVI/collagen interactions that reconciles GPVI with its immune receptor nature.

Supporting Information

Figure S1 Secretory response of platelets to collagen in static conditions. To assess the release of soluble factors by platelets in response to collagen independently of mechanical agitation, platelets were placed and stimulated into transwell inserts (pore diameter 0.4 µm), and the cell-free medium containing diffusible secretion products was collected from the lower chamber. Levels of serotonin (**A**), ATP (**B**), and platelet factor 4 (PF4) (**C**) in platelet releasates were measured as reflects of dense and alpha granule secretion, respectively. Results are expressed as percent relative to the mean levels found in releasates of unstimulated control platelets. n = at least 6 different blood donors, # indicates a significant statistical difference (p<0.05) from unstimulated control platelets. (TIF)

Figure S2 Intracellular calcium levels in thrombin-stimulated platelets. Calcium levels of Oregon Green 488 BAPTA-1AM-loaded platelets treated with thrombin were measured using a fluorescence microplate reader. The calcium curves shown are representative of four independent experiments using different blood donors. (TIF)

Raw Data S1
(XLS)

Acknowledgments

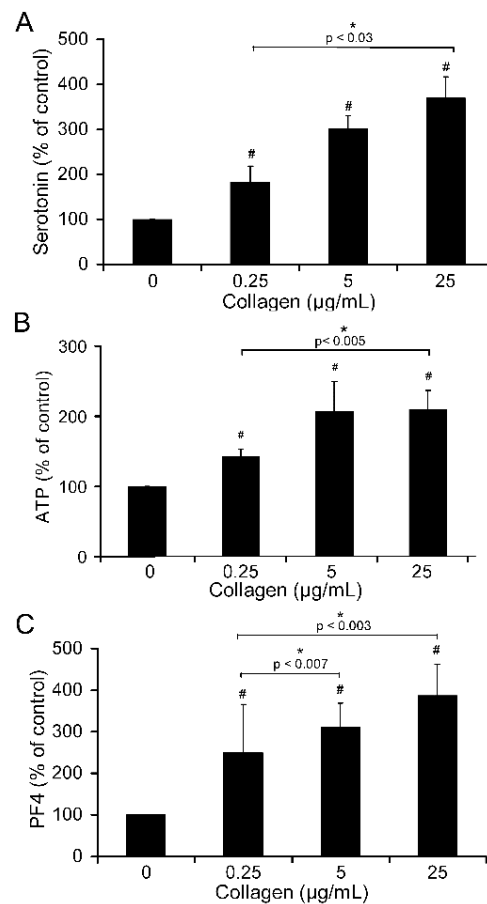
The authors would like to thank K. Sorouri from McMaster University and R. Bayles from Inserm U1148 for their help in editing this manuscript.

Author Contributions

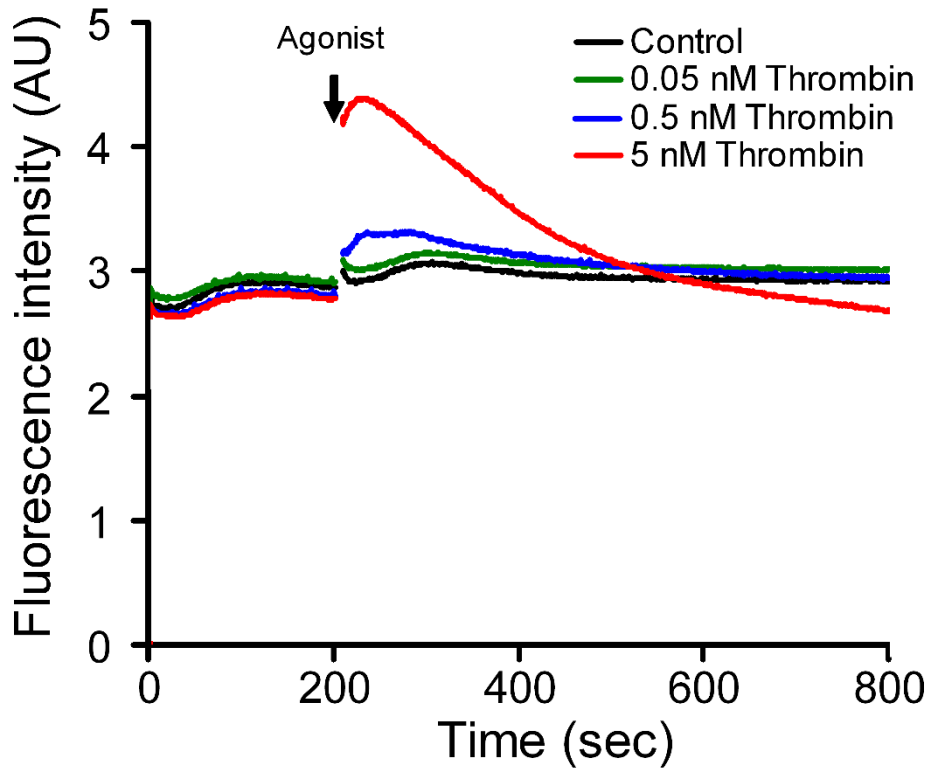
Conceived and designed the experiments: VO MJ-P SL BH. Performed the experiments: VO AB VS AG BH. Analyzed the data: VO AB VS AG BH. Contributed reagents/materials/analysis tools: MJ-P SL. Wrote the paper: BH VO.

12. Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE, Jr. (2011) Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood* 118: 1359–1369.
13. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J (2011) Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 11: 264–274.
14. Li C, Li J, Li Y, Lang S, Yougbare I, et al. (2012) Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries. *Adv Hematol* 2012: 384685.
15. Brill A, Elinav H, Varon D (2004) Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis. *Cardiovascular research* 63: 226–235.
16. Kisucka J, Butterfield CE, Duda DG, Eichenberger SC, Saffaripour S, et al. (2006) Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 855–860.
17. Nurden AT (2011) Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 105 Suppl 1: S13–33.
18. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, et al. (2008) Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* 111: 4958–4964.
19. Ho-Tin-Noe B, Goerge T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD (2008) Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res* 68: 6851–6858.
20. Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, et al. (2009) Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation* 120: 1255–1265.
21. Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, Cholka A, Stolla M, et al. (2013) Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest*.
22. Jandrot-Perrus M, Lagrue AH, Okuma M, Bon C (1997) Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. *The Journal of biological chemistry* 272: 27035–27041.
23. Bezeaud A, Denninger MH, Guillin MC (1985) Interaction of human alpha-thrombin and gamma-thrombin with antithrombin III, protein C and thrombomodulin. *Eur J Biochem* 153: 491–496.
24. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF (1982) The nature of the binding for prothrombinase at the platelet surface as revealed by lipolytic enzymes. *Eur J Biochem* 122: 81–85.
25. Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JM, Carron JC, Nurden AT (1993) Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood* 81: 2554–2565.
26. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, et al. (1989) PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 59: 305–312.
27. Hamburger SA, McEver RP (1990) GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 75: 550–554.
28. McEver RP (1990) Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells* 16: 73–80; discussion 80–73.
29. Furie B, Celi A, Palabrica TM, Larsen E, Wagner DD, et al. (1991) PADGEM, a leukocyte receptor on activated platelets. Biology and application to in vivo medical diagnostics. *Curr Stud Hematol Blood Transfus*: 32–36.
30. Leytin V, Mody M, Semple JW, Garvey B, Freedman J (2000) Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochemical and biophysical research communications* 273: 565–570.
31. McNicol A, Israels SJ (1999) Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thrombosis research* 95: 1–18.
32. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *The Journal of biological chemistry* 258: 7155–7160.
33. Li JJ, Huang YQ, Basch R, Karpatkin S (2001) Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets. *Thromb Haemost* 85: 204–206.
34. Sachais BS, Higazi AA, Cines DB, Poncz M, Kowalska MA (2004) Interactions of platelet factor 4 with the vessel wall. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 30: 351–358.
35. Meyer A, Wang W, Qu J, Croft L, Degen JL, et al. (2012) Platelet TGF-beta1 contributions to plasma TGF-beta1, cardiac fibrosis, and systolic dysfunction in a mouse model of pressure overload. *Blood* 119: 1064–1074.
36. Flaumenhaft R (2003) Molecular basis of platelet granule secretion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23: 1152–1160.
37. Bergmeier W, Stefanini L (2009) Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1: 187–190.
38. Heemskerk JW, Vuist WM, Feijge MA, Reutelingsperger CP, Lindhout T (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: 2615–2625.
39. Jonnalagadda D, Izu LT, Whiteheart SW (2013) Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood* 120: 5209–5216.
40. Sehgal S, Storrie B (2007) Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release. *J Thromb Haemost* 5: 2009–2016.
41. Italiano JE, Jr., Battinelli EM (2009) Selective sorting of alpha-granule proteins. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1: 173–176.
42. Kamykowski J, Carlton P, Sehgal S, Storrie B (2011) Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet alpha-granules. *Blood* 118: 1370–1373.
43. Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang L, Hultenby K, et al. (2011) Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood* 117: 3907–3911.
44. Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Demers M, Cifuni SM, Goerge T, et al. (2009) Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *Am J Pathol* 175: 1699–1708.
45. Ho-Tin-Noe B, Goerge T, Wagner DD (2009) Platelets: guardians of tumor vasculature. *Cancer Res* 69: 5623–5626.
46. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, et al. (2006) Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* New York, NY 312: 104–107.
47. Stefanini L, Roden RC, Bergmeier W (2009) CalDAG-GEFI is at the nexus of calcium-dependent platelet activation. *Blood* 114: 2506–2514.
48. Elhamdani A, Azizi F, Artalejo CR (2006) Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion. *J Neurosci* 26: 3030–3036.
49. He L, Wu LG (2007) The debate on the kiss-and-run fusion at synapses. *Trends Neurosci* 30: 447–455.
50. Fitch-Tewfik JL, Flaumenhaft R (2013) Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 77.
51. Ge S, Woo E, Haynes CL (2011) Quantal regulation and exocytosis of platelet dense-body granules. *Biophys J* 101: 2351–2359.

Supplemental Figures



Supplemental Figure S1: Secretory response of platelets to collagen in static conditions. To assess the release of soluble factors by platelets in response to collagen independently of mechanical agitation, platelets were placed and stimulated into transwell inserts (pore diameter 0.4 μm), and the cell-free medium containing diffusible secretion products was collected from the lower chamber. Levels of serotonin (**A**), ATP (**B**), and platelet factor 4 (PF4) (**C**) in platelet releasates were measured as reflects of dense and alpha granule secretion, respectively. Results are expressed as percent relative to the mean levels found in releasates of unstimulated control platelets. $n =$ at least 6 different blood donors, # indicates a significant statistical difference ($p < 0.05$) from unstimulated control platelets.



Supplemental Figure S2: Intracellular calcium levels in thrombin-stimulated platelets. Calcium levels of Oregon Green 488 BAPTA-1AM-loaded platelets treated with thrombin were measured using a fluorescence microplate reader. The calcium curves shown are representative of four independent experiments using different blood donors.

Conclusion

Dans cette étude *in vitro*, nous avons recherché l'existence d'état(s) d'activation des plaquettes indépendants de leur potentiel pro-thrombotique et pro-coagulant.

Lorsque les plaquettes sont stimulées avec une faible dose de collagène de type I (0, 25µg/mL), nous avons mis en évidence une sécrétion des facteurs solubles contenus dans les granules alpha comme dans les granules denses en absence d'un phénotype pro-agrégant ou de l'exposition de P-sélectine ou de phosphatidylsérine. Cette réponse sécrétoire spécifique n'est pas observée lorsque les plaquettes sont stimulées avec de la thrombine. En effet, avec une faible dose de thrombine (0,05 nM) seule une légère sécrétion de sérotonine est détectée. Ainsi, comme cela avait été décrit pour l'exposition de P-sélectine et de phosphatidylsérine (Dachary-Prigent, Freyssinet et al. 1993, Heemskerk, Vuist et al. 1997), la sécrétion des facteurs solubles est donc dépendante à la fois de l'agoniste et de sa concentration.

A faible dose de collagène, la sécrétion de facteurs solubles présents dans les granules alpha n'est pas associée à une augmentation de l'expression membranaire de P-sélectine, pourtant aussi contenue à la membrane de ces granules alpha. Cette observation pourrait s'expliquer par une cinétique différente entre la sécrétion d'un facteur soluble et l'exposition d'un facteur membranaire (Jonnalagadda, Izu et al. 2012). L'existence de sous-types et/ou de sous-domaines au sein des granules alpha dont la sécrétion serait dépendante de l'agoniste et de sa concentration comme décrit dans certaines études pourrait aussi expliquer ces réponses sécrétoires spécifiques (Sehgal and Storrie 2007, Italiano, Richardson et al. 2008, Italiano and Battinelli 2009, Chatterjee, Huang et al. 2011, Kamykowski, Carlton et al. 2011).

Une autre caractéristique de la sécrétion spécifique de facteurs solubles déclenchée par une faible dose de collagène est qu'elle n'est pas associée à une augmentation de la concentration intra-plaquettaire de calcium. A cette concentration de collagène, la sécrétion granulaire pourrait être induite par un mécanisme de « *kiss and run* » caractérisé par une fusion incomplète et réversible des granules avec la membrane plasmique (Ge, Woo et al. 2011, Fitch-Tewfik and Flaumenhaft 2013).

De plus, nous avons observé que la sécrétion induite par une dose faible de collagène est dépendante de la glycoprotéine VI or celle-ci est impliquée dans la prévention des saignements inflammatoires (Boulaftali, Hess et al. 2013).

En conclusion, nos résultats montrent que des états intermédiaires d'activation des plaquettes indépendants de la formation d'un thrombus ou d'une activité pro-coagulante existent. L'activation des plaquettes est graduelle et non binaire. Ces « états alternatifs » d'activation dépendants de la glycoprotéine VI pourraient contribuer aux fonctions non hémostatiques des plaquettes, en particulier dans la régulation de la réponse inflammatoire par la sécrétion de facteurs immunomodulateurs en absence de thrombus.

PUBLICATION 2

Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice

Angèle Gros, Varouna Syvannarath, Lamia Lamrani, Véronique Ollivier, Stéphane Loyau, Tobias Goerge, Bernhard Nieswandt, Martine Jandrot-Perrus and Benoît Ho-Tin-Noé

Publié dans *Blood*, Août 2015

&

PUBLICATION 3

The contribution of platelet GPVI and CLEC-2 to vascular integrity during inflammation is stimulus and organ dependent

Julie Rayes, Sian Lax, Angèle Gros, Surasak Wichaiyo, Soumaya Jadoui, Véronique Ollivier, Bernhard Nieswandt, Jerry Ware, Martine Jandrot-Perrus, Steve P. Watson, and Benoît Ho-Tin-Noé

En révision dans *Blood, Brief Reports*

Contribution : Réalisation, analyse et interprétation des expériences sur le modèle de réaction passive d'Arthus (Figure 1) et mise au point, réalisation, analyse et interprétation des expériences sur le modèle d'inflammation pulmonaire (Figure 2).

Introduction

En dehors de l'hémostase, les plaquettes ont un rôle essentiel dans les réactions inflammatoires. Dans différents organes soumis à une réaction inflammatoire, les plaquettes favorisent l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'infiltration des leucocytes. Ces effets sont variables selon l'organe et la cause de l'inflammation.

Les plaquettes préviennent également les saignements inflammatoires dans la peau, les poumons et les reins qui sont des organes richement vascularisés. Les mécanismes ne sont pas encore bien connus mais différentes études suggèrent que le maintien de l'intégrité vasculaire par les plaquettes en condition inflammatoire serait indépendant de la formation d'un thrombus. En effet dans un modèle d'inflammation cutanée, GPIb α et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ne sont pas requises (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008). De plus, la transfusion de plaquettes à des souris hIL4R α /GPIb α rendues thrombopéniques puis soumises à une réaction immuno-induite (réaction passive d'Arthus ; rpA) dans la peau ou à une inflammation pulmonaire induite par le LPS suggère que cet effet vasculoprotecteur des plaquettes serait indépendant des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et à l'inverse dépendant des récepteurs GPVI et CLEC-2 portant un motif ITAM (Boulaftali, Hess et al. 2013).

Les plaquettes pourraient prévenir les saignements inflammatoires en limitant les dégâts vasculaires provoqués par les neutrophiles, principaux leucocytes recrutés dans les tissus lésés. Effectivement, la déplétion des neutrophiles avant l'induction d'une inflammation par injection sous-cutanée de TNF- α chez des souris thrombopéniques limitent ces saignements inflammatoires (Ho-Tin-Noe, Carbo et al. 2009).

Dans un premier temps (**Publication 2**), nous avons donc voulu caractériser les mécanismes plaquettaire responsables de la prévention des saignements inflammatoires. En s'appuyant sur un modèle de réaction inflammatoire induite par des complexes immuns, nous avons cherché à comprendre comment les plaquettes pouvaient contrer les effets délétères des neutrophiles et quel était le rôle de la glycoprotéine VI dans cet effet protecteur.

Par la suite, nous avons étendu cette étude (**Publication 3**) en interrogeant le rôle de CLEC-2 dans ces mécanismes de prévention des saignements inflammatoires et nous avons déterminé si ceux-ci étaient identiques d'un organe à un autre.

PLATELETS AND THROMBOPOIESIS

Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice

Angèle Gros,^{1,2} Varouna Syvannarath,^{1,2} Lamia Lamrani,^{1,2} Véronique Ollivier,^{1,2} Stéphane Loyau,^{1,2} Tobias Goerge,^{3,4} Bernhard Nieswandt,⁵ Martine Jandrot-Perrus,^{1,2} and Benoît Ho-Tin-Noé^{1,2}

¹INSERM Unit 1148, University Paris Diderot, Paris, France; ²Laboratory for Vascular Translational Science, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ³Department of Dermatology, University Hospital of Münster, Münster, Germany; ⁴Interdisciplinary Center for Clinical Research (IZKF), University of Münster, Münster, Germany; and ⁵Department of Vascular Medicine, University Hospital and Rudolf Virchow Center, Würzburg, Germany

Key Points

- GPVI-dependent platelet binding and activation contribute to seal neutrophil-induced vascular damage in IC-mediated inflammation.
- Inflammation represents an uncommon hemostatic situation in which adhesion and activation of single platelets prevent bleeding.

Platelets protect vascular integrity during inflammation. Recent evidence suggests that this action is independent of thrombus formation and requires the engagement of glycoprotein VI (GPVI), but it remains unclear how platelets prevent inflammatory bleeding. We investigated whether platelets and GPVI act primarily by preventing detrimental effects of neutrophils using models of immune complex (IC)-mediated inflammation in mice immunodepleted in platelets and/or neutrophils or deficient in GPVI. Depletion of neutrophils prevented bleeding in thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice during IC-mediated dermatitis. GPVI deficiency did not modify neutrophil recruitment, which was reduced by thrombocytopenia. Neutrophil cytotoxic activities were reduced in thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice during IC-mediated inflammation. Intravital microscopy revealed that in this setting, intravascular binding sites for platelets were exposed by neutrophils, and GPVI supported the recruitment of individual platelets to these spots. Furthermore, the platelet secretory response accompanying IC-mediated inflammation was partly mediated by GPVI, and blocking of GPVI

signaling impaired the vasculoprotective action of platelets. Together, our results show that GPVI plays a dual role in inflammation by enhancing neutrophil-damaging activities while supporting the activation and hemostatic adhesion of single platelets to neutrophil-induced vascular breaches. (*Blood*. 2015;126(8):1017-1026)

Introduction

Besides being the cellular orchestrators of thrombus formation, platelets are now recognized as major actors of inflammatory reactions. In particular, it is well established that platelets promote leukocyte infiltration in many inflamed tissues and organs by loosening endothelial junctions,^{1,2} secreting chemokines and serotonin,^{3,4} and stimulating the expression of adhesion molecules on endothelial plasma membranes.⁵ Platelets are also known to enhance the formation of prothrombotic antimicrobial and histotoxic neutrophil extracellular traps in response to bacterial and viral infection^{6,7} and in deep vein thrombosis.^{8,9} In addition, platelets have been shown to prevent tissue injury during the early phase of inflammatory reactions, thus preventing bleeding in inflamed tissues with high microvessel density such as the skin, kidneys, and lungs.¹⁰⁻¹⁴ However, the mechanisms underlying this latter beneficial effect of platelets during inflammation remain unclear. A recent study suggests that the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-associated platelet receptors glycoprotein VI (GPVI) and CLEC-2 are involved in the prevention of bleeding by platelets in endotoxin-challenged lungs and in immune complex (IC)-inflamed skin.¹⁵ Although this is unlikely to provide

the full explanation, there is also strong evidence to suggest that this vasculoprotective action of platelets is independent of their well-known ability to form thrombi at sites of vessel injury.¹⁴ Indeed, it has been reported in mouse models of IC-induced vasculitis¹¹ and glomerulonephritis¹² that platelet interactions with inflamed microvessels occur before any sign of thrombosis and that prevention of this initial platelet deposition results in accelerated and exacerbated local hemorrhage.¹²

In addition, there are experimental arguments suggesting that in certain inflammatory situations, platelets can counter the injurious effects of the most abundant type of circulating leukocytes in human, the neutrophil. Renal bleeding and acute renal failure in thrombocytopenic mice subjected to glomerulonephritis was markedly attenuated in mice protected from glomerular neutrophil infiltration by virtue of a genetic deficiency in the leukocyte-specific integrin Mac-1.¹² Depletion of neutrophils similarly prevented tumor necrosis factor- α -induced skin bleeding in thrombocytopenic mice.¹⁶ Collectively, these observations suggest that the thrombus-independent action of platelets may rely on prevention and/or

Submitted December 16, 2014; accepted May 20, 2015. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, June 2, 2015; DOI 10.1182/blood-2014-12-617159.

The online version of this article contains a data supplement.

There is an Inside *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2015 by The American Society of Hematology

healing of neutrophil-mediated tissue injury.¹⁴ We explored this possibility using mouse models of IC-induced dermatitis and peritonitis and found that platelets enhance rather than diminish neutrophil infiltration and cytotoxic activities during IC-induced inflammation. We further show that although, on one hand, GPVI contributes to these proinflammatory effects of platelets, on the other hand, it also mediates sealing of neutrophil-induced vascular breaches by supporting the early recruitment and adhesion of single platelets to inflamed vessels, as well as platelet secretion and activation, thus contributing to the prevention of inflammatory bleeding.

Materials and methods

Mice

Mice deficient in GPVI^{-/-17} were backcrossed on a C57Bl/6J background and housed in our animal facility. Their wild-type littermates were used as controls. All animal procedures described in this study were performed using 10–14-week-old mice and were approved by the Animal Care and Use Committee of the Claude Bernard Institute.

Reverse passive Arthus reaction in the skin and peritoneal cavity

Shaved mice were anesthetized with inhalation of isoflurane, and the reverse passive Arthus (rpA) reaction was elicited by subcutaneous injection of rabbit anti-bovine serum albumin (anti-BSA) immunoglobulin G (IgG) (60 µg in 20 µL saline, 2 spots/mouse) immediately followed by IV injection of BSA (50 µg/g mouse) in saline. When the rpA reaction was combined with thrombocytopenia, particular care was taken for the injection of anti-BSA IgG to avoid bleeding from needle insertion.

For induction of the rpA reaction within the peritoneal cavity, 100 µg rabbit anti-BSA IgG in 500 µL saline was injected intraperitoneally immediately followed by IV injection of BSA (50 µg/g mouse) in 50 µL saline. Peritoneal lavage was performed with 2 mL phosphate-buffered saline 1% BSA 4 hours after reaction onset.

Statistical analysis

All data are expressed as mean ± standard error of the mean and were compared by the nonparametric Mann-Whitney *U* test using GraphPad Prism software (San Diego, CA). *P* values <.05 were regarded as statistically significant.

Additional methods

Additional methods can be found in supplemental Methods (available on the *Blood* Web site).

Results

Platelets prevent neutrophil-induced bleeding during IC-mediated inflammation

To determine the relationships between leukocyte infiltration and tissue damage during IC-mediated inflammation, we first analyzed the occurrence of skin bleeding relative to leukocyte localization in the skin of thrombocytopenic mice subjected to the cutaneous rpA reaction, a classical experimental model for IC-mediated tissue injury. Intravital observation of skin vessels and rhodamine-6G-labeled leukocytes showed that bleeding during this experimental setting originated abruptly from capillaries and postcapillary venules in which leukocytes accumulated (Figure 1A).

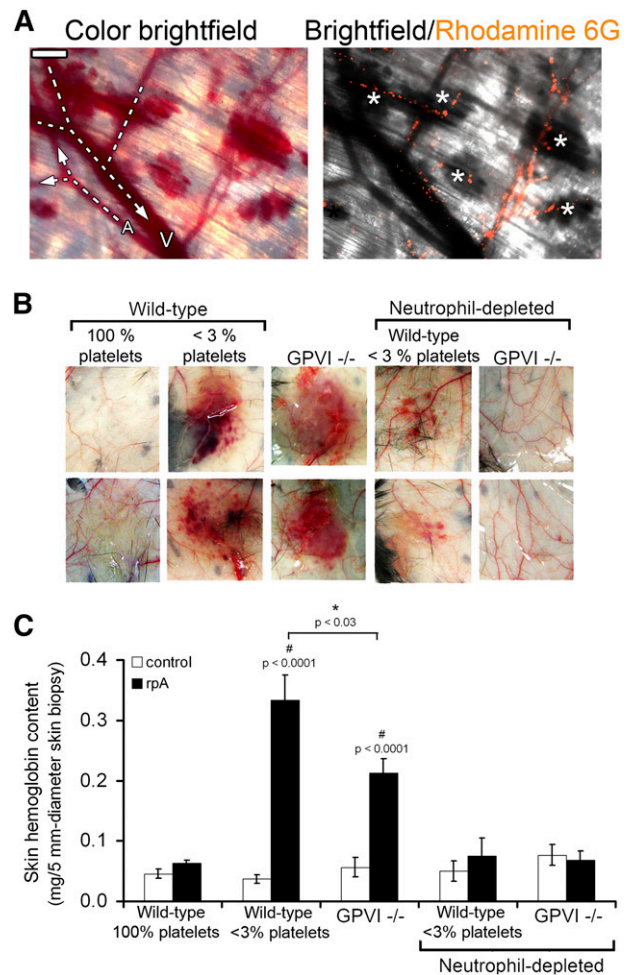
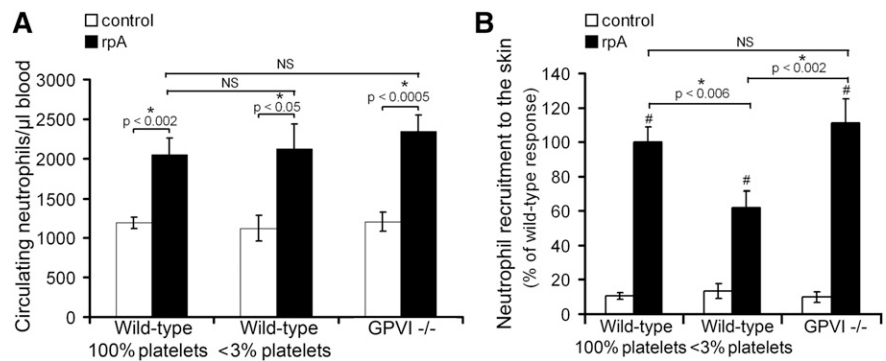


Figure 1. Neutrophils are the cause of skin bleeding in thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice during the cutaneous rpA reaction. (A) Intravital microscopy imaging of the cutaneous rpA reaction in a thrombocytopenic mouse injected with rhodamine-6G for staining of leukocytes. Bright-field color image showing that bleeding originated from capillaries and postcapillary venules (left). Arterioles (A) and venules (V) were identified by whether they collected or distributed blood from/to lower caliber vessels. Merged image of bright-field and corresponding rhodamine-6G image showing that bleeding occurred from vessels in which leukocytes accumulated (white asterisks) (right). Scale bar, 200 µm. (B) Representative images of the inner layer of the skin subjected to the rpA reaction from control (100% platelets), thrombocytopenic (<3% platelets), GPVI^{-/-} mice, and thrombocytopenic and GPVI^{-/-} that were immunodepleted for neutrophils prior to the induction of the rpA reaction. Images were taken 4 hours after inducing the rpA reaction. (C) Hemoglobin content in skin biopsy specimens from control and rpA reaction areas from the various groups of mice, as indicated. *n* = 6–18 mice per group. # indicates a statistically significant increase (*P* < .05) in hemoglobin content as compared with control spots from control wild-type mice.

Consequently, we investigated whether depletion of neutrophils, the predominant leukocyte cell type involved in the response to IC challenge,¹⁸ could prevent inflammatory skin bleeding in thrombocytopenic wild-type mice and in mice with a genetic deficiency in GPVI (GPVI^{-/-}), an ITAM receptor that was recently reported to contribute to the vasculoprotective action of platelets in the inflamed skin.¹⁵ After 4 hours of cutaneous rpA reaction, macroscopically visible petechial skin bleeding had developed in all thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice, whereas no bleeding was observed in their control wild-type littermates (Figure 1B–C). Transfusion of platelets isolated from wild-type mice into GPVI^{-/-} mice (6×10^8 washed platelets per recipient mouse) rescued their bleeding phenotype when subjected to the cutaneous rpA reaction (supplemental Figure 1), confirming that inflammatory bleeding in GPVI^{-/-} mice was due to a platelet defect.

Figure 2. Platelet contribution to neutrophil peripheral mobilization and recruitment to the skin during the cutaneous rpA reaction. (A) Comparison of the circulating neutrophil count in control wild-type, thrombocytopenic, and GPVI^{-/-} mice before and after induction of the rpA reaction. (B) Quantification and comparison of neutrophil recruitment as assessed by measurement of skin MPO content. # indicates a statistically significant increase ($P < .05$) in skin MPO content as compared with control spots from control wild-type mice. $n = 6$ -12 mice per group. NS, not significant.



Immunodepletion of circulating neutrophils by $>70\%$ using an anti-Ly6G antibody resulted in the almost complete suppression of inflammatory skin bleeding in both thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice (Figure 1B-C). These results show that bleeding in acutely inflamed skin of thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice is caused by neutrophils, thus indicating that platelets limit or repair neutrophil-inflicted injuries during IC-induced inflammation.

Platelets promote the infiltration of neutrophils during IC-mediated inflammation

Because for neutrophils to cause damage in a given organ, they first need to reach it, we compared neutrophil mobilization in peripheral blood of control wild-type, thrombocytopenic, and GPVI^{-/-} mice during the cutaneous rpA reaction. In all 3 groups of mice, an increase in the number of circulating neutrophils was observed at 2 hours after initiating the reaction (Figure 2A). There was no difference in the extent of neutrophil mobilization between any of the groups, indicating that systemic mobilization of peripheral neutrophils during IC-mediated inflammation is independent of platelets (Figure 2A).

We then examined the recruitment of neutrophils to the inflamed skin by measuring the total myeloperoxidase (MPO) content at the reaction site. Induction of a cutaneous rpA reaction led to an increase in total MPO skin content in all groups of mice, indicating the recruitment of neutrophils (Figure 2B). Neutrophil recruitment was comparable in wild-type and GPVI^{-/-} mice but was significantly reduced in thrombocytopenic mice (Figure 2B). Together, these results show that platelets support neutrophil recruitment to the inflamed skin independently of GPVI. They further indicate that tissue damage and bleeding in thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice are not due to exacerbated recruitment of neutrophils at the inflammatory site.

Regulation of neutrophil histotoxic activities by platelets during IC-mediated inflammation

To investigate the possibility of a scavenging role of platelets toward neutrophil-derived proteases, we quantified the level of neutrophil elastase associated with circulating platelets before and 4 hours after inducing the cutaneous rpA reaction. A population of platelets was found to be highly positive for neutrophil elastase, the proportion of which increased significantly from 5.6% at the basal state to 8.7% at 4 hours after induction of the rpA reaction (Figure 3A-B), thus leading to an increase in the mean fluorescence intensity for neutrophil elastase of total platelets (Figure 3C). Similar modifications in elastase levels on circulating platelets were observed in GPVI^{-/-} mice (Figure 3B-C). These results indicate that platelets bind neutrophil elastase during IC-mediated dermatitis, a process that does not require GPVI.

In order to determine the contribution of platelets to the regulation of neutrophil histotoxic compound release during IC-mediated

inflammation, we transposed the site of the rpA reaction from the skin to the peritoneal cavity, where neutrophil emigration and released neutrophil granule components can be quantified accurately in lavage fluid. Induction of the rpA reaction within the peritoneal cavity led to a profile of neutrophil recruitment similar to that observed when the reaction was elicited in the skin (Figure 2B), with wild-type and GPVI^{-/-} mice displaying comparable levels of neutrophil recruitment, whereas it was significantly reduced in thrombocytopenic mice (Figure 4A). Based on macroscopic observation of the intraperitoneal organs and collected lavage fluids, IC-mediated inflammation did not cause any hemoperitoneum in either group of mice.

Protein levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and MPO were measured in lavage fluids to assess degranulation of early-released gelatinase and late-released azurophilic neutrophil granules, respectively.¹⁹ Levels of both MMP-9 and MPO were significantly reduced in lavage fluids from thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice as compared with wild-type mice (Figure 4B-C). Intraperitoneal oxidative stress assessed with the Amplex UltraRed reagent, whose oxidation depends on the availability of both peroxidases and H₂O₂, was also reduced in thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice (Figure 4D). Nevertheless, because neutrophil infiltration was different in the 3 groups of mice, reduced levels of MMP9, MPO, and oxidative stress could reflect decreased neutrophil numbers rather than impaired neutrophil degranulation or oxidative activity. For this reason, protein levels and global oxidative stress were normalized to the number of infiltrating neutrophils, thus yielding degranulation and oxidation indexes. Similarly to what was observed for the total amount of released MMP9, the degranulation index for MMP-9 was reduced in both thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice, thus indicating that platelets stimulate the release of neutrophil tertiary granules in the rpA reaction (Figure 4E) and that GPVI supports this platelet function. In contrast, the MPO degranulation index was similar between all groups of mice (Figure 4F), thus arguing against a role for platelets in the regulation of neutrophil azurophilic granule release during the rpA reaction. As for MMP-9, the intraperitoneal oxidative index of thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice was decreased, indicating that platelets stimulate neutrophil oxidative activity during the rpA reaction in a GPVI-dependent manner (Figure 4G).

Platelets seal neutrophil-inflicted breaches to vascular integrity during IC-mediated skin inflammation in a GPVI-dependent manner

The fact that GPVI^{-/-} mice displayed normal or even reduced neutrophil infiltration and degranulation, as well as reduced oxidative stress and preserved clearing of neutrophil elastase, suggested that their proneness to bleeding during IC-mediated inflammation was not linked to increased neutrophil aggressiveness or to a lack of platelet buffering

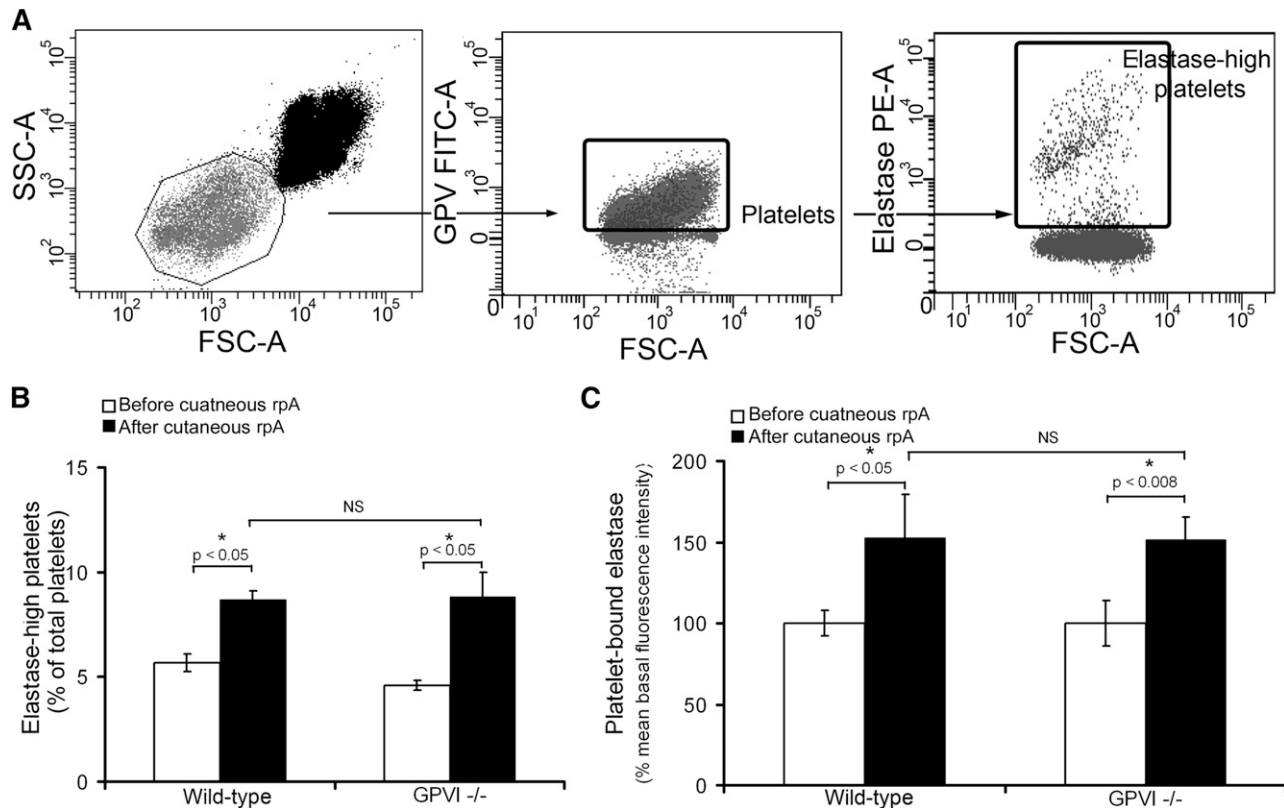


Figure 3. Platelets scavenge neutrophil elastase during IC-mediated inflammation. (A) Flow cytometry dot plots describing the identification of elastase-positive platelets in whole blood. Platelets were identified according to their light-scattering properties (left) and positivity for glycoprotein V (GPV) (middle). A subpopulation of platelets with highly positive elastase was then further identified using a fluorescent polyclonal antibody to neutrophil elastase (right). (B) Comparison of the proportion of elastase-high platelets among total circulating platelets before and 4 hours after inducing the cutaneous rpA reaction in wild-type and GPVI^{-/-} mice. $n = 7-8$ mice per group. (C) Mean elastase levels on circulating platelets before and 4 hours after inducing the cutaneous rpA reaction in wild-type and GPVI^{-/-} mice. Results are expressed relative to the mean fluorescence intensity for elastase measured on wild-type platelets before the induction of the rpA reaction. $n = 7-8$ mice per group. FSC-A, forward scatter area; SSC-A, side scatter area.

action toward neutrophil toxic activities. An alternative possibility is that GPVI coordinates platelet-mediated vascular repair. In order to explore this hypothesis, we assessed whether platelets were actively recruited to the inflamed vasculature at the rpA reaction site and, if so, whether GPVI substantially contributed to this recruitment. Platelet recruitment was estimated by measuring platelet factor 4 (PF4), a protein abundantly stored in platelet α -granules, in skin biopsy specimens of control or rpA reaction areas. Importantly, to limit interferences due to passive deposition of platelets through bleeding, skin biopsy specimens were harvested 90 minutes after rpA reaction elicitation, before any significant bleeding was visible in GPVI^{-/-} mice. In wild-type mice, the rpA reaction led to an increase in PF4 skin content that was dependent on platelets, as shown by its almost complete abrogation in mice rendered thrombocytopenic prior to the induction of the rpA reaction (Figure 5A). In GPVI^{-/-} mice, the rpA reaction also led to an increase in PF4 skin content, but to a lesser extent than in wild-type mice (Figure 5A). Remarkably, platelet recruitment to the inflamed skin was inhibited in both wild-type and GPVI^{-/-} mice that were depleted of neutrophils (Figure 5A). Together, these results show that neutrophils are responsible for the early recruitment of platelets at the reaction site and that GPVI contributes in part to this recruitment.

We then investigated the interactions between platelets and neutrophils during the cutaneous rpA reaction by intravital microscopy in mice bearing dorsal skinfold chambers and that were injected with fluorescent antibodies to platelets (anti-GPIIb β) and neutrophils (anti-Ly6G). Single platelets and neutrophils of wild-type mice started to adhere in venules and capillaries of the stimulated area within minutes of rpA reaction induction. After 2 hours of reaction, individual adherent

platelets were still present in the inflamed vasculature, but no thrombi or platelet clumps had developed (Figure 5B). Whereas neutrophils were located in both the intracellular and extravascular compartments, platelets were found mostly inside vessels (Figure 5B). Adherent platelets in inflamed skin vessels included platelets interacting directly with the vessel lining and platelets sticking to adherent neutrophils (Figure 5B). These results suggest that early during the rpA reaction, neutrophils recruit platelets by binding them directly and also by unmasking platelet-binding sites on the vessel wall. Notably, in GPVI^{-/-} mice, the residual platelets that were recruited to the reaction site also bound to the vessel wall and to adherent neutrophils (not shown), thus indicating that redundant mechanisms independent of GPVI exist to support both types of interactions.

To further determine whether the GPVI-dependent component of platelet recruitment contributed to the repair of neutrophil-inflicted vascular damage during the rpA reaction, we used fluorescent microspheres coated with a chimeric form of GPVI consisting of its extracellular domain fused to the Fc part of a human IgG1 molecule (GPVI-Fc)²⁰ to detect exposure of GPVI-binding sites. The functionality of the GPVI-Fc-coated microspheres was evaluated in vitro by checking their increased ability to bind fibrillar collagen as compared with control microspheres coated with irrelevant rabbit IgG (supplemental Figure 2). Intravital microscopy analysis of GPVI-Fc-coated microspheres within the inflamed vasculature during the course of the cutaneous rpA reaction revealed interactions closely resembling those observed for platelets. In contrast to control microspheres that did not show any interactions (not shown), firmly adherent GPVI-Fc-coated microspheres

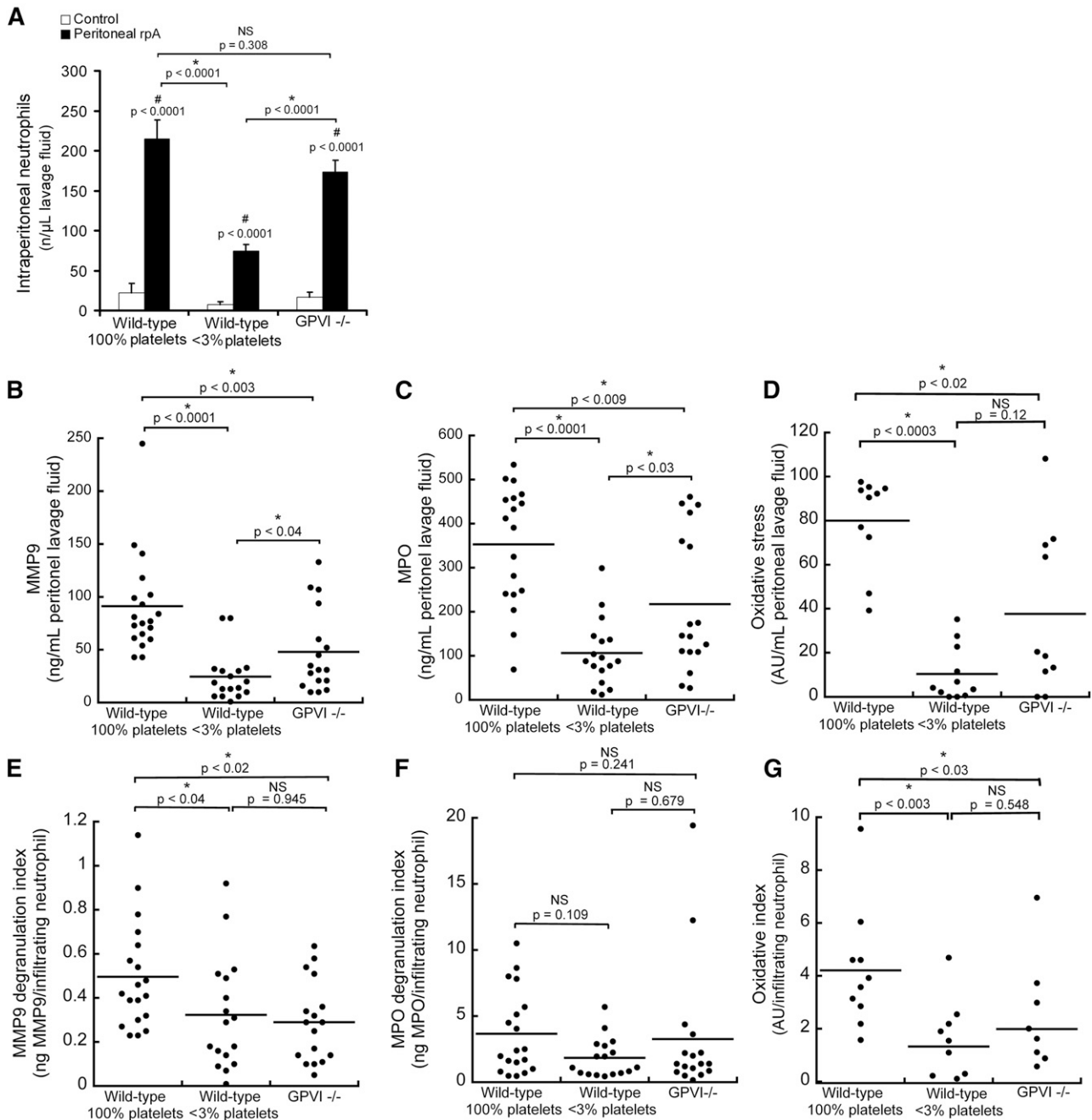


Figure 4. Regulation of neutrophil infiltration, degranulation, and oxidative stress by platelets during the peritoneal rpA reaction. (A) Comparison of neutrophil content in peritoneal lavage fluids from control wild-type, thrombocytopenic, and GPVI^{-/-} mice that were subjected or not to the rpA reaction in the peritoneal cavity. (B-D) Quantification and comparison of MMP-9 (B) and MPO (C) protein levels and of oxidative stress (D) in peritoneal lavage fluids from control wild-type, thrombocytopenic, and GPVI^{-/-} mice subjected to the peritoneal rpA reaction. Each dot corresponds to a mouse. (E-G) MMP-9 (E) and MPO (F) degranulation indexes and oxidative index (G) of mice subjected to the peritoneal rpA reaction. Degranulation and oxidative indexes were calculated by dividing levels of MMP-9, MPO, and oxidative activity measured in lavage fluids by the number of infiltrating neutrophils. Each dot represents 1 mouse. NS, not significant.

interacting with the vessel wall alone or with recruited leukocytes were seen at the reaction site within vessels where leukocytes accumulated (Figure 5C). Quantification of control and GPVI-Fc-coated microspheres by measurement of green fluorescence in skin biopsy specimens confirmed that GPVI-Fc-coated microspheres accumulated locally during the rpA reaction (Figure 5D). These results show that the rpA reaction leads to the exposure of binding sites for GPVI on the vessel wall and on neutrophils themselves and suggest that GPVI alone is sufficient to support firm adhesion in this situation. Depletion of neutrophils prior to the

induction of the rpA reaction completely abolished the accumulation of GPVI-Fc-coated microspheres at the reaction site (Figure 5D), indicating that in addition to directly binding GPVI, neutrophils are also fully responsible for the exposure of GPVI-binding sites on the inflamed vessel wall. Taken together, these results indicate that GPVI contributes to the prevention of bleeding in inflamed tissues by supporting platelet adhesion to sites of neutrophil-induced vessel injury.

To assess the extent of endothelial damage at sites of neutrophil infiltration during the cutaneous rpA reaction in wild-type, GPVI^{-/-},

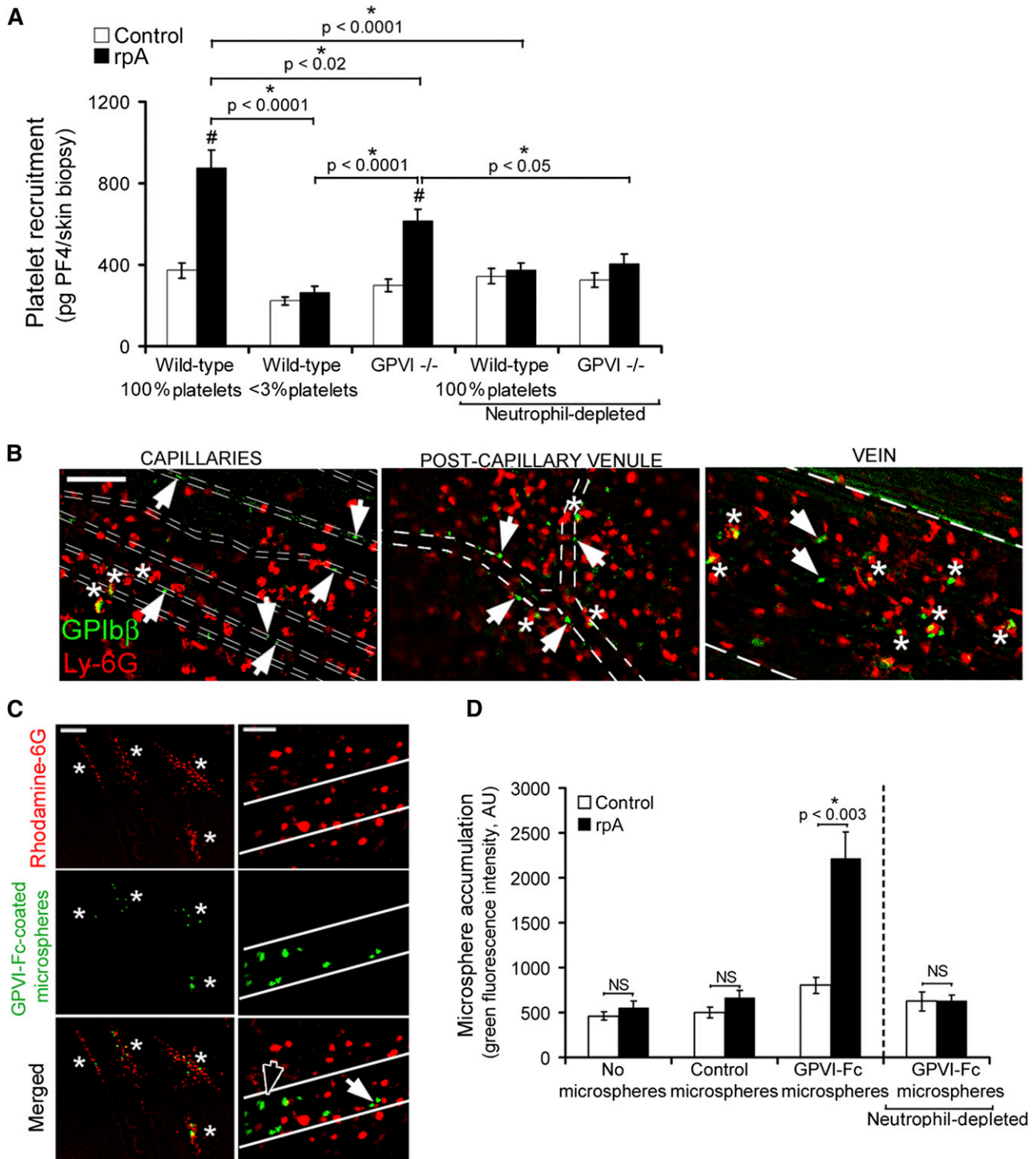


Figure 5. GPVI mediates vascular repair following neutrophil-induced injury. (A) Comparison of platelet accumulation at unstimulated control sites or at the site of the rpA reaction in the skin of control wild-type, thrombocytopenic, and GPVI^{-/-} mice, as assessed by measurement of skin PF4 content. n = 6-15 mice per group. # indicates a significant difference ($P < .0001$) as compared with the PF4 content in unstimulated control skin of wild-type mice. (B) Platelets and neutrophils were stained in vivo using fluorescent antibodies to GPIIb/3 and Ly-6G, respectively, and their interactions with vessels during the rpA reaction were analyzed by intravital microscopy through a dorsal skinfold chamber. Whether at the capillary, postcapillary venule, or vein level, single platelets were seen binding directly to the vessel lining (white arrowheads) or to adherent neutrophils (white asterisks). Vessel edges are highlighted by dotted lines. The images shown were taken between 90 minutes and 2 hours after inducing the rpA reaction and are representative of 4 independent experiments. Scale bar, 100 μ m. (C) The interactions of fluorescent microspheres (2 μ m diameter) coated with a chimeric form of GPVI (GPVI-Fc) with the inflamed vasculature were analyzed by intravital microscopy. GPVI-Fc-coated microspheres accumulated specifically at sites of leukocyte recruitment and infiltration (white asterisks) identified by rhodamine-6G labeling. Observation of the GPVI-Fc-coated microspheres at higher magnification revealed individual microspheres binding directly to the vessel wall (black arrowhead) or to adherent leukocytes (white arrowhead). Vessel edges are highlighted in white. Scale bars, 200 μ m (left) and 50 μ m (right). The images shown are representative of 4 independent experiments. (D) Quantification of control and GPVI-Fc-coated microsphere accumulation at unstimulated control sites or at the site of the rpA reaction in the skin of wild-type mice that were immunodepleted or not for neutrophils, as indicated. n = 5-8 mice per group. NS, not significant.

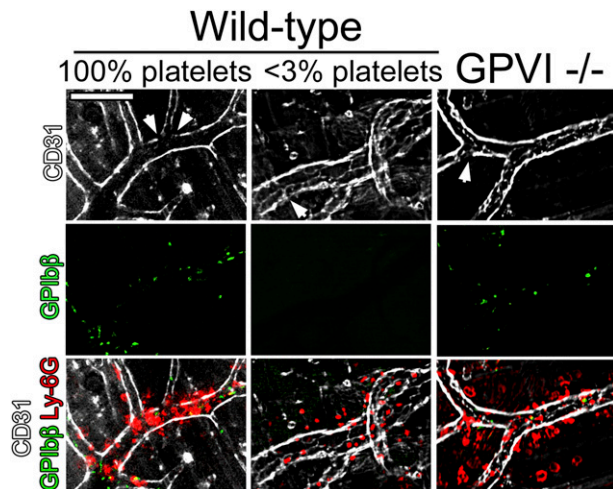


Figure 6. Neutrophil infiltration and endothelial integrity during the early phase of the cutaneous rpA reaction. The integrity of the endothelial cell layer at sites of neutrophil infiltration during the cutaneous rpA reaction was investigated by intravital microscopy. Endothelial cells, platelets, and neutrophils were stained using fluorescent antibodies to CD31, GPIIb β , and Ly-6G, respectively. In all groups of mice, although faint CD31 staining (arrowheads) was found in areas of neutrophil infiltration, the endothelial cell layer was overall well preserved. All pictures were taken during the first 3 hours of reaction. Scale bar, 100 μ m.

and thrombocytopenic mice, *in vivo* staining of the endothelial lining using fluorescent antibodies to CD31 was performed. In all groups of mice, although CD31 staining of blood vessels was globally preserved, faint or absent CD31 staining was found in areas of neutrophil accumulation (Figure 6). Notably, preserved CD31 staining was also observed in some bleeding vessels in GPVI $^{-/-}$ and thrombocytopenic mice. These results suggest that limited damage to the endothelium and/or endothelial retraction is sufficient to cause bleeding in the absence of platelets or GPVI.

GPVI signaling supports platelet secretion and contributes to the vasculoprotective action of platelets during IC-mediated skin inflammation

Because in addition to being an adhesion receptor, GPVI is also a signaling receptor, we assessed the contribution of GPVI signaling to the prevention of bleeding by platelets during IC-mediated inflammation. We first determined whether the rpA reaction was associated with the release of platelet-derived soluble factors. For this analysis, we focused on the release of serotonin, a factor for which platelet-dense granules represent the main source in blood.²¹ In control wild-type mice with normal platelet counts, the cutaneous rpA reaction led to a marked increase in plasma serotonin (Figure 7A). This increase was fully prevented in mice rendered thrombocytopenic prior to the induction of the rpA reaction and partially in GPVI $^{-/-}$ mice (Figure 7A). These results show that the rpA reaction is accompanied by a platelet secretory response that is in part dependent on GPVI-mediated signaling. We then compared the ability of control wild-type platelets to rescue inflammatory skin bleeding in GPVI $^{-/-}$ mice to that of wild-type platelets that were treated with inhibitors of spleen tyrosine kinase (Syk) and the Bruton tyrosine kinase (Btk). Both Syk and Btk are protein tyrosine kinases crucial for ITAM-dependent signaling, notably downstream of GPVI.²²⁻²⁴ Before transfusion into GPVI $^{-/-}$ mice, the 2 types of washed platelets were loaded with calcein-AM to allow their tracking. Both control wild-type platelets and platelets treated with the Syk inhibitor R406 and the Btk inhibitor ibrutinib (Syk/BTK-

inhibitor-treated platelets) accumulated at the site of the cutaneous rpA reaction, to a similar level (Figure 7B). However, whereas control wild-type platelets fully prevented inflammatory skin bleeding in GPVI $^{-/-}$ mice, the Syk/BTK-inhibitor-treated platelets

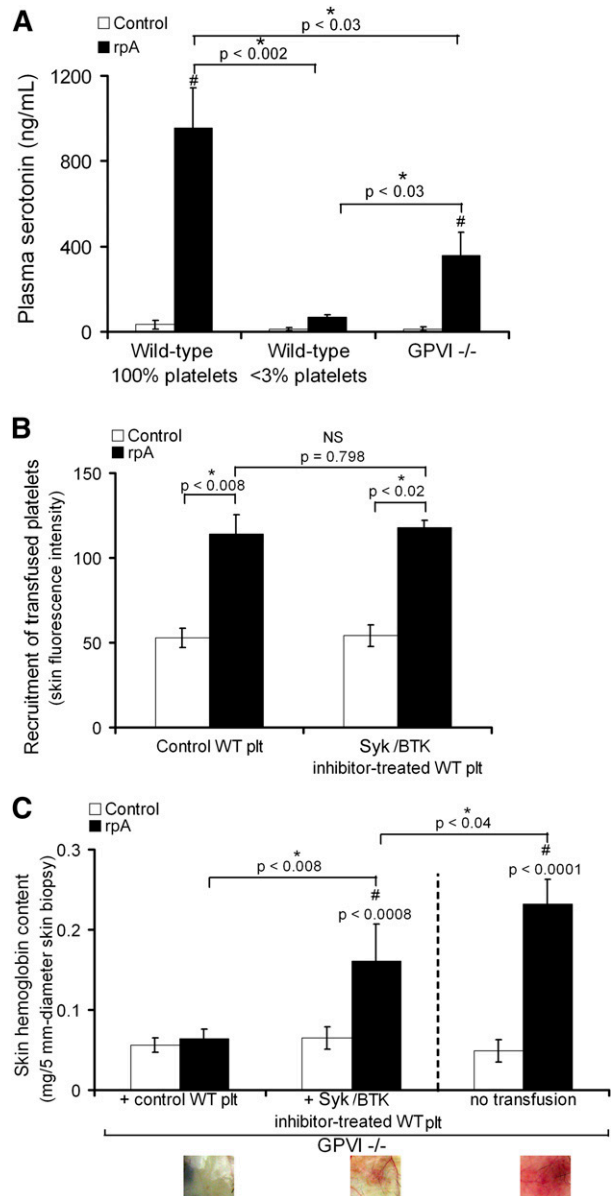


Figure 7. GPVI-dependent signaling contributes to platelet secretion and prevention of bleeding during the cutaneous rpA reaction. (A) Plasma serotonin levels in control (100% platelets), thrombocytopenic (<3% platelets), and GPVI $^{-/-}$ mice that were subjected or not to the cutaneous rpA reaction. $n = 5-8$ mice per group. # indicates a significant difference ($P < .002$) as compared with plasma serotonin level in unchallenged control wild-type mice. (B) GPVI $^{-/-}$ mice were transfused with 9×10^6 green-fluorescent calcein-AM-labeled wild-type platelets that were treated or not with the Syk inhibitor R406 and the Btk inhibitor ibrutinib, as indicated. The cutaneous rpA reaction was then elicited, and the recruitment of transfused platelets to the reaction site was quantified by measurement of green fluorescence intensity in extracts from skin biopsy specimens harvested after 4 hours of reaction. (C) Hemoglobin content in skin biopsy specimens from control and rpA reaction areas from GPVI $^{-/-}$ mice and from GPVI $^{-/-}$ mice that were transfused with control or Syk/Btk-inhibitor-treated wild-type platelets. $n = 4-8$ mice per group. # indicates a statistically significant difference ($P < .05$) in hemoglobin content as compared with control spots from GPVI $^{-/-}$ mice transfused with control wild-type platelets. Representative pictures of the skin at the site of the rpA reaction are shown below. NS, not significant; WT, wild-type.

only partially corrected the bleeding phenotype of GPVI^{-/-} mice (Figure 7C). Overall, these results indicate that prevention of inflammatory bleeding by platelets requires both GPVI-dependent platelet adhesion and signaling.

Discussion

In line with previous studies pointing to a role of innate-immune cells in thrombocytopenia-associated bleeding in tumors, tumor necrosis factor- α -induced skin inflammation and glomerulonephritis,^{12,16} we show here that neutrophils are responsible for inflammatory bleeding in thrombocytopenic and GPVI^{-/-} mice during IC-mediated inflammation. The fact that neutrophils cause inflammatory bleeding during thrombocytopenia sheds new light on results from previous studies addressing the vasculoprotective action of platelets during inflammation. When the role of GPVI in maintenance of vascular integrity during inflammation was initially investigated, FcR γ chain^{-/-} mice were used as a model for GPVI deficiency. In contrast to the GPVI^{-/-} mice we used here and to mice that were immunodepleted for GPVI,¹⁵ FcR γ chain^{-/-} mice showed no abnormal susceptibility to inflammatory bleeding when subjected to IC-mediated skin inflammation.¹¹ Although these data might appear contradictory at first sight, in the light of our results, this discrepancy can now be easily explained by the absolute requirement of Fc γ receptors for neutrophil extravasation during the rpA reaction²⁵ and by the generally compromised innate immunity of mice lacking the FcR γ chain.²⁶ Therefore, in a similar manner to FcR γ chain^{-/-} mice, mice with a drug-induced or genetically induced platelet defect that would impair neutrophil infiltration could erroneously appear to be protected from inflammatory bleeding simply because neutrophil infiltration had not occurred in the first place.

The identification of neutrophils as the cause of inflammatory bleeding in thrombocytopenic mice led us to further explore how platelets manage to prevent their detrimental effects. We investigated the contribution of platelets to the regulation of neutrophil mobilization, infiltration, and degranulation and, ultimately, to the repair of neutrophil-inflicted vascular injury. In agreement with previous studies,²⁷ our results show that platelets enhance neutrophil infiltration, as demonstrated by the increased neutrophil content at the rpA reaction site in mice with normal platelet counts as compared with thrombocytopenic mice, whether the reaction was induced in the skin or peritoneal cavity. Probably reflecting in part their decreased neutrophil infiltration, thrombocytopenic mice showed reduced levels of secreted MMP-9 and MPO and decreased oxidative stress in peritoneal lavage fluids after IC-induced peritonitis. The MPO degranulation index of thrombocytopenic mice was normal, indicating that platelets do not specifically regulate the release of primary granules in this setting. On the contrary, the degranulation index for MMP-9 was reduced in thrombocytopenic mice, thus indicating that platelets stimulate the secretion of neutrophil gelatinase granules. The normalization of the oxidative stress level with respect to neutrophil infiltration also showed that platelets stimulate oxidative activity during IC-mediated peritonitis. Although we cannot be certain that these observations made in IC-induced peritonitis also apply when the rpA reaction occurs in the skin, they are in line with the stimulating effect of platelets on neutrophil cytotoxic activities that was previously reported in other models of localized tissue inflammation.^{28,29}

Regarding the role of the collagen receptor GPVI, GPVI^{-/-} mice showed normal neutrophil infiltration when the rpA reaction was induced in the skin and a slightly lower, but nonsignificant, infiltration

in comparison with controls when the reaction was elicited in the peritoneal cavity. Therefore, GPVI does not appear to play a major role in the enhancement of neutrophil infiltration by platelets at sites of IC-induced inflammation. However, GPVI^{-/-} mice had reduced levels of secreted MMP-9 and a low degranulation index for MMP-9 that was similar to that of thrombocytopenic mice. It thus appears that GPVI is implicated in stimulation of neutrophil gelatinase granule secretion by platelets. The reduced oxidative index of GPVI^{-/-} mice also suggests that GPVI contributes to the pro-oxidative action of platelets. Interestingly, a role for platelet GPVI in the regulation of MMP-9 production in innate immune cells was previously suggested by the results of a study showing that platelets stimulated MMP-9 production in monocytes only in the presence of collagen.³⁰ Collectively, these results showing that platelets support neutrophil infiltration and degranulation indicate that prevention of neutrophil-dependent bleeding by platelets is not due to downregulation of neutrophil infiltration or degranulation. Furthermore, the implication of GPVI in the platelet-dependent enhancement of neutrophil secretion and oxidative activity during the rpA reaction corroborates the proinflammatory function of GPVI demonstrated in other inflammatory models.³¹

Our data revealed that another way by which platelets could counter neutrophil tissue-damaging activities was by exerting a buffering action via the scavenging of neutrophil elastase. An increase in platelet-associated neutrophil elastase indeed occurred during IC-mediated inflammation, suggesting that platelets scavenge neutrophil elastase from the reaction site and convey it into the circulation. However, the fact that GPVI^{-/-} mice displayed inflammatory bleeding despite normal elastase scavenging suggests that elastase uptake by platelets is not essential or sufficient to inhibit or stop inflammatory bleeding.

Finally, we found that platelets were actively recruited to the inflamed vasculature where they adhered as single platelets bound to adherent neutrophils or directly to the vessel lining. However, during the 4 hours of the rpA reaction, no thrombus was detected. This observation showing that platelets can exert hemostatic functions independently of thrombus formation is in agreement with previous observations made in models of kidney and skin inflammation,^{11,12} and in solid tumors.³² Our study further shows that this recruitment of platelets relies in part on GPVI and is largely dependent on neutrophils, as indicated by the decreased platelet content in the inflamed skin of GPVI^{-/-} mice compared with their wild-type littermates and by the complete prevention of platelet recruitment in neutropenic mice. A similar implication of neutrophils and GPVI in platelet recruitment to the inflamed vasculature was previously shown in a model of glomerulonephritis induced by IV injection of an antibody to the glomerular basement membrane.³³ Consistent with our results, this previous study showed that neutrophil depletion and GPVI deficiency also reduced platelet accumulation in the inflamed glomerulus. Additionally, our intravital microscopy analysis revealed that neutrophils not only bind platelets directly but also unmask platelet- and GPVI-binding sites on the inflamed vessel wall. Our results therefore support the concept that the recruitment of platelets and neutrophils to sites of inflamed and/or injured vessels relies on 2-way cooperative interactions.^{33,34} In this context, it is interesting to note that the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) was recently identified as a leukocyte counterreceptor for GPVI expressed by neutrophils.^{35,36}

When addressing the extent of endothelial damage during the early phase of the rpA reaction, we observed that the endothelial lining was generally preserved but displayed alterations in regions of neutrophil infiltration, thus suggesting that endothelial injury and/or endothelial retraction contribute to inflammatory bleeding. Surprisingly, whether in GPVI^{-/-} or thrombocytopenic mice, not all vessels supporting neutrophil infiltration bled. This latter observation shows that for

inflammatory bleeding to occur, neutrophil infiltration per se is not sufficient. Thus, additional factors such as the vessel condition and/or local concentration of neutrophil injurious substances are also likely to be involved. This could further explain why neutrophil infiltration did not cause bleeding when the rpA reaction was elicited in the peritoneal cavity of thrombocytopenic mice.

Given that GPVI is the main platelet receptor for collagen, it is likely that single platelets stop bleeding by covering small areas where the basement membrane gets exposed and disrupted by neutrophils. Nevertheless, although single adherent platelets could have exerted a purely mechanical action by plugging small holes in the endothelial lining, we show that platelets release soluble factors during the course of the rpA reaction and that prevention of platelet ITAM signaling partially impairs the ability of wild-type platelets to rescue inflammatory bleeding when transfused into GPVI^{-/-} mice. It then appears that like in tumors,³² activation-dependent secretion and/or spreading of individual platelets bound to the vessel wall or to neutrophils also contribute to sealing of the vascular breaches inflicted by neutrophils. In that regard, we have previously shown that even when not causing aggregation, collagen binding to GPVI leads to the release of soluble platelet factors such as angiopoietin-1, serotonin, and adenosine triphosphate, all of which are regulators of endothelial cell barrier function.³⁷ Moreover, platelets lacking the adapter protein SLP-76, which mediates GPVI-dependent platelet responses to collagen including degranulation and spreading, were previously shown to be unable to prevent inflammatory bleeding in the very same model of cutaneous rpA reaction we used here.¹⁵

In conclusion, our results demonstrate that although platelets exert proinflammatory functions by enhancing neutrophil infiltration, degranulation, and oxidative stress during IC-induced inflammation, they also control the associated risk of bleeding by sealing neutrophil-induced vascular breaches via GPVI-dependent platelet activation and binding to the injured vessel wall. More generally, our study suggests

that platelets should be considered as integral players of IC-mediated inflammation that intervene not only to amplify the recruitment of neutrophils but also to regulate their toxic activities and repair the damage they induce. Finally, our results indicate that inflammation represents an unconventional hemostatic situation in which early adhesion and activation of individual platelets is sufficient to prevent bleeding.

Acknowledgments

The authors thank Dr Mary Osborne-Pellegrin for her help in editing this manuscript.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by grants from La Fondation de France (2014/GRE/LL/HB/205-U1148), DHU FIRE, CORDDIM Région Ile de France (B.H.-T.-N.), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GO1360/4-1) (T.G.).

Authorship

Contribution: A.G., L.L., V.O., V.S., S.L., and B.H.-T.-N. designed and performed experiments and analyzed data; T.G., B.N., and M.J.-P. provided reagents and conceptual advice; B.H.-T.-N. wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Benoît Ho-Tin-Noé, INSERM U1148, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, 75877 Paris Cedex 18, France; e-mail: benoit.ho-tin-noe@inserm.fr.

References

- Petri B, Broermann A, Li H, et al. von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood*. 2010;116(22):4712-4719.
- Cloutier N, Paré A, Farndale RW, et al. Platelets can enhance vascular permeability. *Blood*. 2012;120(6):1334-1343.
- Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, et al. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*. 2013;121(6):1008-1015.
- Massberg S, Konrad I, Schürzinger K, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*. 2006;203(5):1221-1233.
- Dole VS, Bergmeier W, Mitchell HA, Eichenberger SC, Wagner DD. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood*. 2005;106(7):2334-2339.
- Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(3):254-261.
- Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 2013;13(2):169-180.
- von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012;209(4):819-835.
- Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2013;123(18):2768-2776.
- Fujimi S, MacConmara MP, Maung AA, et al. Platelet depletion in mice increases mortality after thermal injury. *Blood*. 2006;107(11):4399-4406.
- Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood*. 2008;111(10):4958-4964.
- Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation*. 2009;120(13):1255-1265.
- Iannacone M, Sitia G, Isogawa M, et al. Platelets prevent IFN-alpha/beta-induced lethal hemorrhage promoting CTL-dependent clearance of lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(2):629-634.
- Ho-Tin-Noé B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost*. 2011;9(suppl 1):56-65.
- Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, et al. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest*. 2013;123(2):908-916.
- Ho-Tin-Noé B, Carbo C, Demers M, Cifuni SM, Goerge T, Wagner DD. Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *Am J Pathol*. 2009;175(4):1699-1708.
- 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.
- Mayadas TN, Tsokos GC, Tsuboi N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation*. 2009;120(20):2012-2024.
- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-175.
- Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue AH, et al. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood*. 2000;96(5):1798-1807.
- McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res*. 1999;95(1):1-18.
- Quek LS, Bolen J, Watson SP. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Curr Biol*. 1998;8(20):1137-1140.
- Yanaga F, Poole A, Asselin J, et al. Syk interacts with tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets activated by collagen and cross-linking of the Fc gamma-IIA receptor. *Biochem J*. 1995;311(Pt 2):471-478.
- Poole A, Gibbins JM, Turner M, et al. The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J*. 1997;16(9):2333-2341.
- Shashidharamurthy R, Hennigar RA, Fuchs S, Palaniswami P, Sherman M, Selvaraj P. Extravasations and emigration of neutrophils to

- the inflammatory site depend on the interaction of immune-complex with Fcγ receptors and can be effectively blocked by decoy Fcγ receptors. *Blood*. 2008;111(2):894-904.
26. Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell*. 1994; 76(3):519-529.
 27. Hara T, Shimizu K, Ogawa F, et al. Platelets control leukocyte recruitment in a murine model of cutaneous arthus reaction. *Am J Pathol*. 2010; 176(1):259-269.
 28. Hidalgo A, Chang J, Jang JE, Peired AJ, Chiang EY, Frenette PS. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat Med*. 2009;15(4): 384-391.
 29. Rossaint J, Herter JM, Van Aken H, et al. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. *Blood*. 2014;123(16):2573-2584.
 30. Galt SW, Lindemann S, Medd D, et al. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ Res*. 2001;89(6):509-516.
 31. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*. 2010;327(5965):580-583.
 32. Ho-Tin-Noé B, Goerge T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res*. 2008;68(16): 6851-6858.
 33. Devi S, Kuligowski MP, Kwan RY, et al. Platelet recruitment to the inflamed glomerulus occurs via an alphaIIb beta3/GPVI-dependent pathway. *Am J Pathol*. 2010;177(3):1131-1142.
 34. Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood*. 2012;120(10):2133-2143.
 35. Schulz C, von Brühl ML, Barocke V, et al. EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *J Thromb Haemost*. 2011;9(5): 1007-1019.
 36. Wang CH, Dai JY, Wang L, et al. Expression of CD147 (EMMPRIN) on neutrophils in rheumatoid arthritis enhances chemotaxis, matrix metalloproteinase production and invasiveness of synovial cells. *J Cell Mol Med*. 2011;15(4): 850-860.
 37. Ollivier V, Syvannarath V, Gros A, et al. Collagen can selectively trigger a platelet secretory phenotype via glycoprotein VI. *PLoS ONE*. 2014; 9(8):e104712.

Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune complex-mediated inflammation in mice

Angèle Gros^{1,2}, Varouna Syvannarath^{1,2}, Lamia Lamrani^{1,2}, Véronique Ollivier^{1,2}, Stéphane Loyau^{1,2}, Tobias Goerge^{3,4}, Bernhard Nieswandt⁵, Martine Jandrot-Perrus^{1,2}, Benoît Ho-Tin-Noé^{1,2}.

Supplemental Information

Supplemental methods

Reagents

Medium titanium skinfold chambers were from APJ Trading Co (Ventura, CA). Polyclonal anti-GPIb α rat IgG R300 and polyclonal non-immune rat IgG C301 were from Emfret Analytics (Eibelstadt, Germany). Purified rat anti-mouse Ly6G (clone 1A8) was from BD pharmingen (San Diego, CA). Rabbit IgG fraction to bovine albumin was from Cappel (MP Biomedicals, Irvine, CA). Myeloperoxidase (MPO), bovine serum albumin (BSA), tetramethylbenzidine (TMB), hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTAB), rhodamine-6G were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Amplex ultra red reagent and calcein-AM (C-3100MP) were from Life Technologies (Saint-Aubin, France). The protein tyrosine kinase inhibitors ibrutinib (PLI-32765) and R406 (S2194) were from Selleckchem. (Houston, TX)

Immunodepletion of platelets and neutrophils

Thrombocytopenia was induced by intravenous injection of a rat anti-mouse GPIb α IgG (R300, Emfret Analytics, Eibelstadt, Germany) at 2.5 $\mu\text{g/g}$ mouse. Control mice were injected with a non-immune rat polyclonal IgG. Neutrophil depletion was induced by intraperitoneal injection of 5 $\mu\text{g/g}$ mouse of rat anti-Ly-6G 48 hours prior to inflammatory challenge. Control mice were injected with PBS. Thrombocytopenia and neutropenia were evaluated using an automated veterinary hematology analyzer (ABX ABC Vet, Horiba ABX, Montpellier, France).

The intravenous injection of the platelet-depleting antibody resulted in ≥ 97 % reduction in circulating platelets at 1 hour post-injection in all mice. The neutrophil-depleting antibody resulted in ≥ 70 % reduction in circulating neutrophils in all mice.

For experiments aimed specifically at assessing the impact of thrombocytopenia on neutrophil mobilization, a 6-hour recovery period between the induction of thrombocytopenia and that of

IgG immune complex-mediated inflammation was allowed to avoid potential interferences of the platelet depletion process with the determination of blood count.

Measurement of skin hemoglobin and myeloperoxidase content

Mice were sacrificed after 4 hours of reaction and biopsies of control and inflamed skin were harvested using 5 mm diameter biopsy punches. Skin biopsies were homogenized and sonicated in cold PBS. Tissue lysates were centrifuged and 25- μ L aliquots of the supernatants were collected for measurement of hemoglobin content by addition of formic acid and absorbance reading at 405 nm. MPO extraction was then conducted by adding 1:1 (v/v) potassium phosphate buffer (50 mM final concentration) supplemented with hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB, 0.9 % final concentration, Sigma, St. Louis, MO) to the remaining supernatants and tissue pellets that were further homogenized and sonicated. Tissue extracts were then filtered and centrifuged (10000 g, 5 min), and MPO activity was measured by adding 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, Sigma). The reaction was stopped with sulfuric acid and the absorbance at 450 nm was recorded using a Multiskan plate reader (Thermo Labsystems Nepean Ontario Canada).

When samples were rich in hemoglobin, hemoglobin removal was performed using hemoglobind (Biotech Support Group, Monmouth Junction, NJ) following the manufacturer's instruction prior to measurement of MPO activity.

Measurement of skin PF4 content

Platelet factor 4 (PF4) levels in supernatants of skin homogenates were assayed using an ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

Measurement of plasma serotonin level

Serotonin (5-HT) levels in plasma were assayed using an ELISA kit (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France) according to the manufacturer's instructions.

Analysis of peritoneal lavage fluid

Free MMP-9 and MPO in peritoneal lavage fluids were measured by ELISA using kits from Biosensis (Thebarton, Australia) and Hycult Biotech (Uden, The Netherlands), respectively.

For evaluation of global oxidative stress, Amplex UltraRed reagent was added directly to the peritoneal lavage buffer (5 μ M final concentration, Life technologies) and allowed to react for 10 min in the peritoneal cavity before collection of the lavage fluid. The lavage fluid was then centrifuged (500 g, 5 min), and the fluorescence of the Amplex UltraRed reagent oxidation product was measured in the supernatant using an Infinite M200 Pro microplate fluorometer (Tecan, Lyon, France). Background levels of MMP-9, MPO, and of oxidative activity in the peritoneal cavity were calculated from lavage fluids recovered 4 hours after injecting control mice with 500 μ L NaCl.

Flow cytometry

Aliquots (200 μ L) of peritoneal lavage fluids were supplemented with 2 mM EDTA, centrifuged, and the cell pellets were resuspended in PBS and analyzed by flow cytometry using antibodies to Ly6G (clone 1A8) for neutrophil detection, and to GPV for platelet detection (Gon.C2 , FITC; Emfret Analytics). Flow cytometry counting beads (Flow-count Fluospheres, Beckman & Coulter, Villepinte, France) were added to the samples prior to analysis.

Elastase on circulating platelets was measured using an antibody to neutrophil elastase (polyclonal, PE-Cy5; Bioss, Massachusetts, USA) in combination with the anti-GPV antibody cited above.

Preparation and transfusion of washed platelets

Transfusion of mouse platelets were performed as previously described previously with slight modifications¹. Briefly, blood was collected from the retro-orbital venous plexus of wild-type mice and washed platelets were prepared from platelet rich plasma by centrifugation and finally resuspended in Tyrode's buffer [137 mmol/L NaCl, 2 mmol/L KCl, 12 mmol/L NaHCO₃, 0.3 mmol/L NaH₂PO₄, 5.5 mmol/L glucose, 5 mmol/L HEPES (pH 7.3)]. Platelets were labeled with calcein-AM and treated with ibrutinib and R406 for 15 min before the last centrifugation step. Ibrutinib and R406 were used at a concentration of 16 μM each, which inhibited ATP release and P-selectin/phosphatidylserine exposure in washed platelets stimulated *in vitro* with up to 50 μg/mL fibrillar collagen while these responses remained unaffected when thrombin was used as an agonist (not shown). A total of 9x10⁶ washed platelets were injected per GPVI^{-/-} recipient mouse.

In vivo imaging of the cutaneous reverse passive arthus reaction

Dorsal skinfold chambers and surgical preparation were performed as described previously². Within 5 minutes after induction of the rpa reaction, mice anesthetized with ketamine/xylazine (100 mg/kg, 10 mg/kg, respectively) were injected with fluorescent tracers through the retro-orbital venous sinus, and placed under an upright fluorescence microscope (MacroFluo, Leica Microsystems, Nanterre, France) equipped with a thermostated heating plate and a 5X objective, and connected to a sCMOS camera (Orca-Flash-4.0, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) for image acquisition using Metamorph software (Molecular Devices, Downington, PA). For staining of all circulating platelets and leukocytes, rhodamine-6G was injected at 3 mg/kg mouse. For specific observation of platelets and neutrophils, fluorescent rat monoclonal antibodies to either GPIIb/IIIa (X488, Emfret Analytics) or Ly6G (clone 1A8, BD Pharmingen, labeled with Alexa 555 (Life Technologies) as

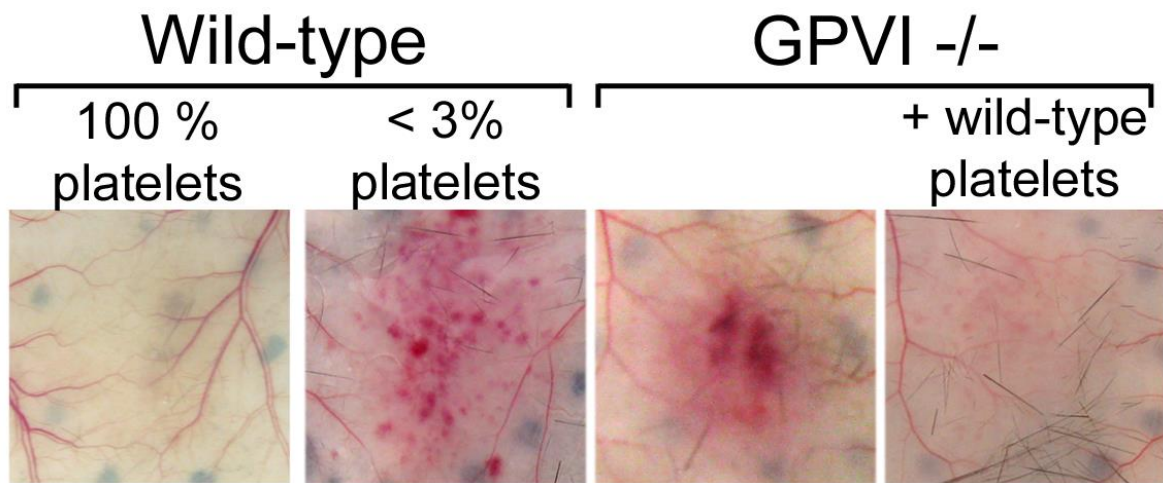
described previously² were injected intravenously at 0.1 mg/kg mouse. For staining of endothelial cells, 2.5 µg of an antibody to mouse CD31 labeled with Alexa 647 (Life Technologies) in 50 µL saline were added directly to the observation chamber and rinsed with saline after 10 min.

Microspheres

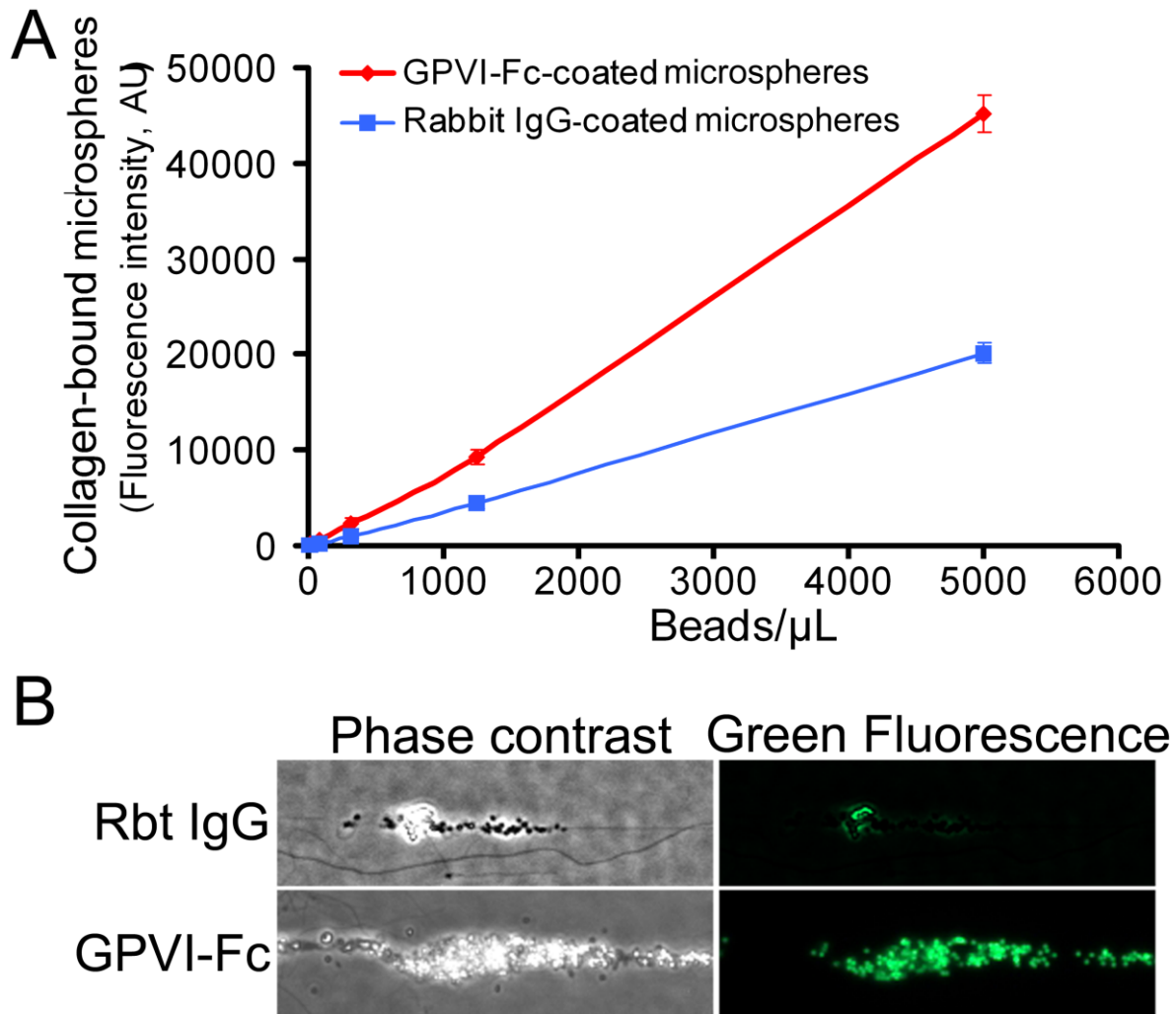
Fluorescent microspheres (FluoSpheres Carboxylate-Modified Microspheres, 2 µm, yellow-green fluorescent, Molecular Probes, Life Technologies, Saint Aubin, France) were coated at 1.8 µg GPVI-Fc or irrelevant rabbit IgG/cm² bead surface area following the manufacturer's instructions.

Microspheres were injected at $75 \cdot 10^6$ beads/mouse in saline for intravital microscopy and at $200 \cdot 10^6$ beads/mouse in saline for experiments aiming at measuring microsphere recruitment to the inflamed skin.

Supplemental Figures



Supplemental Figure 1. Inflammatory bleeding in GPVI^{-/-} mice can be rescued by transfusion of wild-type platelets. Representative images comparing skin bleeding in control and thrombocytopenic wild-type mice, GPVI^{-/-}, and GPVI^{-/-} mice that were transfused with 9×10^6 washed platelets isolated from wild-type mice. A total of 8 GPVI^{-/-} mice were transfused with wild-type platelets, all of which were protected from rpa reaction-induced bleeding.



Supplemental Figure 2. Characterization of GPVI-Fc-coated fluorescent microspheres.

A. Dose response analysis of control and GPVI-Fc-coated microspheres binding to collagen-surfaces. Microspheres were incubated in static conditions for 1 hour in collagen coated-wells of 96-well plates. At the end of the incubation period, the wells were rinsed and residual adherent fluorescent microspheres were quantified by measurement of their green fluorescence. **B.** Representative images showing the specific interaction of GPVI-Fc-coated microspheres (green) with collagen fibers as compared to control microspheres coated with irrelevant rabbit IgG. The microspheres were added to citrated whole blood and perfused over collagen-coated flow chambers. The images were taken after rinsing the chambers with saline. Platelets adhering to the collagen fibers can be seen in the phase contrast images.

Supplemental References

- 1. Ho-Tin-Noe B, Goerge T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res.* 2008;68(16):6851-6858.**
- 2. Boulaftali Y, Lamrani L, Rouzaud MC, et al. The mouse dorsal skinfold chamber as a model for the study of thrombolysis by intravital microscopy. *Thromb Haemost.* 2012;107(5):962-971.**

The contribution of platelet GPVI and CLEC-2 to vascular integrity during inflammation is stimulus and organ dependent

Running Title: GPVI and CLEC-2 in vascular integrity

Julie Rayes^{1*}, Siân Lax^{1*}, Angèle Gros², Surasak Wichaiyo¹, Soumaya Jadoui², Véronique Ollivier², Bernhard Nieswandt³, Jerry Ware⁴ Martine Jandrot-Perrus², Steve P. Watson¹ and Benoît Ho-Tin-Noé^{2#}

¹Institute of Cardiovascular Science, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, UK.

²Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratory for Vascular Translational Science, Inserm Unit 1148; 75018, Paris, France.

³Rudolf Virchow Center, DFG Research Center for Experimental Biomedicine, University of Würzburg, Würzburg, Germany.

⁴Department of Physiology and Biophysics, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas, USA.

= corresponding author

Correspondence: Dr Benoît Ho-Tin-Noé, INSERM Unit 1148, Bichat Hospital, Paris, France. Telephone: +33 1 40 25 86 03. Email: benoit.ho-tin-noe@inserm.fr

* = contributed equally to the manuscript

Key points

- GPVI plays the major role in controlling vascular integrity in the inflamed skin, with CLEC-2 being involved only in the absence of GPVI
- The contribution of platelet GPVI, CLEC-2 and GPIb-V-IX to vascular integrity varies between vascular beds and inflammatory challenges

Abstract

Maintenance of vessel integrity during inflammation is known to be mediated by platelets. Results from previous studies have indicated that platelet GPVI and CLEC-2 are central to this function. In the present study, we extend this observation by demonstrating that the roles of GPVI and CLEC2 are stimulus and organ dependent. Using cutaneous reverse passive Arthus reaction (rpA) and intranasal lipopolysaccharide LPS instillation, vascular integrity was assessed in CLEC-2-deficient, GPVI-deficient and mice deficient in both receptors. Our results show that GPVI plays the major role in controlling vascular integrity in the skin, with CLEC-2 being involved only in the absence of GPVI. In contrast, neither receptor plays a prominent part in maintaining vascular integrity in the lungs, which relies on GPIb-V-IX. These results demonstrate the functional heterogeneity in the roles of GPVI, CLEC-2 and GPIb in vascular integrity at sites of inflammatory challenge.

Introduction

Platelets play a critical role in prevention of hemorrhaging at sites of inflammation through a pathway that is independent of “classical” haemostasis, a process known as vascular integrity. For instance, in mouse models of immune complex-mediated skin inflammation and glomerulonephritis, early protective recruitment of platelets to the inflamed vasculature occurs without visual evidence of thrombosis, as assessed by intravital microscopy or immunohistological analysis^{1,2}. Furthermore, neither GPIb α nor integrin α IIb β 3 are required for the prevention of haemorrhaging in the inflamed skin¹.

Using an experimental model of adoptive transfer into IL4-R-GPIb α transgenic mice rendered thrombocytopenic with an antibody to ILR-4, Boulaftali *et al.* demonstrated a role for GPVI and CLEC-2 in prevention of bleeding following cutaneous rpA and in LPS-induced lung inflammation. Transfusion of platelets lacking GPVI or CLEC-2 was unable to rescue bleeding in thrombocytopenic hIL4R α /GPIb α -tg mice whereas recovery was seen on transfer of platelets unresponsive to ADP, thrombin and thromboxane A₂³. Using GPVI-deficient mice, the role of GPVI in stopping bleeding in the cutaneous rpA model has since been confirmed in mice with normal platelet count, and was further shown to involve repairing of neutrophil-inflicted vascular injury⁴. In the present study, we have extended this work to other vascular beds and to mice deficient in CLEC-2 and the extracellular domain of GPIb α .

Methods

Mice

GPVI^{-/-5,6}, *Clec2^{fl/fl}PF4cre⁷*, double KO (DKO), *Pdpr^{fl/fl}VAV1cre⁺⁸*, *hIL4R/GPIb α -tg⁹* mice have been described previously. The lung inflammation model was approved by the Animal Care and Use Committee of the Claude Bernard Institute (Paris); the rpA model was undertaken under UK Home Office licence 70/8576 and the Animal Care and Use Committee of the Claude Bernard Institute.

Lung inflammation model

Sedated mice were inoculated intranasally with 20 μ g LPS from *Pseudomonas aeruginosa* prepared in 60 μ L of saline (30 μ L/nostril). Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed 24 hours later by cannulating the trachea with an 18-gauge angiocath and lavaging the lungs 2 times with 1 mL sterile PBS supplemented with 1% BSA and 2 mM EDTA. The BAL fluid was then centrifuged (8 min at 2000g) and pelleted cells were resuspended in 150 μ L PBS. A fraction of the resuspended cells was used for analysis in flow cytometry after combined fluorescent staining of CD45 and Ly6G for determination of neutrophil counts. The remaining fraction of cells was lysed by sonication to release haemoglobin from red blood cells, centrifuged (5 min at 10,000g), and haemoglobin concentration measured in supernatants as described⁴.

Reverse passive Arthus reaction

The rpA was induced in the back skin of shaved mice as described previously⁴. Briefly, the reaction was elicited by intradermal injection of rabbit anti-BSA IgG (60 μ g in 20 μ L saline, 2 spots/mouse) immediately followed by intravenous injection of BSA (50 μ g/g mouse) in saline. Mice were euthanized after 4 hours and skin biopsies at control and reaction sites harvested for haemoglobin determination and/or myeloperoxidase content⁴.

Statistics

All data are expressed as mean \pm standard deviation and were compared by the nonparametric Mann-Whitney U test or one-way ANOVA performed with Tukey's multiple comparison post-tests.

P values $<.05$ were regarded as statistically significant.

Results and Discussion

We compared the contribution of GPVI and platelet CLEC-2 in inflammation-induced bleeding in the rpA model. Mice with deletion of CLEC-2 on platelets or of its ligand podoplanin throughout the haematopoietic compartment did not bleed (Figure 1A, B). This is in contrast to the petechial bleeding in the skin of GPVI^{-/-} mice in agreement with previous results (Figure 1A)^{3,4}. Bleeding in GPVI^{-/-} mice was less severe than in thrombocytopenic mice, indicating involvement of one or more additional pathways. We therefore analyzed the effect of combined deletion of CLEC-2 and GPVI in platelets. RpA-induced skin bleeding in mice deficient in GPVI and in platelet CLEC-2 (DKO) was more severe than in GPVI^{-/-} mice and approached that of thrombocytopenic mice (Figure 1C). Treatment of GPVI^{-/-} mice with an antibody to podoplanin also led to a bleeding phenotype similar in extent to that of DKO mice (Figure 1A, C). These results thus indicate that GPVI plays a predominant role in the maintenance of vascular integrity in the inflamed skin and that the CLEC-2/podoplanin axis likely acts as a backup mechanism in case of deficiency in this first-line repair mechanism. They further imply that podoplanin is present in the inflamed skin, which we verified by immunostaining. Podoplanin was indeed detected at low level in skin of unchallenged mice and up-regulated following rpA model in all three mice models (Figure 1D).

We also examined the role of GPVI and platelet CLEC-2 in LPS inhalation-induced lung inflammation. In agreement with a previous report¹, immunodepletion of platelets using an anti-GPIb α antibody led to pulmonary bleeding (Figure 2). In contrast, however, neither GPVI- nor platelet CLEC-2-deficient mice bled with haemoglobin levels in BAL similar to those of LPS-challenged controls (Figure 2). Measurement of neutrophil count in BAL fluid indicated that the inflammatory reaction developed normally in both GPVI- and platelet CLEC-2-deficient mice (not shown). There was also no bleeding in the presence of the anti-podoplanin mAb 8.1.1. These data demonstrate that GPVI and CLEC-2 are not responsible for maintenance of vascular integrity by platelets in inflamed lungs. Besides platelet (hem)ITAMs, GPIb-V-IX can readily support platelet interactions with the vessel wall independently of prior platelet activation. A role for GPIb-V-IX in restraining inflammatory bleeding in the skin was previously excluded by the absence of bleeding phenotype in the cutaneous rpA of

hIL4R/GPIb α -tg mice¹, which lack the extracellular domain of GPIb α . Whether GPIb-V-IX contributes or not to maintenance of vascular integrity in inflamed lungs has however not been investigated. Therefore, using hIL4R/GPIb α -tg mice, we verified if GPIb-V-IX was involved in the prevention of inflammatory lung bleeding. Unlike mice with a deficiency in GPVI or platelet CLEC-2, and, though to a lesser extent than thrombocytopenic mice, hIL4R/GPIb α -tg mice exhibited clear lung bleeding following LPS challenge (Figure 2). This indicates a possible role for the interaction of the GPIb-V-IX receptor with von Willebrand factor (vWF) in the maintenance of vascular integrity in the inflamed lungs. Although von Willebrand factor is the principal ligand of the GPIb-V-IX complex, other ligands have been identified¹¹. Future studies will have to address this question by using vWF-deficient mice. In conclusion, we report that the roles of platelet GPVI and CLEC-2 in vascular integrity vary between vascular beds and the nature of the challenge. These results could be explained by the endothelium and the vascular basement membrane heterogeneity in structure and composition between the different organs, but this remains to be confirmed. In the cutaneous rpA model, we observed that the CLEC-2/podoplanin axis acts as a backup rather than redundant mechanism of GPVI for the prevention of inflammatory bleeding in the skin. We also show that GPVI and CLEC-2 are dispensable for maintenance of vascular integrity in LPS-inflamed lungs but that this depends on GPIb-V-IX. Collectively, our results demonstrate that the functional hierarchy between primary platelet adhesion receptors for maintenance of vascular integrity is organ and stimulus dependent.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the British Heart Foundation to S.P.W. (CH/03/003 and RG/13/18/30563), La Société Française d'Hématologie to A. G., and from Force Hémato and La Fondation Arc (PJA 20151203107) to B. H.

Authorship

Contribution: J.R., S.L., A.G., S.W., S.J., V.O., S.P.W. and B.H. designed and/or performed experiments and analyzed data; M.J.-P. provided conceptual advice; J.R., S.L., S.P.W. and B.H. wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood*. 2008;111(10):4958-4964.
2. Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation*. 2009;120(13):1255-1265.
3. Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, et al. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest*. 2013.
4. Gros A, Syvannarath V, Lamrani L, et al. Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood*. 2015;126(8):1017-1026.
5. Kato K, Kanaji T, Russell S, et al. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood*. 2003;102(5):1701-1707.
6. Bender M, Hagedorn I, Nieswandt B. Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl₃ -induced thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011;9(7):1423-1426.
7. Finney BA, Schweighoffer E, Navarro-Nunez L, et al. CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood*. 2012;119(7):1747-1756.
8. Hitchcock JR, Cook CN, Bobat S, et al. Inflammation drives thrombosis after Salmonella infection via CLEC-2 on platelets. *J Clin Invest*. 2015;125(12):4429-4446.
9. Kanaji T, Russell S, Ware J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 2002;100(6):2102-2107.
10. Parekh D, Patel JM, Scott A, et al. Vitamin D Deficiency in Human and Murine Sepsis. *Crit Care Med*. 2016.
11. Clemetson KJ. A short history of platelet glycoprotein Ib complex. *Thromb Haemost*. 2007; 98(1): 63-68.

Figure legends

Figure 1. Platelet GPVI supports a first-line repair mechanism for maintenance of vascular integrity in the inflamed skin, which can be partially backed up by the CLEC-2/podoplanin axis.

Mice were subjected to cutaneous reverse passive Arthus reaction (rpA) and skin biopsies were collected after 4h of reaction. **(A and B)** Representative images of the rpA-challenged skin of (A) wild-type (WT), GPVI deficient (GPVI^{-/-}), CLEC-2 deficient (*Clec2^{fl/fl}PF4cre⁺*) and mice deficient in both receptors (DKO), and **(B)** WT mice treated with a blocking antibody to podoplanin, mice with a deficiency of PDPN in hematopoietic cells (*Pdpr^{fl/fl}VAV1cre⁺*), or GPVI^{-/-} mice treated with a control or blocking antibody to podoplanin. **(C)** Hemoglobin content in inflamed and control skin biopsies. Platelet-depletion of WT mice served as a positive control. Induction of the rpA, led to significantly increased hemoglobin levels in GPVI^{-/-} and DKO but not in CLEC2^{-/-} mice.* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001. ns = not significant. n = 6. **(D)** Representative images of skin stained for podoplanin (brown) and haematoxylin (blue) from WT, GPVI^{-/-} and *Clec2^{fl/fl}PF4cre⁺* mice in unchallenged (UC) and post rpA biopsies. Scale bar = 100 µm.

Figure 2. Contribution of GPVI and CLEC-2 to maintenance of vascular integrity in the inflamed lungs Hemoglobin levels in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) collected after an overnight incubation following *P. aeruginosa* lipopolysaccharide intranasal instillation. Representative images of the retrieved BALFs are shown above the bar graphs. # indicates a statistically significant difference (p < 0.05) compared to control mice that were injected intranasally with saline (NaCl). n = 6 to 12 mice per group.

Figure 1

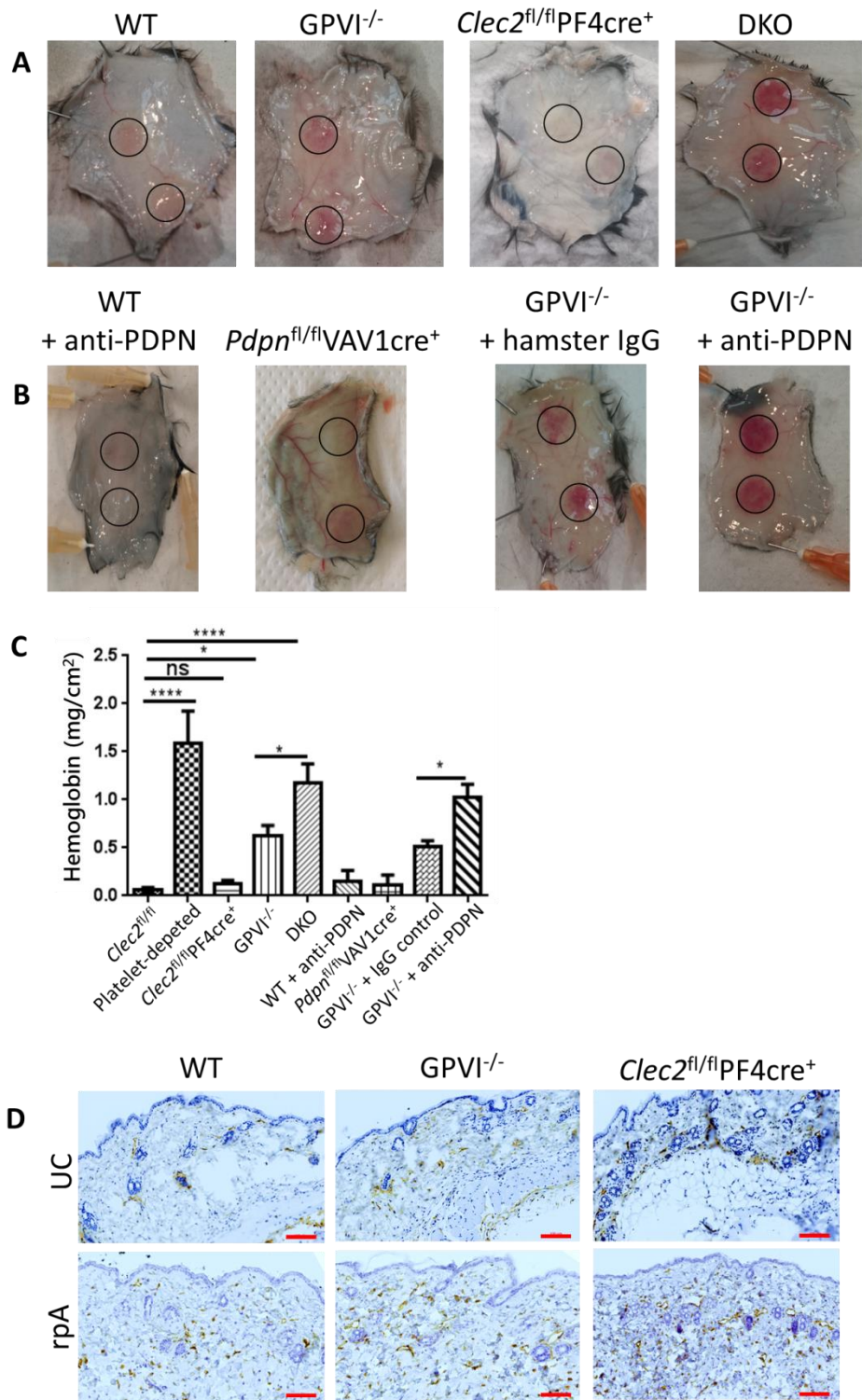
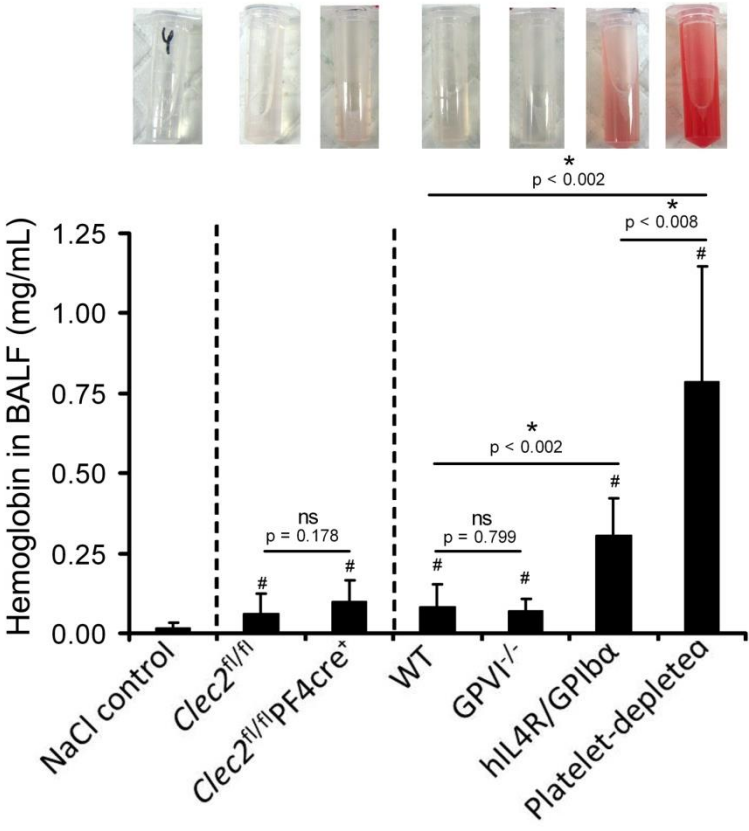


Figure 2



Conclusion

Des études antérieures ont montré le rôle des plaquettes dans la prévention des saignements inflammatoires lors de réactions siégeant dans plusieurs organes comme la peau, le rein, les poumons et aussi au niveau des tumeurs solides. Bien qu'il ait été suggéré que les récepteurs plaquettaire à motif ITAM contribueraient à cet effet protecteur, leur rôle devait être confirmé et les mécanismes précisés.

En induisant une réaction inflammatoire par complexes immuns (rpA) chez des souris contrôles, GPVI^{-/-} ou thrombopéniques (TP), nous avons confirmé que les dégâts vasculaires sont provoqués par les neutrophiles. Notre étude a montré que les plaquettes favorisent l'infiltration des neutrophiles dans la peau et le péritoine de manière indépendante de GPVI dans cette réaction inflammatoire. En revanche, chez les souris TP et GPVI^{-/-} l'index de sécrétion par neutrophile de la MMP9 est diminué mettant en évidence la contribution de GPVI dans la sécrétion des granules gélatinases. De même GPVI favorise la génération de stress oxydant. Cet effet pro-inflammatoire de GPVI a précédemment été rapporté dans un modèle expérimental d'arthrite (Boilard, Nigrovic et al. 2010). Chez les souris TP comme GPVI^{-/-}, le potentiel cytotoxique des neutrophiles est donc réduit.

Le dosage du facteur plaquettaire 4 (PF4) dans les biopsies de peau a montré que les plaquettes sont recrutées de manière dépendante de GPVI au site réactionnel dans les réactions induites par complexes immuns. De manière intéressante, chez les souris contrôles comme les souris GPVI^{-/-} rendues neutropéniques, le recrutement des plaquettes est fortement diminué. Cette coopération entre les deux types cellulaires a déjà été observée dans un modèle de glomérulonéphrite (Devi, Kuligowski et al. 2010). Ces résultats suggèrent que les plaquettes préviendraient la survenue des saignements inflammatoires par un rôle réparateur en interagissant directement avec la paroi vasculaire lésée au site réactionnel.

Par microscopie intravitale, nous avons observé que des plaquettes individualisées adhèrent à la fois aux neutrophiles et à l'endothélium sans former de thrombus. Des sites de liaison pour GPVI sont donc présents sur les neutrophiles et au niveau du sous-endothélium. L'endothélium est globalement préservé chez les souris contrôles, TP ou GPVI^{-/-} pendant la réaction comme montré par les images de microscopie intravitale. Cependant, des altérations du marquage vasculaire sont présentes au niveau des sites d'accumulation et d'infiltration des neutrophiles laissant penser à des zones d'exposition de la membrane basale et de liaison de GPVI. Les plaquettes en adhérant via GPVI aux vaisseaux endommagés préviendraient ainsi les saignements inflammatoires.

Dans les conditions étudiées, le recrutement des plaquettes au site inflammatoire est indépendant de toute signalisation intra-plaquettaire mais la prévention des saignements nécessite l'activation de la voie

ITAM comme le montre l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de cette voie de signalisation. La dermatite immuno-induite est de plus associée à une augmentation de la concentration plasmatique de sérotonine, dont les plaquettes sont la principale source circulante. Celle-ci est fortement diminuée chez les souris GPVI^{-/-}.

Le mécanisme d'action de la glycoprotéine VI au cours d'une réaction immuno-induite dans la peau est illustré par cette figure publiée dans *Blood Commentaries* (Figure 45) :

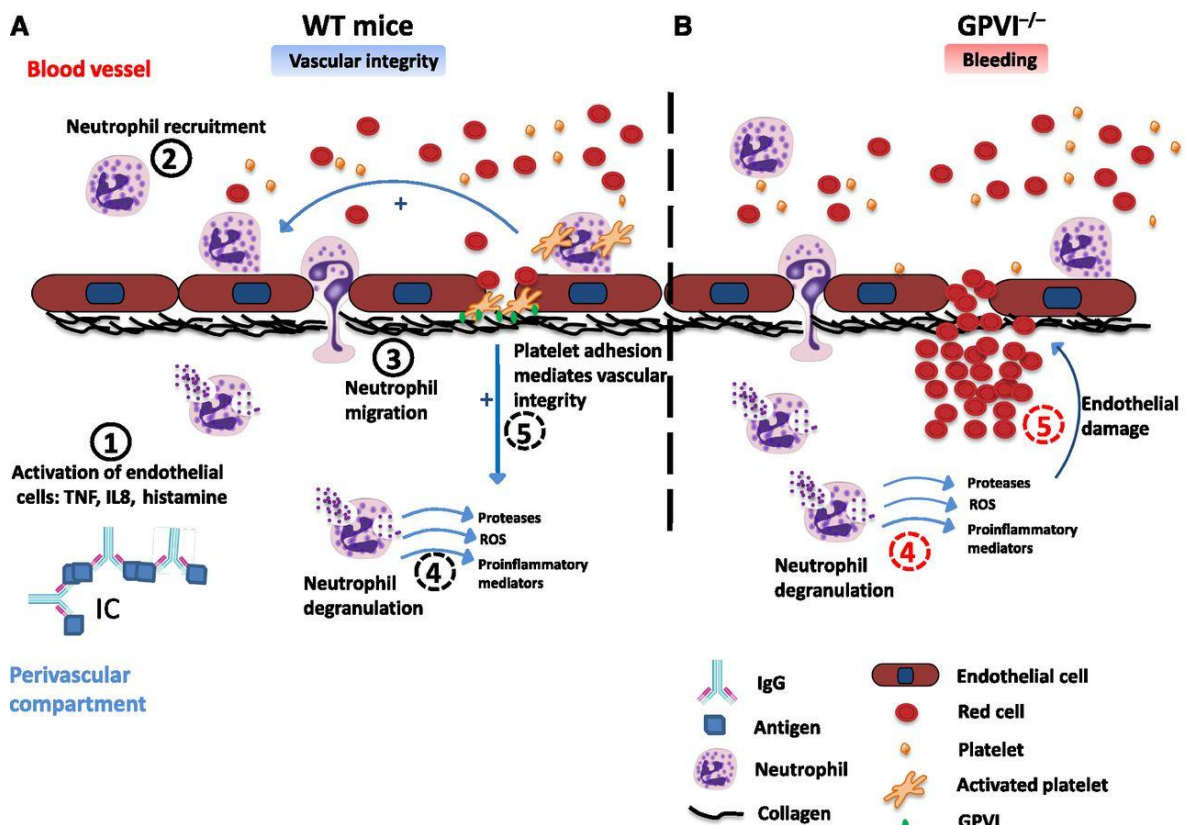


Figure 45 : La glycoprotéine VI participe aussi bien à l'activation des neutrophiles qu'à la réparation des dommages vasculaires dans une réaction immuno-induite dans la peau. Chez une souris contrôle (WT), la formation de complexes immuns (IC) dans les tissus (perivascular compartment) conduit à l'activation des cellules endothéliales (A1) et au recrutement des neutrophiles (A2). Après les étapes de rolling et d'adhésion, les neutrophiles s'infiltrent dans les tissus (A3). Les plaquettes favorisent cette infiltration tandis que GPVI est spécifiquement impliquée dans la sécrétion des granules gélatinases et la production de stress oxydant (ROS) (A4). La GPVI est indispensable à la prévention des saignements inflammatoires en permettant le recrutement et l'adhésion de plaquettes individualisées au sous-endothélium et à l'endothélium endommagé par les neutrophiles (A5). En absence de GPVI (B), la dégranulation des neutrophiles recrutés et leur production de stress oxydant sont diminués (B4) mais les plaquettes ne sont plus capables d'adhérer à l'endothélium endommagé et de combler les brèches vasculaires ce qui aboutit à des saignements inflammatoires (B5) (Rayes and Watson 2015).

Les saignements inflammatoires observés chez les souris GPVI^{-/-} sont moins sévères que chez les souris thrombopéniques, suggérant l'implication d'autre(s) récepteur(s). Sur les plaquettes, le récepteur CLEC-2 appartient aussi à la famille des récepteurs à ITAM. L'induction d'une rpA chez des souris génétiquement modifiées et présentant un déficit en CLEC-2 uniquement sur la lignée mégacaryocytaire (Clec2^{fl/fl} PF4Cre⁺) a montré que ce récepteur n'est pas nécessaire pour la prévention des saignements inflammatoires lors d'une réaction cutanée. Par contre, en absence de GPVI et de CLEC-2 (DKO), les saignements inflammatoires sont plus importants que chez les souris GPVI^{-/-} suggérant une coopération entre les deux récepteurs initiée par GPVI. Une autre hypothèse à explorer serait que GPVI pourrait compenser totalement l'absence de CLEC-2 tandis que l'hémi-ITAM CLEC-2 ne compenserait que très partiellement l'absence de GPVI. De plus, la rpA est associée à une augmentation de l'expression périvasculaire de la podoplanine pouvant favoriser une activation dépendante de CLEC-2.

A l'inverse de l'engagement de GPVI et de CLEC-2 dans le maintien de l'intégrité vasculaire dans la peau, ces deux récepteurs ne sont pas requis dans les poumons soumis à une inflammation aiguë induite par le LPS. Outre les souris thrombopéniques, seules les souris avec un déficit en GPIb α (hIL4R α /GPIb α) présentent des saignements inflammatoires dans les poumons.

Ces résultats confirment que l'engagement des récepteurs plaquettaire dans la prévention des saignements inflammatoires dépend de l'organe affecté et probablement des caractéristiques du lit vasculaire qui restent à élucider parmi les souris transgéniques soumises à ce modèle.

PUBLICATION 4

Neutrophil-endothelial cell interactions determine the regulation of neutrophil activities by platelets

Angèle Gros, Véronique Ollivier, Soumaya Jadoui, Fanny Guimier, Yacine Boulaftali,
Martine Jandrot-Perrus and Benoît Ho-Tin-Noé

Article en préparation

Introduction

Dans une réaction inflammatoire, les neutrophiles font partie des premières cellules de l'immunité mobilisées et recrutées dans les tissus lésés. Une régulation fine de leur activation est essentielle à la fois pour combattre les agressions endogènes ou exogènes et pour limiter les dommages tissulaires chez l'hôte. Au cours d'une réaction inflammatoire, les plaquettes participent à la régulation des différentes fonctions des neutrophiles. En effet les plaquettes favorisent l'infiltration des neutrophiles en mettant en jeu leurs différents récepteurs membranaires et les facteurs solubles contenus dans leurs granules alpha et denses. Les plaquettes régulent également les activités cytotoxiques des neutrophiles *in vivo* telles que la formation des *neutrophil extracellular traps* (NETs) dans les infections bactériennes (Clark, Ma et al. 2007) ou la production des espèces réactives de l'oxygène (Wu, Helfrich et al. 1994, Hidalgo, Chang et al. 2009). *In vitro*, ces effets régulateurs des plaquettes sur les activités cytotoxiques des neutrophiles ont aussi été observés. Cependant, selon les conditions expérimentales, des effets activateurs ou inhibiteurs des plaquettes sur la sécrétion des granules neutrophilaires ou la production des ROS ont été décrits (McGarrity, Hyers et al. 1988, Del Principe, Menichelli et al. 1990, Bengtsson, Zalavary et al. 1996, Losche, Dressel et al. 1996, Zalavary, Grenegard et al. 1996, Jancinova, Drabikova et al. 2000, Herbertsson and Bengtsson 2001) .

Ces données de la littérature nous ont conduits à formuler l'hypothèse selon laquelle la régulation des fonctions effectrices des neutrophiles par les plaquettes serait dépendante du microenvironnement dans lequel se déroulerait la réaction inflammatoire. En utilisant un modèle d'étude *in vitro* permettant les interactions entre plaquettes, neutrophiles et cellules endothéliales, nous avons recherché les déterminants de cette régulation des activités des neutrophiles par les plaquettes.

Neutrophil-endothelial cell interactions determine the regulation of neutrophil activities by platelets

Angèle Gros^{1*}, Véronique Ollivier^{1*}, Soumaya Jadoui¹, Fanny Guimier¹, Yacine Boulaftali¹,
Martine Jandrot-Perrus¹ and Benoît Ho-Tin-Noé¹

¹ Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratory for Vascular Translational Science, Inserm Unit 1148; 75018, Paris, France.

* = contributed equally to the manuscript

Article in preparation

Abstract

Platelets are involved in immune responses and inflammatory reactions. They can regulate endothelium activation and permeability, as well as leukocyte recruitment and effector functions. Notably, platelets have been shown to regulate neutrophil cytotoxic activities in various experimental models of inflammation. However, depending on the model considered, platelets either enhance or dampen neutrophil cytotoxic activities. How the regulatory action of platelets can be shifted towards stimulation or inhibition remains largely unknown. Here, we investigated the determinants of the platelet regulatory activity towards neutrophil secretion of elastase and oxidative activity. For this study, isolated human neutrophils and platelets were co-incubated in the absence or presence of endothelial cells, and stimulated with neutrophil and/or platelets agonists. We show that resting and activated platelets limit the secretion of neutrophil elastase and the oxidative activity of neutrophils in suspension, and that this inhibitory action of platelets requires cell-cell contacts. Conversely, when neutrophils were pre-adhered on endothelial cells (EC) prior to platelet addition, both resting and activated platelets enhanced neutrophil elastase secretion and oxidative activities. Our results thus indicate that neutrophil/EC interactions are major determinants of the regulatory action of platelets on neutrophils that guide this action towards stimulation of neutrophil cytotoxic activities.

Introduction

Platelets are crucial to ensure the haemostatic response characterized by the formation of a thrombus after their activation and aggregation [1]. Platelets are also involved in other processes as immune responses and inflammatory reactions [2]. In particular, it is well known that platelets promote leukocyte recruitment and infiltration in many inflamed organs. In addition, platelets can modulate various effector functions of leukocytes, including those of neutrophils, which are the most abundant circulating leukocytes in humans and the first to arrive at sites of inflammation [3]. Notably, in recent years, platelets were shown to stimulate the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) *in vitro* but also *in vivo* in models of bacterial infection [4-6]. The effect of platelets on other effector functions of neutrophils is less clear and it appears that depending on the pathophysiological situation and/or experimental model considered, platelets can either stimulate or inhibit neutrophil cytotoxic activities. For instance, while several studies described a stimulatory effect of platelets on ROS production by neutrophils, other studies showed the opposite effect [7-16]. Comparable discrepancies were found regarding the effect of platelets on neutrophil granule secretion [11, 17-20]. Therefore, while there is clear evidence that platelets can regulate neutrophil cytotoxic activities, how this regulatory action of platelets can be shifted towards stimulation or inhibition remains largely unknown. Nevertheless, one can hypothesize from all these experimental data that the regulatory action of platelets is highly context-dependent and could thus be determined by factors such as the nature of the inflammatory stimulus, the state of platelet activation, or by interactions with another major early actor of inflammatory reactions, the endothelium. Here, we investigated the influence of platelet and neutrophil activation states, and of endothelial cells on the regulation that platelets exert towards neutrophil secretion and oxidative activities.

Material and Methods

Ethics Statement

All blood donors were volunteers who gave their free and informed consent to this research study, which conforms to the ethical standards of the Declaration of Helsinki. Legal and ethical authorization for research use of collected blood was obtained through a national convention between the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm) and the French Blood Institute (EFS) (convention number I/DAJ/C2675).

Preparation of human washed platelets

Venous blood from healthy volunteers who had taken no medication during the previous two weeks was drawn into 15% (v/v) trisodium citrate acid-citric-dextrose (ACD-A, Vacutainer system; Beckton Dickinson, Le Pont-de-Clais, France). Washed platelets were prepared from isolated platelet-rich plasma (PRP) as previously described [21] and resuspended in platelet reaction buffer (Hepes 5 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaCl 137 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 2 mM, NaH₂PO₄ 0.3 mM, MgCl₂ 1 mM, glucose 5.5 mM, pH 7.4). At the end of the platelet preparation, and before adding the agonists, platelets were allowed to recover from PGE₁ and apyrase treatments for 20 min at 37°C.

Preparation of human polymorphonuclear neutrophils

Blood from healthy volunteers was drawn into tubes with ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, Vacutainer system; Beckton Dickinson, Le Pont-de-Clais, France). Neutrophils were isolated in LPS-free conditions by dextran sedimentation followed by Ficoll centrifugation as described previously [22]. Isolated neutrophils were subjected to hypotonic lysis in H₂O and washed 3 times, once with RPMI supplemented with 1 mM EDTA and 1% BSA, and then twice with RPMI without EDTA. Neutrophils were finally resuspended in endothelial cell growth medium without serum and growth supplements (Promocell, Heidelberg, Germany) but supplemented with 1 % BSA. Neutrophils were allowed to recover from preparation for 30 minutes at room temperature before starting experiments.

Co-incubation experiments and measurement of human neutrophil activities

Isolated neutrophils and washed platelets of the same donor were incubated 2 hours at 37°C with gentle orbital agitation in 96-well flat bottom plates at a physiological ratio of 1 neutrophil for 67 platelets. When indicated, cells were stimulated with recombinant human TNF- α (Millipore, East Midlands, United Kingdom) and in some experiments thrombin or collagen (Horm collagen, Nycomed, Munich, Germany) were added to the incubation medium.

Elastase activity was assessed by adding the substrate MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (Millipore, East Midlands, United Kingdom, 16 μ M final concentration) to cell suspensions and the liberation of fluorescent AMC was measured using a microplate fluorometer (Infinite M200 Pro, Tecan). In a similar manner, peroxidase activity was measured in the absence of exogenous H₂O₂ using Amplex UltraRed reagent (5 μ M final concentration) (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Production of reactive oxygen species (ROS) was measured with the fluorescent dye CM-H2DCFDA (5 μ M final concentration).

When indicated, the co-incubations were realized in Milicell cell culture inserts (0.4 μ m pore size, PET membrane, Millipore, Billerica, MA, USA) placed into 12-well plate in order to prevent cell contact between platelets and neutrophils.

Co-incubation experiments of platelets and neutrophils in the presence of human endothelial cells

Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAECs) were purchased from Promocell (Heidelberg, Germany) and cultured according to the manufacturer's procedures in endothelial cell basal medium 2 supplemented with the endothelial cell growth supplement pack at 37°C in 5% CO₂. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) were prepared as described previously [23]. HCAECs or HUVECs were grown at confluence on 48 or 96-well plate or in Corning cell culture inserts (3 μ m pore size, PET membrane) (Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l., Lyon, France) previously coated with fibronectin (50 μ g/mL). Cell culture inserts allow to reproduce and maintain a polarized microenvironment by separating culture wells into two compartments, and to preserve the endothelial cell apicobasal polarity in terms of secretion and structure. When endothelial cells were cultured on inserts, the same culture media were used in both apical (upper chamber) and basal chamber (lower chamber). During co-

incubation experiments, the medium in the basal chamber was replaced by endothelial cell growth medium without serum and growth supplements (Promocell, Heidelberg, Germany) but supplemented with 1 % BSA in the basal chamber. All experiments were carried out between the second and the fifth passage.

Platelets and neutrophils were added at the same ratio of 1 neutrophil for 67 platelets and neutrophil activities were measured in the same conditions.

When indicated, neutrophils were allowed to pre-adhere on endothelial cells during one hour. Non-adherent neutrophils were transferred to another plate. Platelets and inflammatory stimulus were added and the incubation was pursued for one more hour.

Fluorescence microscopy

For immunostaining, at the end of the incubation, 10 μ L of cell suspension were fixed in 990 μ L of 3.7% paraformaldehyde and centrifuged onto glass slides (15 min, 1200 g) and non-permeabilized cells were then stained using a mouse monoclonal antibody to neutrophil elastase (2 μ g/mL, Hycult Biotech, Uden, The Netherlands) and a rabbit polyclonal antibody to MPO (10 μ g/mL, Dako Glostrup, Danemark) in PBS 1% BSA. Alexa Fluor-conjugated goat polyclonal antibody to mouse and rabbit IgG (2 μ g/mL, Life Technologies) were used as secondary antibodies. Nuclei were stained with Hoechst 53542. The slides were mounted with fluorescence mounting medium (Dako). Observation and acquisition of DIC and fluorescence microscopy images were made using a Zeiss Axio Observer microscope equipped with an ApoTome system (Carl Zeiss, Le Pecq, France).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM) and were compared by the non-parametric Mann-Whitney test using GraphPad Prism software (San Diego CA). P-values < 0.05 were regarded as statistically significant.

Results and discussion

Resting platelets limit cytotoxic activities of neutrophils in suspension

To determine the regulation of neutrophils by platelets, we first incubated resting human platelets with unstimulated or TNF- α -stimulated neutrophils and assessed elastase and myeloperoxidase (MPO) activities, as well as ROS production. Cytotoxicity of neutrophils is highly related to these three defence mechanisms that are involved in numerous inflammatory diseases but also contribute to tissue and vascular injuries. In suspension, platelets reduced the basal elastase activity of unstimulated neutrophils. In the presence of TNF- α , platelets blocked the TNF- α -induced increase in neutrophil elastase activity (Figure 1A). Regarding MPO activity, we observed a comparable inhibitory effect of platelets (Figure 1B). In order to understand how platelets limit neutrophil cytotoxic activities, we incubated supernatants of TNF- α -stimulated neutrophils with increasing concentrations of resting platelets. In these conditions, platelets had no effect on neutrophil elastase or MPO activity (Figure 1C and 1D), thus indicating that platelets do not directly inhibit these neutrophil activities and rather act at the cellular level. The overall MPO activity being dependent on both MPO secretion and ROS production, we then verified the effect of platelets on degranulation and ROS generation. Measurement of MPO secretion as assessed by measurement of MPO activity in H₂O₂-saturating conditions revealed that platelets partially limited TNF- α -stimulated neutrophil degranulation (Figure 1E). In addition, platelets restricted ROS production by unstimulated and activated neutrophils (Figure 1F). Therefore, platelets limit the MPO activity of unstimulated and TNF- α -stimulated neutrophils by a combined action on MPO secretion and ROS generation.

Our previous results in a mouse model of immune-complex mediated peritonitis have indicated that platelets might be capable of scavenging neutrophil elastase by binding it at their surface [24]. We thus realized immunostainings for neutrophil elastase and MPO on the platelets collected after the co-incubation with neutrophils. Whereas no MPO was detected on platelets, neutrophil elastase was found on the surface of platelets that had been incubated with neutrophils (Figure 1G). This result confirms our previous observation and suggests that scavenging of neutrophil elastase by platelets might help to

reduce neutrophil activity. Nonetheless, further investigation will be necessary to determine if this mechanism substantially contributes to reduce elastase activity.

Cell-cell contact is required for the reduction of neutrophil cytotoxic activities by platelets

We then investigated how platelets dampen neutrophil elastase and oxidative activities. First, we assessed the respective contribution of platelet-derived soluble factors and cell-cell contacts to this inhibitory action of platelets by preventing physical interactions between platelets and neutrophils using transwell membranes (0.4 μm pore-size) to keep platelets and neutrophils physically separated during the incubation. In these conditions, the inhibitory effect of platelets towards neutrophil ROS production and neutrophil elastase and MPO activities was markedly reduced (Figure 2A-C). These results indicate that resting platelets inhibit these cytotoxic activities of neutrophils mainly in a cell contact-dependent manner. However, one cannot exclude a role of platelet-derived soluble factors after a first physical interaction between the two cell types. Further experiments will be necessary to identify the platelet and neutrophil receptors involved in this regulatory interaction.

Collagen-activated platelets potentiate their inhibitory effect on neutrophil activities

We next analyzed whether platelet activation could modify their capacity to modulate neutrophil cytotoxic activities. For these experiments, platelets were activated with 5 nM thrombin or with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ type I collagen. Those concentrations were chosen because of their ability to induce P-selectin surface expression, phosphatidylserine exposure, and secretion of soluble factors (not shown). Activation of platelets with thrombin did not modify their ability to limit ROS generation by neutrophils and neutrophil elastase and peroxidase activity (Figure 3A-C). Remarkably, collagen stimulated neutrophil peroxidase activity and ROS production in the absence of platelets (Figure 3B and 3C). However, platelets incubated with neutrophils in the presence of collagen retained their inhibitory effects, which were even more pronounced considering the stimulatory effect of collagen on neutrophils (Figure 3A-C). Regarding this latter effect, it should be noted that our results are in agreement with those of previous studies showing that type I collagen is a potent agonist of neutrophil oxidative stress

[25-28]. Taken together, these results indicate that platelets, whether resting or activated, limit the cytotoxic activities of unstimulated or TNF- α -stimulated neutrophils in suspension.

Endothelial cells are determinant for neutrophil regulation by platelets

In inflamed organs, endothelial cells get rapidly activated and interact with both leukocytes and platelets [29]. Therefore, we introduced endothelial cells in our *in vitro* model to mimic a more physiological environment. For these experiments, HCAECs and HUVECs were allowed to grow on fibronectin-coated multiwell culture plates before adding neutrophils and resting or activated platelets. The presence of endothelial cells did not significantly alter the inhibitory effects of platelets towards neutrophil elastase and oxidative activities (Figure 4A and 4B).

Adhesion has long been known to prime neutrophils for physiological activation in response to cytokines and other stimuli [30]. We then repeated these co-incubation experiments after letting neutrophils pre-adhere to various surfaces, including endothelial cells. When neutrophils were let to pre-adhere on uncoated or fibronectin-coated culture wells before the addition of platelets, platelets retained their inhibitory effects on both neutrophil elastase and oxidative activities (not shown). In a similar manner, platelets limited the cytotoxic activities of neutrophils adhered to endothelial cells (Figure 4C and 4D). Many studies have highlighted how cell culture conditions can affect the phenotype of endothelial cells [31-33]. Like epithelial cells, endothelial cells are polarized cells. However, most studies on endothelial cells neglect this aspect and use culture systems that do not allow for proper cell polarization. For this reason, we next cultured endothelial cells on cell culture inserts known to enable cell polarization, with the separated secretion of endothelial products in an apical (upper chamber) and a basal (lower chamber) compartment [34-36]. Strikingly, when resting platelets were added to neutrophils that had pre-adhered on endothelial cells grown in these culture systems, they enhanced neutrophil cytotoxic activities (Figure 5A and 5B). Notably, comparable results were obtained in the presence of collagen or thrombin (not shown).

Altogether, our results show that while resting and activated platelets dampen the cytotoxic activities of neutrophils naïve of interactions with endothelial cells, they stimulate those of neutrophils engaged in adhesion to endothelial cells. Thus, our results designate physical interactions between neutrophils and endothelial cells as major determinants that guide the regulatory activity of platelets towards stimulation of neutrophil cytotoxic activities.

Acknowledgements

This work was supported by grants from La Société Française d'Hématologie to A. G., and from Force Hémato and La Fondation Arc (PJA 20151203107) to B. H.

Authorship

Contribution: A.G., V.O., S.J, F.G, Y.B and B.H. designed and/or performed experiments and analyzed data; M.J.-P. provided conceptual advice; A.G and B.H wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W., Levi, M., Reitsma, P. H. (2013) New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 93, 327-58.
2. Semple, J. W., Italiano, J. E., Jr., Freedman, J. (2011) Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 11, 264-74.
3. Gros, A., Ollivier, V., Ho-Tin-Noe, B. (2014) Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair. *Frontiers in immunology* 5, 678.
4. Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., Sendo, F. (1996) Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of leukocyte biology* 59, 229-40.
5. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-5.
6. Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., Patel, K. D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G. D., Keys, E. M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C. J., Green, F. H., Kubes, P. (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine* 13, 463-9.
7. McGarrity, S. T., Hyers, T. M., Webster, R. O. (1988) Inhibition of neutrophil functions by platelets and platelet-derived products: description of multiple inhibitory properties. *Journal of leukocyte biology* 44, 93-100.
8. Tsuji, T., Nagata, K., Koike, J., Todoroki, N., Irimura, T. (1994) Induction of superoxide anion production from monocytes and neutrophils by activated platelets through the P-selectin-sialyl Lewis X interaction. *Journal of leukocyte biology* 56, 583-7.
9. Wu, X., Helfrich, M. H., Horton, M. A., Feigen, L. P., Lefkowitz, J. B. (1994) Fibrinogen mediates platelet-polymorphonuclear leukocyte cooperation during immune-complex glomerulonephritis in rats. *The Journal of clinical investigation* 94, 928-36.
10. Bengtsson, T., Zalavary, S., Stendahl, O., Grenegard, M. (1996) Release of oxygen metabolites from chemoattractant-stimulated neutrophils is inhibited by resting platelets: role of extracellular adenosine and actin polymerization. *Blood* 87, 4411-23.
11. Losche, W., Dressel, M., Krause, S., Redlich, H., Spangenberg, P., Heptinstall, S. (1996) Contact-induced modulation of neutrophil elastase secretion and phagocytic activity by platelets. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 7, 210-3.
12. Zalavary, S., Grenegard, M., Stendahl, O., Bengtsson, T. (1996) Platelets enhance Fc(gamma) receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization. *Journal of leukocyte biology* 60, 58-68.
13. Jancinova, V., Drabikova, K., Nosal, R., Danihelova, E. (2000) Platelet-dependent modulation of polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence. *Platelets* 11, 278-85.
14. Herbertsson, H. and Bengtsson, T. (2001) Role of platelets and the arachidonic acid pathway in the regulation of neutrophil oxidase activity. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 61, 641-9.

15. Losche, W., Temmler, U., Redlich, H., Vickers, J., Krause, S., Spangenberg, P. (2001) Inhibition of leukocyte chemiluminescence by platelets: role of platelet-bound fibrinogen. *Platelets* 12, 15-9.
16. Hidalgo, A., Chang, J., Jang, J. E., Peired, A. J., Chiang, E. Y., Frenette, P. S. (2009) Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nature medicine* 15, 384-91.
17. Del Principe, D., Menichelli, A., Di Giulio, S., De Matteis, W., Giordani, M., Pentassuglio, A. M., Finazzi-Agro, A. (1990) Stimulated platelets release factor(s) affecting the in vitro response of human polymorphonuclear cells. *Journal of leukocyte biology* 48, 7-14.
18. Del Maschio, A., Maclouf, J., Corvazier, E., Grange, M. J., Borgeat, P. (1985) Activated platelets stimulate human neutrophils functions. *Nouvelle revue francaise d'hematologie* 27, 275-8.
19. Badrnya, S., Schrottmaier, W. C., Kral, J. B., Yaiw, K. C., Volf, I., Schabbauer, G., Soderberg-Naucler, C., Assinger, A. (2014) Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34, 571-80.
20. Corken, A., Russell, S., Dent, J., Post, S. R., Ware, J. (2014) Platelet glycoprotein Ib-IX as a regulator of systemic inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34, 996-1001.
21. Jandrot-Perrus, M., Lagrue, A. H., Okuma, M., Bon, C. (1997) Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. *The Journal of biological chemistry* 272, 27035-41.
22. Dang, P. M., Dewas, C., Gaudry, M., Fay, M., Pedruzzi, E., Gougerot-Pocidallo, M. A., El Benna, J. (1999) Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *The Journal of biological chemistry* 274, 20704-8.
23. Ollivier, V., Parry, G. C., Cobb, R. R., de Prost, D., Mackman, N. (1996) Elevated cyclic AMP inhibits NF-kappaB-mediated transcription in human monocytic cells and endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 20828-35.
24. Gros, A., Syvannarath, V., Lamrani, L., Ollivier, V., Loyau, S., Goerge, T., Nieswandt, B., Jandrot-Perrus, M., Ho-Tin-Noe, B. (2015) Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood* 126, 1017-26.
25. Monboisse, J. C., Bellon, G., Randoux, A., Dufer, J., Borel, J. P. (1990) Activation of human neutrophils by type I collagen. Requirement of two different sequences. *The Biochemical journal* 270, 459-62.
26. Monboisse, J. C., Garnotel, R., Bellon, G., Borel, J. P. (1991) [Activation of polymorphonuclear neutrophils by contact with collagen I and degradation of collagen]. *C R Seances Soc Biol Fil* 185, 164-70.
27. Garnotel, R., Wegrowski, J., Bellon, G., Monboisse, J. C., Perreau, C., Borel, J. P. (1993) Adhesion and activation of human neutrophils onto collagen chains separated by electrophoresis. *Exp Cell Res* 205, 426-9.

28. Monboisse, J. C., Bellon, G., Dufer, J., Randoux, A., Borel, J. P. (1987) Collagen activates superoxide anion production by human polymorphonuclear neutrophils. *The Biochemical journal* 246, 599-603.
29. Wagner, D. D. and Frenette, P. S. (2008) The vessel wall and its interactions. *Blood* 111, 5271-81.
30. Liles, W. C., Ledbetter, J. A., Waltersdorff, A. W., Klebanoff, S. J. (1995) Cross-linking of CD18 primes human neutrophils for activation of the respiratory burst in response to specific stimuli: implications for adhesion-dependent physiological responses in neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 58, 690-7.
31. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., Minick, C. R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation* 52, 2745-56.
32. Aird, W. C. (2007(a)) Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. I. Structure, Function, and Mechanisms 100, 158-173.
33. Aird, W. C. (2007(b)) Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: II. Representative Vascular Beds. *Circulation research* 100, 174-190.
34. Sporn, L. A., Marder, V. J., Wagner, D. D. (1989) Differing polarity of the constitutive and regulated secretory pathways for von Willebrand factor in endothelial cells. *The Journal of cell biology* 108, 1283-9.
35. Schwiebert, L. M., Rice, W. C., Kudlow, B. A., Taylor, A. L., Schwiebert, E. M. (2002) Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 282, C289-C301.
36. Meen, A. J., Oynebraten, I., Reine, T. M., Duelli, A., Svennevig, K., Pejler, G., Jenssen, T., Kolset, S. O. (2011) Serglycin is a major proteoglycan in polarized human endothelial cells and is implicated in the secretion of the chemokine GROalpha/CXCL1. *The Journal of biological chemistry* 286, 2636-47.

Figure legends

Figure 1 : Resting platelets limit neutrophil degranulation of human washed neutrophils in suspension. Elastase (A) and peroxidase (B) activities as well as ROS production (F) were quantified with fluorescent dyes after the incubation of unstimulated or TNF- α -activated-neutrophils (Pn) with washed platelets (Plt). Elastase (C) and peroxidase (D) activities were quantified after the incubation of supernatants of TNF- α -stimulated neutrophils with increasing concentrations of resting washed platelets. Free active peroxidase content was also quantified in H₂O₂-saturating conditions (E). Immunostainings for neutrophil elastase and myeloperoxidase on platelets collected after the co-incubation with neutrophils were realized (G). Results are presented as mean \pm SEM (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

Figure 2 : Cell-cell contact is required for the reduction of neutrophil cytotoxic activities by platelets. Platelets (Plt) and TNF- α -stimulated neutrophil (Pn) were separated by a 0.4 μ m pore-size transwells during incubation and elastase (A), peroxidase (B) activities and ROS production (C) were quantified. Results are expressed in percentage of inhibition of neutrophil activities. Results are presented as mean \pm SEM (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

Figure 3 : Platelet activation by collagen (10 μ g/mL) or thrombin (5nM) do not modify their inhibitory effect on neutrophil activities. Neutrophil elastase (A) and peroxidase (B) activities and ROS production (C) were measured after co-incubation of collagen-activated or thrombin-activated platelets (Plt) with unstimulated or TNF- α -stimulated neutrophils (Pn). Results are presented as mean \pm SEM (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001) and # indicates a statistically significant difference as compared with neutrophils incubated in reaction buffer from neutrophils incubated with platelet agonist (## p< 0.01; ### p<0.001).

Figure 4 : Endothelial cells cultured on multiwell culture plates do not modify the inhibition of neutrophil activities by platelets. Resting platelets (Plt) were incubated with neutrophils (Pn) in suspension (A, B) or adhered to human coronary artery endothelial cells (HCAECs) cultured on fibronectin-coated multiwell culture plate (C, D). Neutrophil elastase (A, C) and peroxidase (B, D) activities were quantified. Similar results were observed with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Experimental design of each condition is also indicated. Results are presented as mean±SEM (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

Figure 5 : The initial interaction of neutrophil with endothelial cells cultured on cell culture inserts guide the regulation of neutrophil by platelets. Resting platelets (Plt) were incubated with neutrophil (Pn) adhered to endothelial cells (HCAECs) cultured on fibronectin-coated 3-µm-pore size transwells. Neutrophil elastase (A) and peroxidase (B) activities were quantified. Similar results were observed with HUVECs. Experimental design of the experiment is indicated. Results are presented as mean±SEM (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

Figure 1

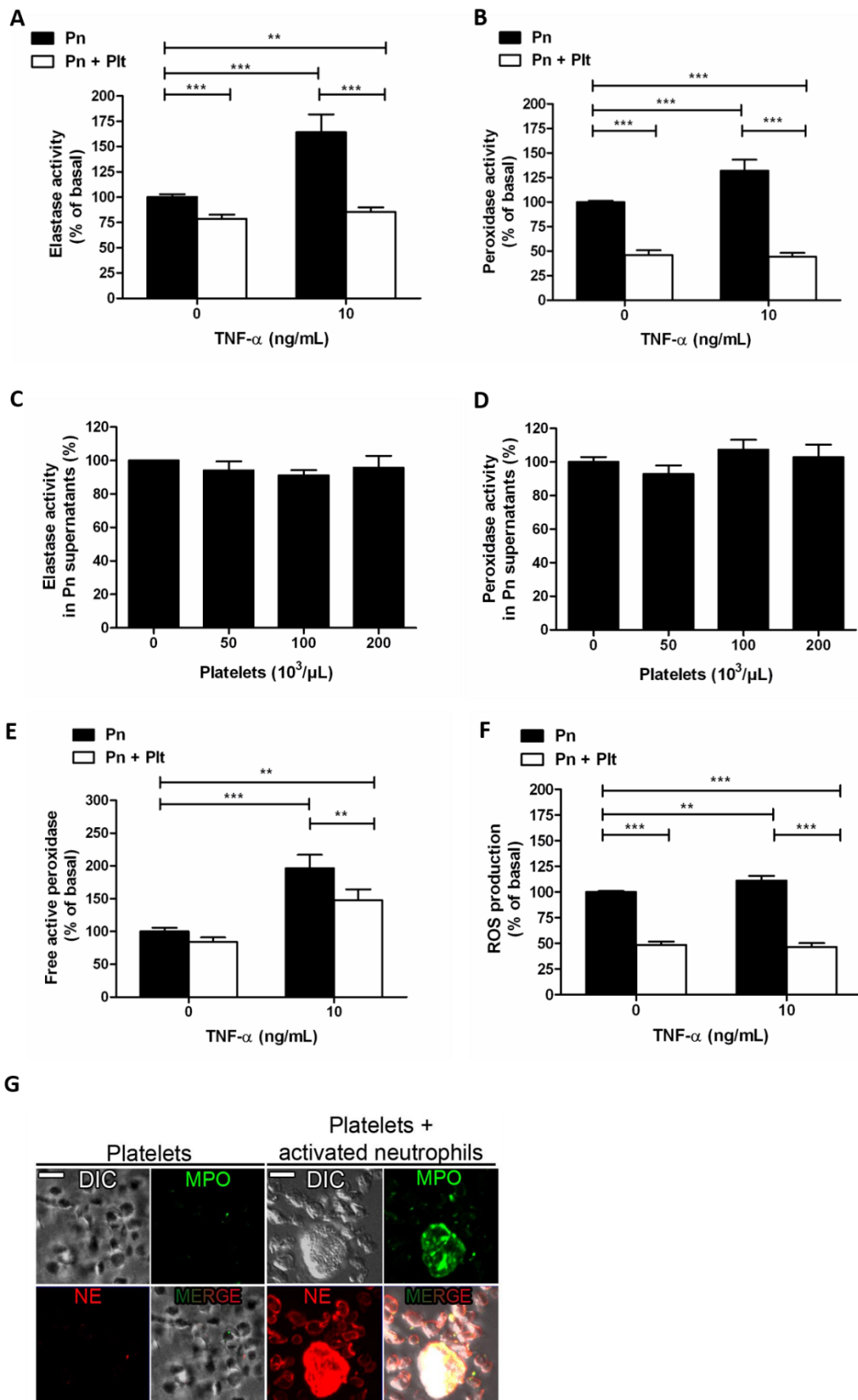


Figure 2

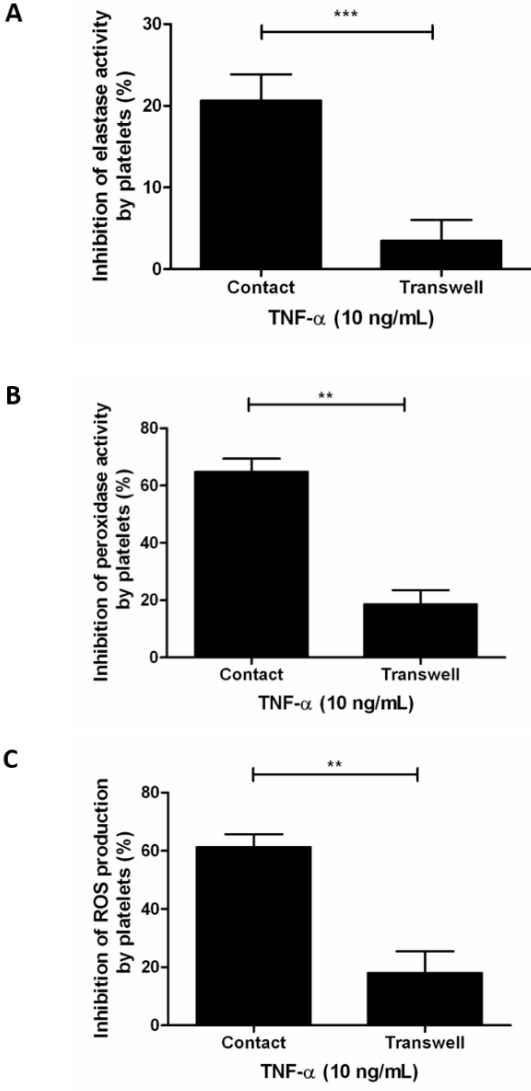


Figure 3

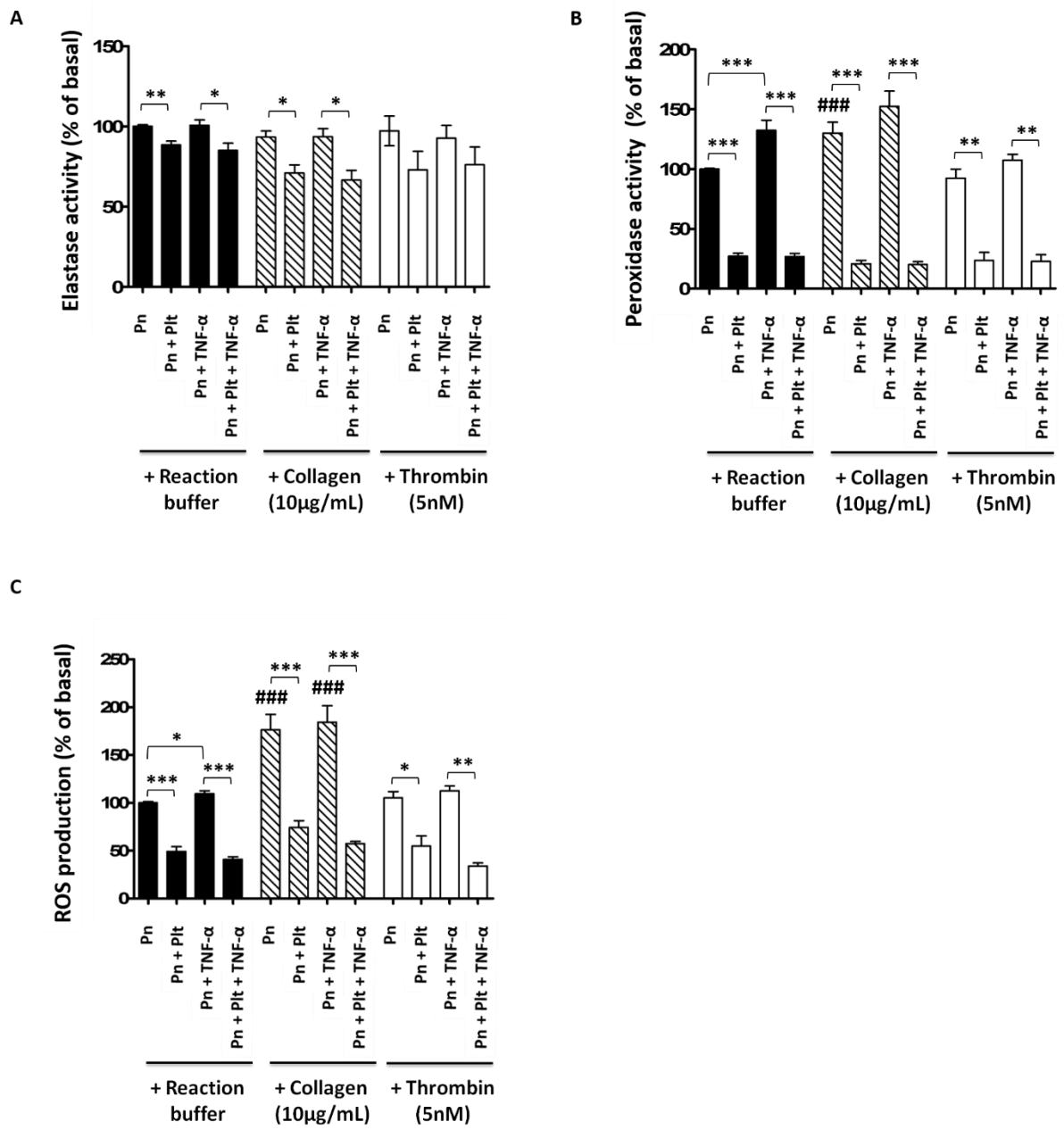
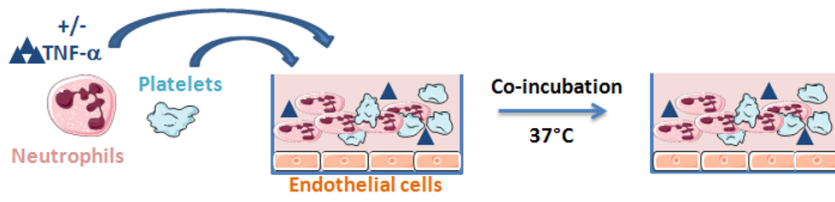
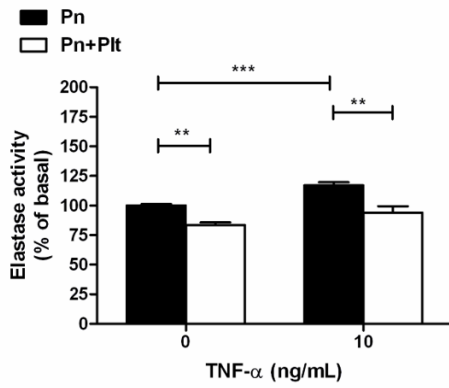


Figure 4

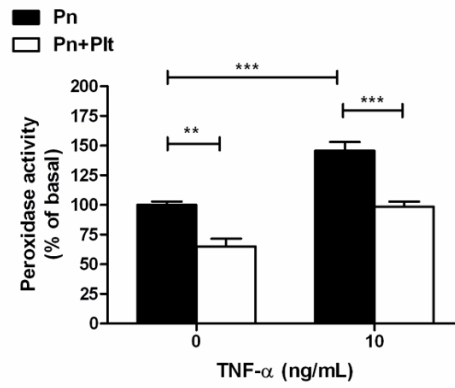
Experimental design (for figures 4A and 4B)



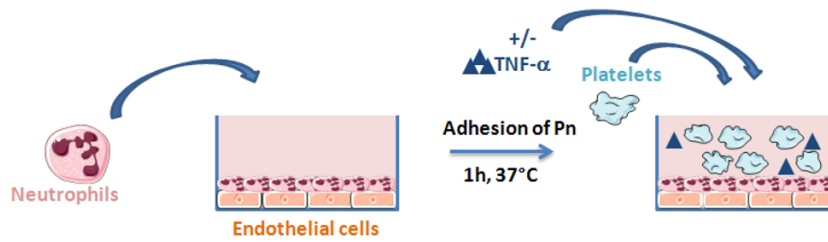
A



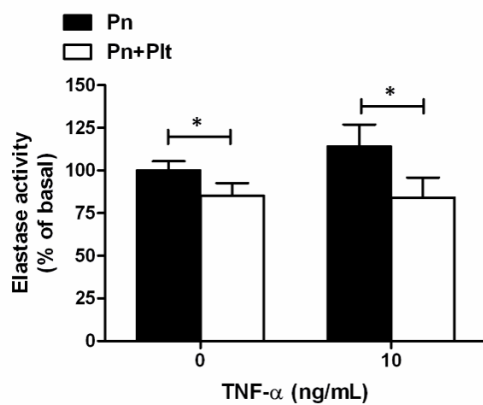
B



Experimental design (for figures 4C and 4D)



C



D

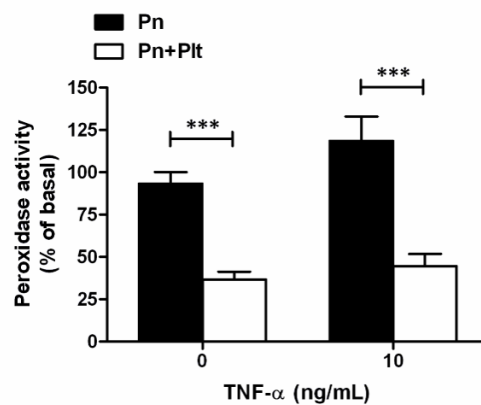
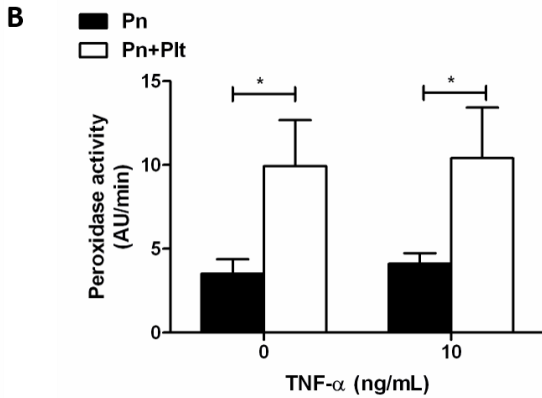
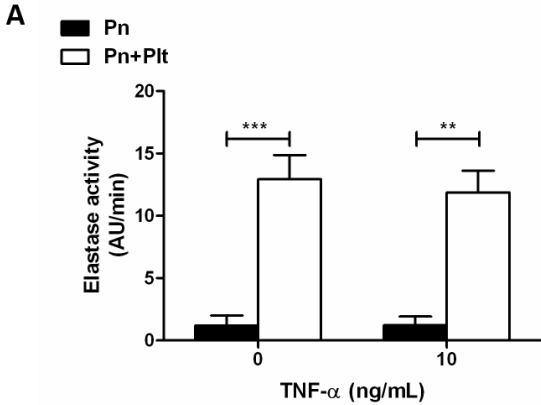
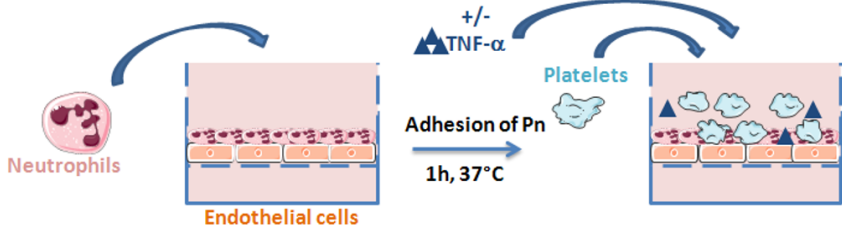


Figure 5

Experimental design



Conclusion

Les plaquettes régulent les différentes fonctions des neutrophiles tout au long des réactions inflammatoires. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la régulation des activités cytotoxiques des neutrophiles par les plaquettes dans un modèle d'étude *in vitro*.

Nous avons montré que lorsque des neutrophiles humains purifiés sont incubés avec des plaquettes humaines au repos les activités élastase et myéloperoxydase (MPO) des neutrophiles activés ou non par le TNF- α sont inhibées. L'absence d'inhibition de l'activité de ces enzymes par les plaquettes et la réduction de la sécrétion de MPO neutrophilaire en présence de plaquettes indiquent que les plaquettes limitent en réalité la dégranulation des neutrophiles. De plus, dans ces mêmes conditions d'incubation, les plaquettes inhibent très fortement la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Concernant la MPO, les plaquettes inhibent son activité en régulant à la fois sa sécrétion et la génération des ROS qui sont essentiels à son activité enzymatique.

Cette inhibition est dépendante d'un contact physique entre les deux types cellulaires comme montré par l'incubation des plaquettes et des neutrophiles séparée par un insert de culture. Les contacts plaquettes-neutrophiles sont donc au centre de cette régulation.

De plus, l'activation des plaquettes par leurs agonistes physiologiques, le collagène de type I et la thrombine, montre que dans ces conditions les plaquettes conservent leur effet inhibiteur. Celui-ci est même potentialisé en présence de collagène. La présence de collagène pourrait ainsi favoriser à la fois la formation d'agrégats neutro-plaquettaires et la sécrétion des facteurs solubles plaquettaires. Les récepteurs et/ou facteurs solubles impliqués dans cette régulation restent à identifier.

La présence de cellules endothéliales cultivées sur des plaques multi-puits classiques ne modifie pas l'effet inhibiteur des plaquettes sur les activités cytotoxiques des neutrophiles. En revanche, les plaquettes ont un effet activateur sur les activités cytotoxiques des neutrophiles pré-adhérent sur des cellules endothéliales cultivées sur des inserts de culture.

Cette interaction initiale du neutrophile avec la cellule endothéliale pourrait changer l'état d'activation du neutrophile, modifiant ensuite ses interactions avec les plaquettes. Les interactions des neutrophiles avec les cellules endothéliales semblent donc déterminer la régulation par les plaquettes des activités cytotoxiques des neutrophiles.

Discussion et Perspectives

En plus de leur rôle hémostatique, les plaquettes participent aux réactions inflammatoires. Dans nos travaux, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux fonctions des plaquettes dans ces réactions inflammatoires.

Ainsi, un des premiers objectifs de ma thèse était de comprendre comment les plaquettes préviennent les saignements inflammatoires. Des données expérimentales obtenues dans des modèles animaux suggéraient que les plaquettes exerceraient leur effet protecteur en contrant les effets délétères des neutrophiles (Hirahashi, Hishikawa et al. 2009, Ho-Tin-Noe, Carbo et al. 2009). Bien que les récepteurs à ITAM aient été identifiés comme jouant un rôle dans ce mécanisme protecteur leur(s) mode(s) d'action restaient à définir (Boulaftali, Hess et al. 2013).

I. Les neutrophiles sont responsables des saignements inflammatoires chez les souris thrombopéniques

Dans notre étude, nous avons montré que les plaquettes préviennent les dommages vasculaires causés par les neutrophiles pendant une réaction inflammatoire. En effet, après induction d'une dermatite immuno-induite en absence de neutrophiles, aucun saignement n'est observé chez les souris GPVI^{-/-} et ceux-ci sont très significativement réduits chez les souris thrombopéniques.

Ces résultats sont en accord avec une étude qui s'est précisément intéressée aux mécanismes provoquant ces saignements chez les souris thrombopéniques (Hillgruber, Pöppelmann et al. 2015). A partir d'un modèle de dermatite immuno-induite et d'inflammation pulmonaire aigue induite par inhalation de LPS, les auteurs ont identifié les neutrophiles comme étant les cellules responsables des dommages vasculaires. Des stratégies d'immuno-déplétion de certaines chimiokines et intégrines des neutrophiles ainsi que l'utilisation de souris avec un déficit en P-sélectine ou en intégrine $\beta 2$ mettent en évidence que l'étape de transmigration des neutrophiles est nécessaire à la survenue des saignements inflammatoires chez les souris thrombopéniques. Le *rolling*, l'adhésion des neutrophiles ou la présence de neutrophiles activés dans les tissus ne sont pas suffisants pour provoquer ces saignements. Comme signalé dans l'introduction, perméabilité vasculaire et saignements inflammatoires sont une fois de plus deux mécanismes bien distincts car l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par l'injection intradermique d'histamine ne provoque aucun saignement chez les souris thrombopéniques. De même l'induction de la réaction inflammatoire chez des souris thrombopéniques avec une mutation Y731F sur la VE-cadhérine conduit bien à la formation d'un œdème mais à une diminution des saignements inflammatoires en raison de l'effet inhibiteur de cette mutation sur la transmigration des neutrophiles (Wessel, Winderlich et al. 2014).

La responsabilité des neutrophiles dans la survenue des saignements inflammatoires que Wessel *et al.* et nous même décrivons chez des souris thrombopéniques ou GPVI^{-/-} (Bender, May et al. 2013) avait précédemment été mise en évidence de manière indirecte chez les souris Fc γ ^{-/-}. En effet, la

chaîne FcR γ est nécessaire à l'expression de GPVI chez la souris (Nieswandt, Bergmeier et al. 2000). Les souris FcR γ ^{-/-} présentent également un défaut d'infiltration des neutrophiles dans la dermatite immuno-induite (Takai, Li et al. 1994, Shashidharamurthy, Hennigar et al. 2008) et sont donc protégées des dommages que l'infiltration des neutrophiles cause chez les souris contrôles. Cette infiltration réduite chez ces souris est probablement ce qui a conduit à la conclusion erronée d'une absence de rôle de GPVI dans la prévention des saignements inflammatoires (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008). Ce résultat est important car il souligne la nécessité de contrôler l'infiltration leucocytaire. Alors qu'il s'agit d'un paramètre décisif pour l'interprétation des données, dans la plupart des études sur la prévention des saignements inflammatoires, cette infiltration leucocytaire est encore peu quantifiée. Pour pouvoir évaluer correctement l'implication d'un récepteur ou d'une voie de signalisation plaquettaire dans la prévention des saignements inflammatoires, le recrutement et l'infiltration des neutrophiles ne doivent donc pas être compromis.

II. Plaquettes et prévention des saignements inflammatoires

Diversité des mécanismes protecteurs des plaquettes

L'étude de Hillgruber *et al.* (Hillgruber, Pöppelmann et al. 2015) met en évidence des similitudes dans les mécanismes impliquant les neutrophiles dans la survenue des saignements inflammatoires chez les souris thrombopéniques dans deux organes différents : la peau et les poumons. Cependant, les récepteurs et voies de signalisation plaquettaires prévenant les saignements inflammatoires semblent spécifiques d'un organe à un autre comme le montrent nos résultats (Gros, Syvannarath et al. 2015, Rayes, Lax et al. 2017, en révision) et ceux d'une étude récente du groupe de Nieswandt (Deppermann, Kraft et al. 2017). En effet, alors que GPVI est cruciale pour la prévention des saignements d'origine inflammatoire dans la peau, nos travaux montrent qu'elle n'est pas requise dans les poumons. Dans cet organe, l'absence de GPIb conduit à des saignements, alors qu'après induction d'une dermatite immuno-induite elle est sans conséquence (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008, Rayes, Lax et al. 2017, en révision).

De plus, il a précédemment été montré dans un modèle d'ischémie/reperfusion cérébrale que les plaquettes sont nécessaires à la prévention des saignements inflammatoires (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008) mais que ni GPVI (Kleinschnitz, Pozgajova et al. 2007, Goebel, Li et al. 2013, Kraft, Schuhmann et al. 2015) ni GPIb (Kleinschnitz, Pozgajova et al. 2007, Schuhmann, Guthmann et al. 2017) ne sont requises pour prévenir les saignements dans cette situation physiopathologique. En revanche, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ semble nécessaire à la prévention des saignements dans ce modèle (Kleinschnitz, Pozgajova et al. 2007).

Dans notre étude, nous avons confirmé que la glycoprotéine VI est indispensable à la prévention des saignements cutanés d'origine inflammatoire. Nous avons observé que dans cette situation, GPVI permet le recrutement des plaquettes aux sites d'infiltration des neutrophiles et leur adhésion au niveau de la paroi vasculaire lésée. En plus de cette action mécanique, nous avons observé que la signalisation ITAM serait également importante pour cet effet protecteur. Nos résultats montrent effectivement que la dermatite immuno-induite est associée à une augmentation de la sérotonine plasmatique chez les souris contrôles. Cette augmentation est significativement réduite chez les souris GPVI^{-/-}. Cette baisse de la sécrétion plaquettaire associée à une diminution de l'effet protecteur des plaquettes dont la voie de signalisation ITAM est inhibée indique qu'une activation dépendante de GPVI contribuerait à l'effet protecteur des plaquettes dans ce type de réaction inflammatoire.

Tout en comblant mécaniquement les brèches vasculaires, l'engagement de GPVI et de sa voie de signalisation ITAM pourraient ainsi prévenir les saignements inflammatoires en induisant la sécrétion de facteurs solubles et/ou un changement de forme des plaquettes indépendamment de la formation d'un thrombus.

Dans leur étude Deppermann *et al.* proposent cependant que ces facteurs solubles ne seraient pas nécessaires à la prévention des saignements dans une réaction inflammatoire cutanée (Deppermann, Kraft et al. 2017). L'importance des facteurs solubles dans la prévention des saignements inflammatoires est discutée selon le type de réaction inflammatoire et les organes sièges de cette réaction. Ainsi, les souris Unc13d^{-/-} ne présentent aucun saignement inflammatoire dans le modèle d'inflammation cutanée ou d'ischémie-reperfusion cérébrale (Stegner, Deppermann et al. 2013). Lorsque des souris Unc13d^{-/-}/Nbeal2^{-/-} (souris dont les plaquettes sont dépourvues de granules et donc ne sécrètent pas de facteurs solubles) sont soumises à une dermatite immuno-induite ou à une inflammation pulmonaire induite par le LPS aucun saignement inflammatoire n'est détecté. En revanche, chez ces mêmes souris des pétéchies sont observés après une ischémie-reperfusion cérébrale (Deppermann, Kraft et al. 2017). Les facteurs plaquettaires ne sont donc pas systématiquement requis dans la prévention des saignements inflammatoires.

Comme nous l'avons discuté ci-dessus, plusieurs éléments restent néanmoins à éclaircir comme l'intensité de la réaction inflammatoire chez les souris Unc13d^{-/-}/Nbeal2^{-/-}. Effectivement, Munc13-4, codé par le gène *Unc13d*, est exprimé dans de nombreuses cellules de la lignée hématopoïétique et est particulièrement impliqué dans la sécrétion des leucocytes (Crozat, Hoebe et al. 2007, Savage, Williams et al. 2013). Bien que les expériences de transfusion de plaquettes Unc13d^{-/-}/Nbeal2^{-/-} à des souris hIL4R α /GPIb α (Deppermann, Kraft et al. 2017) répondent partiellement à ces questions en éliminant un défaut de sécrétion des neutrophiles, elles ne permettent pas d'exclure une réduction de l'infiltration des neutrophiles étant donné que les plaquettes favorisent cette étape.

Le rôle des facteurs solubles plaquettaires a précédemment été montré dans la stabilisation des vaisseaux tumoraux. Dans les modèles de tumeurs solides, l'absence de plaquettes mène à des

saignements intra-tumoraux. L'intégrité des vaisseaux tumoraux peut être restaurée par la transfusion de plaquettes au repos ce que ne fait pas la transfusion de plaquettes activées (dégranulées) soulignant le rôle des facteurs solubles. La pré-activation des plaquettes pourrait également conduire au clivage (*shedding*) de certains récepteurs plaquettaires impliqués dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux tumoraux. L'origine de la sérotonine et de l'angiopoïétine-1 plasmatique est très majoritairement plaquettaire. La thrombopénie provoque une quasi-disparition dans le sérum de ces deux facteurs. Néanmoins, l'injection de surnageant de plaquettes activées ne permet pas non plus de prévenir les hémorragies intra-tumorales. Cette dernière observation suggère que ces facteurs doivent être libérés localement au niveau de la tumeur pour être efficace, ou bien que les plaquettes mettent en œuvre différents mécanismes complémentaires pour maintenir l'intégrité des vaisseaux tumoraux (Ho-Tin-Noe, Goerge et al. 2008).

Le rôle de CLEC-2 dans la prévention des saignements inflammatoires par les plaquettes

Dans nos études, nous avons montré que l'expression de CLEC-2 par les plaquettes n'est pas indispensable au maintien de l'intégrité vasculaire dans la dermatite immuno-induite ou l'inflammation pulmonaire induite par le LPS. Les saignements observés chez les souris double-KO plaquettaire GPVI^{-/-}/Clec2^{fl/fl}PF4Cre semblent néanmoins suggérer que ce récepteur pourrait secondairement participer à cet effet protecteur (Rayes, Lax et al. 2017, en révision) et expliquer pourquoi des saignements inflammatoires moins importants sont observés chez les souris GPVI^{-/-} comparées aux souris thrombopéniques. En absence de GPVI, CLEC-2 n'est néanmoins pas suffisant pour prévenir les saignements inflammatoires. A l'inverse, GPVI est suffisant pour prévenir les dommages vasculaires en absence de CLEC-2. Dans la peau, nous avons montré que GPVI est nécessaire au recrutement des plaquettes au niveau de la lésion inflammatoire. Le faible recrutement des plaquettes GPVI^{-/-} au site inflammatoire ne permettrait pas à CLEC-2 d'être efficace. De plus, même si CLEC-2 est engagé dans ces conditions, étant un récepteur hemi-ITAM, l'efficacité de la signalisation pourrait ainsi être insuffisante pour aboutir à un effet protecteur. Un troisième récepteur, FcγRIIA, portant un motif ITAM est exprimé à la surface des plaquettes humaines. L'activation de ce récepteur mène à une signalisation similaire à celle déclenchée par la stimulation de GPVI et/ou de CLEC-2. Le rôle de FcγRIIA dans le maintien de l'intégrité vasculaire en condition inflammatoire mériterait d'être évalué en utilisant des souris transgéniques exprimant ce récepteur sur leurs plaquettes (McKenzie, Taylor et al. 1999).

Un effet protecteur de GPVI et de CLEC-2 a été montré dans un autre modèle expérimental. En effet, chez des souris hIL4Rα/GPIbα rendues thrombopéniques puis transfusées avec des plaquettes présentant un déficit en GPVI ou en CLEC-2, des saignements inflammatoires en réponse à une dermatite immuno-induite ou à une inflammation pulmonaire au LPS ont été observés (Boulaftali, Hess et al. 2013). Dans cette situation expérimentale, le nombre de plaquettes circulant chez les souris

soumises aux différentes réactions inflammatoires est diminué par rapport aux modèles utilisés dans nos études car les souris ne sont que partiellement reconstituées en plaquettes avec la transfusion. Un faible compte plaquettaire associé à une absence de récepteur GPVI ou CLEC-2 pourrait expliquer les différences observées entre l'étude de Boulaftali *et al.* et la nôtre. De plus, la mobilisation et le recrutement des leucocytes après l'induction de chaque réaction inflammatoire ne sont pas rapportés dans cette étude et ces éléments pourraient aussi apporter des éclaircissements.

Identification des ligands mis en jeu dans cet effet protecteur

Les ligands mis en jeu dans l'effet vasculoprotecteur des plaquettes dans les différentes situations inflammatoires selon les organes sont encore à identifier. L'identification de ces ligands pourrait être réalisée en utilisant une stratégie similaire à celle ayant permis d'identifier l'exposition de zones de liaison à la glycoprotéine VI dans la dermatite immuno-induite : des billes fluorescentes coâtées avec des anticorps ciblant un ligand candidat pourraient être injectées dans la circulation par voie intraveineuse, leur liaison analysée par microscopie intravivante et leur recrutement au site inflammatoire serait quantifié par mesure de fluorescence après leur extraction des tissus. Nos observations de la paroi vasculaire des microvaisseaux cutanés au cours d'une dermatite immuno-induite réalisées par microscopie intravivante grâce au marquage des cellules endothéliales avec un anticorps dirigé contre CD31 (ou PECAM-1) révèlent des altérations superficielles de la couche de cellules endothéliales. Le collagène de type IV et la laminine, étant des protéines matricielles de la membrane basale des vaisseaux et donc exposés même en cas de lésion superficielle, pourraient interagir avec les récepteurs plaquettaires. L'intégrine $\alpha_6\beta_1$, récepteur de la laminine sur les plaquettes, pourrait participer à l'activation de la glycoprotéine VI. Son implication pourrait être évaluée en soumettant des souris $\alpha_6\beta_1^{-/-}$ à une dermatite immuno-induite (Schaff, Tang et al. 2013).

Concernant CLEC-2, son seul ligand identifié est la podoplanine. Or celle-ci est décrite comme n'étant exprimée qu'au niveau des vaisseaux lymphatiques, des macrophages ou de certaines cellules cancéreuses. Comme un autre groupe (Payne, Ponomaryov et al. 2017), nous avons montré que la podoplanine est aussi exprimée à proximité des vaisseaux sanguins dans la peau et que son expression est augmentée pendant une réaction immuno-induite chez des souris contrôles, GPVI^{-/-} ou CLEC-2^{-/-} plaquettaire. Cette augmentation de l'expression de la podoplanine pourrait expliquer l'engagement secondaire de CLEC-2 dans la prévention des saignements inflammatoires dans la peau. Par exemple, un immuno-marquage réalisé sur une biopsie cutanée de souris avec des anticorps dirigés contre CD31 et la podoplanine montre que la podoplanine est exprimée près des micro-vaisseaux cutanés CD31⁺ (**Figure 46**). Nos résultats encore préliminaires indiquent que les cellules exprimant la podoplanine pourraient être des fibroblastes et/ou des macrophages. Ces observations concordent avec une étude dans laquelle les auteurs ont observé une augmentation de l'expression de la podoplanine sur les

macrophages et au niveau du sous-endothélium dans un modèle d'infection à *Salmonella*. Les auteurs de cette étude avaient proposé que les cellules du sous-endothélium sur-exprimant la podoplanine soient des fibroblastes ou des péricytes (Hitchcock, Cook et al. 2015). Chez l'Homme, des analyses histologiques réalisées sur des fibroblastes synoviaux de patients atteints d'arthrite rhumatoïde ont montré une expression augmentée de la podoplanine comparée aux fibroblastes de sujets sains. De plus, après traitement des patients avec un anti-TNF- α cette expression est réduite (Del Rey, Fare et al. 2014).

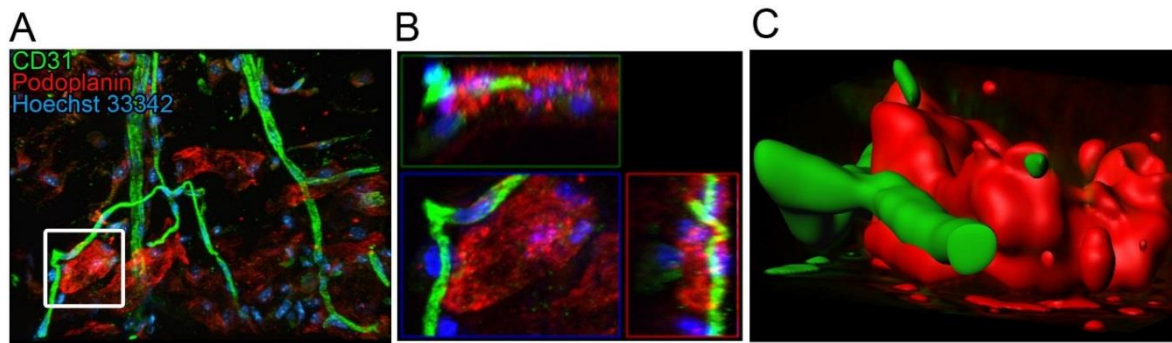


Figure 46 : La podoplanine est exprimée à proximité des micro-vaisseaux cutanés CD31+ de souris. Co-marquage CD31 (en vert), podoplanine (en rouge) et Hoechst 33342 (noyaux) en A. La zone repérée par un carré blanc est agrandie en B et observée selon différents plans (xy, xz et yz) puis modélisée par une reconstruction en trois dimensions en C (Résultat du laboratoire non publié).

Contrairement au collagène, qui est une protéine matricielle de la membrane basale directement exposée en cas de lésion, la podoplanine est exprimée de manière moins superficielle dans la peau. L'interaction de CLEC-2 avec la podoplanine pourrait n'être possible qu'en cas de dommages vasculaires sévères menant à l'exposition de la podoplanine ou bien dans des organes spécifiques dans lesquels la podoplanine est constitutivement plus exprimée. C'est ainsi que CLEC-2 serait impliqué dans la prévention des saignements inflammatoires provoqués par le *trafficking* des lymphocytes au niveau des organes lymphoïdes secondaires à la suite d'une réaction d'immunisation (Herzog, Fu et al. 2013). Cependant ces résultats nécessitent d'être reproduits dans d'autres modèles afin de confirmer que les saignements observés ne sont pas la conséquence de la mauvaise séparation des vaisseaux sanguins et lymphatiques observée chez les souris *Clec2^{fl/fl}PF4Cre+*. Ce modèle d'immunisation pourrait être réalisé sur des souris dont l'expression de CLEC-2 serait sous le contrôle du promoteur *ROSA26^{+ERT2cre}* qui permet une délétion inducible de CLEC-2. En effet, dans cette condition aucun défaut de développement des vaisseaux lymphatiques n'a été observé (Payne, Ponomaryov et al. 2017).

GPIb et ses ligands dans la prévention des saignements inflammatoires

Dans les poumons, nos résultats montrent que GPIb est nécessaire à la prévention des saignements à la suite d'une inflammation induite par le LPS. GPIb pourrait se lier au facteur von Willebrand. L'hypothèse d'un autre ligand a cependant été soulevée par plusieurs autres groupes dans différents modèles expérimentaux.

Dans un modèle de sepsis polymicrobien par ligature et ponction caecale (CLP) chez des souris hIL4R α /GPIb α , le groupe de Ware (Corken, Russell et al. 2014) a montré que l'absence du facteur von Willebrand est protectrice alors que la délétion de GPIb est délétère et augmente la mortalité des souris. Dans cette étude, l'absence de GPIb α entraîne une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes et une augmentation de l'expression de l'intégrine Mac-1 par les neutrophiles.

De plus, le groupe de Wagner a rapporté dans un modèle de lésion des artérioles au chlorure de fer (FeCl₃) que l'adhésion des plaquettes chez des souris vWF $^{-/-}$ était réduite de 80% et, de 98% chez des souris hIL4R α /GPIb α par rapport aux plaquettes contrôles (Ni, Denis et al. 2000, Bergmeier, Piffath et al. 2006). Les auteurs ont donc proposé que le complexe GPIb-V-IX permettrait l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium via son interaction avec un autre ligand que le vWf comme la thrombospondine (TSP), la P-sélectine (Romo, Dong et al. 1999) ou Mac-1 (Simon, Chen et al. 2000, Wang, Sakuma et al. 2005, Bergmeier, Piffath et al. 2006).

Ces autres ligands pourraient ainsi être engagés dans une interaction avec GPIb dans notre modèle d'inflammation pulmonaire au LPS. La réalisation de ce modèle sur des souris vWF $^{-/-}$ est actuellement en cours (en collaboration avec le Dr Cécile Denis de l'Inserm 1176) et apportera des réponses sur le rôle du facteur von Willebrand dans cet effet protecteur des plaquettes dépendant de GPIb.

Vers une protection mécanique des saignements inflammatoires par les plaquettes ?

Les interactions établies entre les récepteurs plaquettaires et leurs ligands présents dans la paroi vasculaire peuvent contribuer à la prévention des saignements inflammatoires. En effet, nous avons montré que dans la dermatite immuno-induite le recrutement des plaquettes et leur adhésion à la paroi vasculaire dépendent de la glycoprotéine VI sans que son activation ne soit requise. De plus, nous avons montré que la transfusion de plaquettes dont la voie de signalisation ITAM a été pharmacologiquement inhibée dans des souris GPVI $^{-/-}$ soumises à une dermatite immuno-induite confère un léger effet protecteur à ces souris par rapport aux GPVI $^{-/-}$ non transfusées. Ces éléments suggèrent que la prévention des saignements inflammatoires par les plaquettes pourrait, en partie, reposer sur un effet mécanique. Les plaquettes pourraient combler les brèches vasculaires et/ou permettre le rapprochement des cellules endothéliales.

Ce type de réparation vasculaire reposant principalement sur une interaction physique a été décrit au niveau cérébral dans un modèle de rupture vasculaire par laser chez le poisson zèbre et met en jeu les macrophages et les cellules endothéliales (Liu, Wu et al. 2016). Cette réparation repose sur l'adhésion du macrophage au niveau des cellules endothéliales lésées puis sur la génération d'une force de traction par le macrophage pour rapprocher les deux extrémités des cellules endothéliales et combler la brèche vasculaire (**Figure 47**). La sécrétion de facteurs solubles n'est pas déterminante dans ce mécanisme de réparation qui repose sur les forces mécaniques déployées par le macrophage, ses filopodes et lamellipodes. Ce mécanisme de réparation vasculaire pourrait être transposé aux plaquettes dans la prévention des saignements inflammatoires. Cette hypothèse est supportée par le fait que certains récepteurs et voies de signalisation mis en jeu par les macrophages dans ce processus de réparation sont aussi présents dans les plaquettes comme le récepteur d'activation P2Y12, le récepteur d'adhésion CD31 ou la voie dépendante de la PI3K ou de la GTPase Rac-1. La contraction des microfilaments (actine et myosine II) est aussi indispensable dans ce mécanisme de réparation innovant tant au niveau du macrophage que des cellules endothéliales.

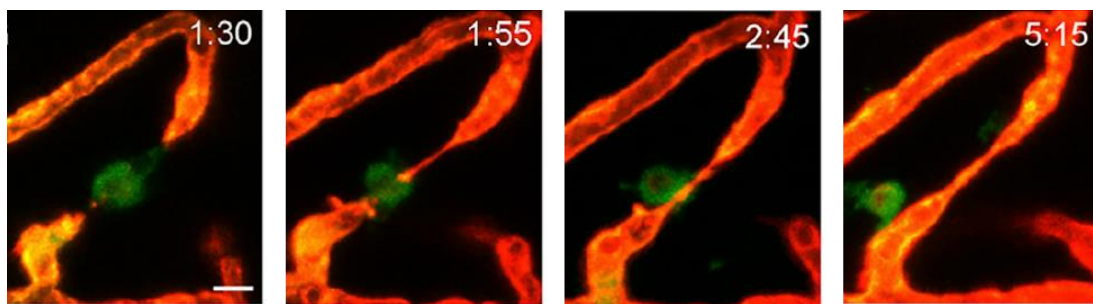


Figure 47 : Cinétique de réparation d'une lésion cérébrovasculaire par un macrophage chez le poisson zèbre. Après une lésion induite par laser, le macrophage (en vert) adhère aux deux cellules endothéliales (en rouge) de part et d'autre de la lésion. Par une force mécanique, le macrophage rapproche les extrémités de ces deux cellules endothéliales pour combler la brèche vasculaire. Une fois la lésion réparée, le macrophage se détache des cellules endothéliales. Le temps est indiqué en heures:minutes. La barre représente 10µm (adapté de (Liu, Wu et al. 2016)).

Prévention des saignements inflammatoires et sécrétion plaquettaire graduée

La prévention des saignements inflammatoires repose sur le recrutement et l'adhésion de plaquettes individualisées, sans formation de thrombus dans la peau, les poumons, le rein et les tumeurs solides comme observé par microscopie intravitale ou immuno-marquage (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008, Hirahashi, Hishikawa et al. 2009, Ho-Tin-Noe, Carbo et al. 2009). De plus, l'absence de rôle de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Goerge, Ho-Tin-Noe et al. 2008) ou des RCPGs (Boulaftali, Hess et al. 2013) appuie l'absence d'une agrégation plaquettaire dans cet effet protecteur des plaquettes dans ces organes.

Ces observations peuvent paraître contradictoires avec une réparation liée à la sécrétion de facteurs solubles. La mise en place d'un protocole simple a permis de montrer qu'à faible dose de collagène les plaquettes sécrètent les facteurs solubles contenus dans leurs granules alpha et denses sans agréger ni devenir pro-coagulantes (Ollivier, Syvannarath et al. 2014). Cette activation graduelle est dépendante de la nature et de la concentration de l'agoniste. En effet, la stimulation des plaquettes conduit à une réponse spécifique selon l'intensité de la stimulation lorsque l'agoniste est le collagène mais pas avec la thrombine.

L'étude sur l'activation graduelle des plaquettes a aussi mis en évidence que l'engagement de la glycoprotéine VI ne conduit pas nécessairement à leur agrégation tout en déclenchant d'autres réponses comme la sécrétion de facteurs solubles. L'hypothèse de la sécrétion de facteurs solubles (angiopoïétine1, facteurs de croissance, ...) par les plaquettes participant à la prévention des saignements inflammatoires dans la peau en plus de leur action physique de patch réparateur est donc d'autant plus crédible.

Les mécanismes de sécrétion des granules des plaquettes pouvant expliquer cette réponse sécrétoire spécifique sont encore peu connus. Cependant, une étude récente couplant l'utilisation d'une technique innovante de microscopie électronique nommée FIB (*Focused ion beam*)-SEM (*Scanning electron microscope*) à la coloration des échantillons avec l'acide tannique apporte de nouveaux éléments. Cette technique permet d'analyser les événements à l'échelle d'une cellule entière. La sécrétion des granules en réponse à l'activation par différents agonistes et concentrations a ainsi été analysée. L'utilisation de l'acide tannique, dense aux électrons, a permis de visualiser toutes les membranes en contact avec le milieu extérieur (Eckly, Rinckel et al. 2016).

Cette étude met en avant deux modes d'exocytose des granules alpha en fonction de l'intensité de la stimulation. Avec de faible concentration de thrombine, l'exocytose des granules est qualifiée de « simple ». Le granule fusionne avec la membrane. Les pores de fusion à la membrane sont alors de petite taille, pouvant expliquer le passage rapide des facteurs de bas poids moléculaire alors que les protéines de haut poids moléculaire comme la fibronectine ou le facteur von Willebrand sont sécrétées dans le milieu extérieur plus tardivement.

Lorsque les plaquettes sont fortement stimulées par la thrombine, l'exocytose se fait d'emblée par des pores de grande taille expliquant une sécrétion rapide et massive de tous les facteurs plaquettaires. L'exocytose « simple » est alors combinée à une fusion des granules alpha au sein des plaquettes avant l'exocytose. Cette fusion n'est observée qu'entre granules alpha par des interactions homotypiques de VAMP-8 entre les granules. La totalité des granules est alors sécrétée. Dans cette étude, aucune fusion des granules denses n'a été observée. Les facteurs contenus dans les granules denses sont donc sécrétés par exocytose « simple », pouvant expliquer pourquoi nous n'avons observé qu'une faible sécrétion de sérotonine après stimulation des plaquettes par une faible dose de thrombine.

Les auteurs montrent aussi que si VAMP-8 est nécessaire pour la fusion des granules alpha entre eux, son absence n'inhibe pas la sécrétion des facteurs solubles par exocytose « simple » ou quand les plaquettes sont fortement activées. VAMP-8 est une vSNARE présente en grande quantité dans les plaquettes mais son activité ne serait pas essentielle suggérant que d'autres isoformes ou d'autres familles de protéines auraient des fonctions redondantes dans l'exocytose des granules.

Ces observations *in vitro* sont confirmées *in vivo* dans un modèle de lésion au laser. Lorsque la lésion est superficielle, seule une exocytose « simple » des granules est observée. Au contraire, une lésion profonde entraîne une forte activation des plaquettes et une fusion des granules alpha entre eux avant leur sécrétion dans le milieu extérieur.

Cette nouvelle étude montre ainsi que les modes d'exocytose varient selon l'intensité de la stimulation des plaquettes. Cet argument est en faveur d'une réponse graduée et contrôlée des plaquettes. De plus, elle montre que la sécrétion des granules alpha et denses sont différemment contrôlées.

L'analyse des flux calciques intra-plaquettaires lors la stimulation par une faible ou forte concentration de thrombine est également informative. En effet, à faible concentration, une légère augmentation est observée et celle-ci est instable dans le temps. Au contraire, la stimulation des plaquettes par une forte concentration de thrombine induit une augmentation conséquente du calcium intra-cellulaire. L'augmentation de la concentration intra-plaquettaire de calcium serait donc indispensable pour la fusion des granules alpha entre eux et la réponse à une forte activation. Ces données sont en accord avec nos résultats obtenus lorsque les plaquettes sont faiblement stimulées par le collagène. Elles sont également compatibles avec une sécrétion des facteurs plaquettaires selon un mode de « *kiss and run* ». CALDAG-GEF1 ne serait donc pas indispensable à cette réponse liminaire lors d'une activation modérée des plaquettes. Ceci expliquerait pourquoi cette protéine n'est pas indispensable à la prévention des saignements inflammatoires par les plaquettes.

Cette méthode d'imagerie FIB-SEM pourrait permettre d'approfondir notre étude sur la sécrétion graduelle des plaquettes. Il serait informatif d'observer la distribution spatiale des granules dans les plaquettes et leur sécrétion suite à une stimulation avec des concentrations croissantes de collagène. Ces observations pourraient également se faire à différents temps après l'activation des plaquettes. Différents types de collagène ainsi que la laminine ou la podoplanine pourraient également être utilisés pour stimuler les plaquettes.

III. Plaquettes et régulation des activités des neutrophiles

Un autre objectif de cette thèse était de comprendre comment les plaquettes régulent les activités cytotoxiques des neutrophiles.

Les plaquettes préviennent la survenue des saignements et de manière assez paradoxale, elles favorisent la dégranulation et la production de stress oxydant des neutrophiles dans le modèle de réaction immuno-induite. Effectivement, les plaquettes favorisent l'infiltration des neutrophiles dans les tissus comme nous l'avons observé dans le modèle de dermatite et de péritonite immuno-induite. La quantification de la MMP9 et de la MPO par ELISA ainsi que du stress oxydant avec une sonde fluorescente dans les lavages péritonéaux après induction d'une péritonite chez des souris contrôles, GPVI-/- et thrombopéniques montre que les plaquettes favorisent l'exocytose des granules gélatinases et la production de stress oxydant de manière dépendante de la glycoprotéine VI.

Pour aller plus loin dans la compréhension des déterminants de la régulation des activités cytotoxiques des neutrophiles par les plaquettes, nous avons mis au point un modèle *in vitro* d'incubation de plaquettes lavées humaines avec des neutrophiles purifiés (Gros, Ollivier et al, en préparation).

Nous avons montré que les plaquettes limitent les activités élastase, myéloperoxydase et la génération des espèces réactives de l'oxygène des neutrophiles en suspension. Des résultats préliminaires montrent que cette inhibition est aussi observée sur l'activité de la MMP9.

Nos résultats indiquent que les plaquettes inhibent la dégranulation des neutrophiles par un mécanisme dépendant d'un contact physique entre les deux types cellulaires. De plus l'activation des plaquettes par le collagène de type I ou la thrombine ne lève pas l'effet inhibiteur des plaquettes sur la dégranulation des neutrophiles ou la génération des ROS. En présence de collagène I, cet effet inhibiteur est même potentialisé. Le collagène I, activant à la fois les plaquettes et les neutrophiles via leur intégrine LFA-1 (Monboisse, Bellon et al. 1987), on peut supposer une augmentation de la formation d'agrégats neutro-plaquettaires qui favoriserait les contacts entre les deux types cellulaires et l'effet inhibiteur des plaquettes.

La nécessité d'un contact entre les deux types cellulaires n'exclut pas un rôle des facteurs solubles dans ce processus régulateur. L'activation des plaquettes par les agonistes ou par les neutrophiles favoriserait cette sécrétion. L'importance des facteurs solubles sera déterminée au laboratoire. Tout d'abord des plaquettes pré-activées par le collagène de type I ou par la thrombine seront incubées avec des neutrophiles. Dans un deuxième temps, la réponse des neutrophiles incubés avec le surnageant de ces plaquettes activées sera analysée. L'incubation des neutrophiles avec des plaquettes au repos fixées permettra aussi de déterminer si seul le contact cellulaire est indispensable.

Régulation réciproque des plaquettes et des neutrophiles

Nos études se focalisent sur la régulation des activités des neutrophiles par les plaquettes mais les neutrophiles exercent eux-aussi un contrôle sur les plaquettes. Nous l'avons observé sur le recrutement des plaquettes (Gros, Syvannarath et al. 2015). En effet dans la dermatite immuno-induite, en absence de neutrophiles le recrutement des plaquettes au niveau du site inflammatoire est presque aboli. Ce recrutement des plaquettes dépendant des leucocytes a également été observé dans d'autres modèles inflammatoires comme dans des modèles de glomérulonéphrite (Devi, Kuligowski et al. 2010), d'endotoxémie (Clark, Ma et al. 2007), d'ischémie reperfusion-intestinale (Cooper, Chitman et al. 2003) ou cérébrale (Ishikawa, Cooper et al. 2004) et dans une réaction d'immunisation dans les organes lymphoïdes secondaires (Herzog, Fu et al. 2013). *In vitro*, il a été montré que les neutrophiles peuvent réduire la sécrétion de sérotonine et l'agrégation des plaquettes en réponse à la thrombine ou au collagène (Valles, Santos et al. 1993).

De telles interactions réciproques entre les plaquettes et les neutrophiles sont aussi observées dans l'immuno-thrombose. De la même façon que les plaquettes favorisent la formation des NETs, ces derniers favorisent l'activation et l'agrégation des plaquettes ainsi que l'activation de la voie contact de la coagulation (Engelmann and Massberg 2013, Gould, Vu et al. 2014).

Les protéases à sérine contenues dans les granules des neutrophiles peuvent également moduler l'activation des plaquettes en clivant leurs récepteurs membranaires. En effet, la cathepsine G et l'élastase peuvent cliver GPIIb diminuant ainsi l'interaction du complexe GPIIb-V-IX avec son ligand. Ces deux protéases peuvent d'autre part activer l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ par clivage protéolytique (Pidard, Renesto et al. 1994(a), Pidard, Renesto et al. 1994(b), Renesto and Chignard 1995, Si-Tahar, Pidard et al. 1997). La protéinase 3, l'élastase et la cathepsine G peuvent aussi inhiber l'activation des plaquettes par la thrombine en clivant son récepteur PAR1 en aval du site d'activation par la thrombine (Renesto, Si-Tahar et al. 1997). L'incubation des plaquettes avec la protéinase 3 conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et de la phosphorylation de la kinase Rho/Rho. La protéinase 3 induit alors un changement de forme des plaquettes sans mener à leur agrégation et à l'expression membranaire de la P-sélectine (Peng, Ramstrom et al. 2014).

Etat d'activation du neutrophile

Dans notre modèle d'étude *in vitro*, nous montrons que l'interaction préalable des neutrophiles avec des cellules endothéliales cultivées dans un environnement polarisé modifie leurs réponses aux plaquettes. Dans ce cas, les plaquettes ont un effet activateur sur les neutrophiles. Cette constatation suggère que le phénotype du neutrophile serait un facteur déterminant pour comprendre leur régulation par les plaquettes.

Des études récentes ont suggéré que la capacité des plaquettes à exercer des effets opposés sur un même paramètre pourrait dépendre de leur état d'activation ; selon l'agoniste, une sécrétion différentielle et sélective de facteurs avec des effets opposés serait observée. Ainsi, il a été montré que les plaquettes libéreraient leurs facteurs pro-angiogéniques en réponse à certains stimuli et leurs facteurs anti-angiogéniques en réponse à d'autres (Italiano, Richardson et al. 2008, Chatterjee, Huang et al. 2011). Ce mécanisme d'action reste cependant controversé, d'autres études ayant montré que ces facteurs seraient libérés de façon stochastique (Kamykowski, Carlton et al. 2011, Jonnalagadda, Izu et al. 2012).

Nos résultats suggèrent un autre mode de régulation dépendant principalement du phénotype de la cellule cible.

De futures études devront déterminer comment cette interaction des neutrophiles avec les cellules endothéliales modifie leur réactivité aux plaquettes et quelle est la spécificité des cellules endothéliales responsable de cet effet. Des récepteurs/mécanismes candidats non exclusifs peuvent d'ores et déjà être proposés (**Tableau 4**).

Plaquettes, neutrophiles et cellules endothéliales expriment CD31 (PECAM-1). La pré-adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales pourrait aboutir au clivage de CD31 sur les neutrophiles, modifiant leur état d'activation. De manière intéressante une étude a montré que l'engagement de CD31 sur les neutrophiles par des anticorps spécifiques immobilisés aboutit au clivage de la L-sélectine, à l'augmentation de l'expression membranaire de l'intégrine Mac-1 et à la génération de ROS. Ces effets ne sont pas observés lorsque les neutrophiles sont en suspension, laissant supposer qu'un *clustering* fort du récepteur et/ou que l'engagement secondaire de Fc γ RIIA seraient requis. De plus, lorsque les neutrophiles sont stimulés par l'interleukine-8, le fMLP ou le PMA un clivage de la L-sélectine et du CD31 sont montrés (Elias, Spellberg et al. 1998).

CD31 a de multiples rôles dans les réactions inflammatoires dont certains sont encore à définir, en particulier concernant les fonctions de défense des neutrophiles (Privratsky, Newman et al. 2010). Il est par exemple impliqué dans l'inhibition par les monocytes de l'agrégation et de la sécrétion des plaquettes en réponse au collagène de type I (Ollivier, Arnaud et al. 2009) ou encore dans le contrôle de l'activation des lymphocytes T, sous sa forme native ou après clivage (Fornasa, Groyer et al. 2010).

Un autre récepteur exprimé à la fois par les plaquettes et les neutrophiles est EMMPRIN (*Extracellular matrix metalloproteinase inducer* ou *basigin* ou CD147) (Kontinen, Li et al. 2000, Agrawal and Yong 2011, Wang, Dai et al. 2011). Le récepteur EMMPRIN exprimé sur les plaquettes pourrait interagir par une liaison homophile avec le neutrophile. De plus, la mise en évidence de EMMPRIN comme ligand de GPVI (Seizer, Borst et al. 2009, Schulz, von Bruhl et al. 2011, Pennings, Yong et al. 2014) devient une nouvelle interaction à explorer et son rôle pourrait être particulièrement important si les facteurs solubles sont impliqués dans la régulation des activités des neutrophiles.

En effet, nos études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la sécrétion de facteurs solubles était dépendante de GPVI (Ollivier, Syvannarath et al. 2014, Gros, Syvannarath et al. 2015).

L'interaction P-sélectine/PSGL-1 peut également être proposée entre d'une part les plaquettes et les neutrophiles et d'autre part entre les cellules endothéliales et les neutrophiles (Mayadas, Johnson et al. 1993, Diacovo, Roth et al. 1996, Zarbock, Polanowska-Grabowska et al. 2007).

L'intégrine $\beta 2$ Mac-1 pourrait aussi être l'objet d'une compétition entre les plaquettes via GPIb et les cellules endothéliales, via ICAM-1 (Diamond, Staunton et al. 1990, Simon, Chen et al. 2000).

Le tableau suivant (**Tableau 4**) synthétise les hypothèses formulées concernant les interactions possibles entre les plaquettes et les ligands de la membrane basale dans la prévention des saignements inflammatoires et d'autre part les plaquettes et les neutrophiles dans la régulation des activités des neutrophiles par les plaquettes.

Récepteur plaquettaire	Ligand potentiel	Structure et/ou cellule exprimant ces ligands
GPVI	Collagène	Membrane basale
	EMMPRIN	Neutrophiles, Monocytes
CLEC-2	Podoplanine	Vaisseaux lymphatiques
		Macrophages
		Fibroblastes
		Péricytes
GPIb	vWF	Membrane basale
	Collagène (via vWF)	Membrane basale
	Mac-1	Neutrophiles
	P-sélectine	Plaquettes, Cellules endothéliales
	Thrombospondine	Membrane basale
$\alpha 6\beta 1$	Laminine	Membrane basale
P-sélectine	PSGL-1	Leucocytes
EMMPRIN	EMMPRIN	Neutrophiles, Monocytes
CD31	CD31	Leucocytes
		Cellules endothéliales
FcγRIIA (Homme)	Amplification des réponses induites par d'autres interactions ?	

Tableau 4 : Les possibles interactions entre (i) les plaquettes et la membrane basale et entre (ii) les plaquettes et les neutrophiles. Ces interactions pourraient être impliquées dans la prévention des saignements inflammatoires et la régulation des activités des neutrophiles par les plaquettes.

Cellules endothéliales et polarisation

Le rôle de ICAM-1 exprimé sur les cellules endothéliales est d'autant plus intéressant à analyser qu'il est un récepteur d'adhésion dont l'expression varie selon le support de culture des cellules endothéliales. Nous avons observé un effet activateur des plaquettes sur les neutrophiles pré-adhérents à des cellules endothéliales cultivées en transwell et non en lab-tek. Or, l'analyse effectuée par immuno-marquage des cellules endothéliales HUVECsensemencées en parallèle sur les deux supports montre des différences de phénotype (**Figure 48**). Les cellules ayant proliféré sur lab-tek sont plus hautes que les cellules endothélialesensemencées sur les transwells, qui sont plus étalées.

De plus, les immuno-marquages du facteur von Willebrand, de ICAM-1 et du noyau suggèrent que le noyau des cellules endothéliales cultivées sur lab-tek comme sur transwell est en position apicale. ICAM-1 est plus fortement exprimé sur les cellules endothéliales cultivées sur transwell et cette expression est principalement apicale. Sur les cellules cultivées en lab-tek, ICAM-1 est exprimé au niveau des jonctions et de la face basale des cellules. Le facteur von Willebrand est dominant sur le versant basal quel que soit le support de culture des cellules endothéliales.

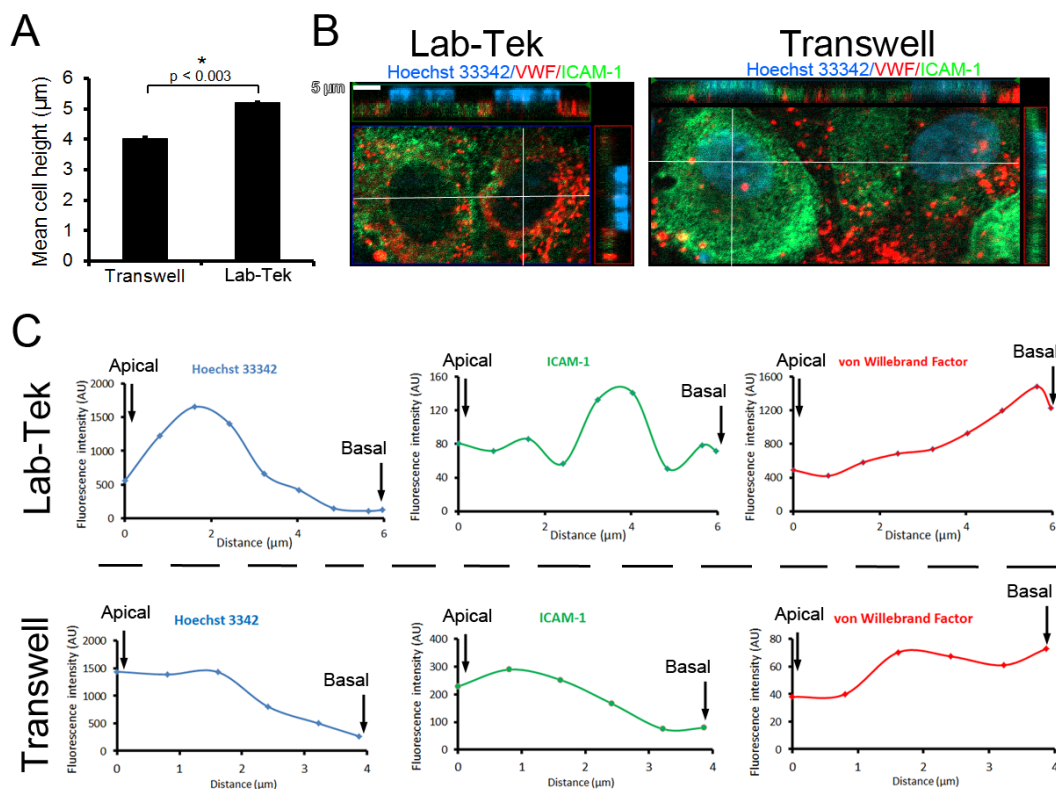


Figure 48 : Caractérisation du phénotype des cellules endothéliales (HUVECs) ensemencées sur lab-tek ou sur transwell. L'expression de ICAM-1 (vert) et du facteur von Willebrand (rouge) sont analysées après prolifération des cellules endothéliales jusqu'à confluence sur lab-tek ou transwell coatés avec de la fibronectine. Le noyau des cellules est marqué par le Hoechst 33342 (bleu).

A. Moyenne de la hauteur des cellules selon le support (n=7 cellules pour chaque support de culture)

B. Image représentative de l'organisation des cellules endothéliales cultivées sur lab-tek ou transwell

C. Quantification des intensités de fluorescence en unité arbitraire (AU) de chaque marqueur en fonction de l'axe de polarité apico-basal (en µm) (Résultat du laboratoire non publié).

Des différences morphologiques existent donc entre les cellules endothéliales cultivées sur lab-tek et celles cultivées sur transwell et pourraient expliquer les différences fonctionnelles observées au niveau de la régulation des activités des neutrophiles par les plaquettes.

De telles différences fonctionnelles ont également été rapportées par d'autres. La culture de cellules endothéliales HUVECs en transwell a permis de discriminer la sécrétion constitutive du facteur von Willebrand de sa sécrétion régulée (Sporn, Marder et al. 1989). Alors que de manière constitutive le vWF est sécrété en quantité identique au niveau basal comme au niveau apical, sa sécrétion est majoritairement basale lorsque les cellules endothéliales sont traitées par un ionophore ou le PMA. De même, la sécrétion du nucléotide adénine tri-phosphate (ATP) est polarisée. A titre d'exemple, pour les cellules HUVECs cultivées sur des transwells la sécrétion constitutive d'ATP est de 29,57 AU (unité arbitraire) du côté apical et de 0,82AU du côté basal. Ces différences sont masquées lorsque ces cellules

sont cultivées en lab-tek puisque ces mêmes auteurs trouvent une quantité d'ATP de 39,14 AU dans la chambre unique de culture (Schwiebert, Rice et al. 2002).

La sécrétion apicale de la serglycine est en opposition avec la sécrétion basale de deux autres protéoglycanes (perlécane et décorine) dans un système de culture en transwell de cellules endothéliales HUVECs (Meen, Oynebraten et al. 2011).

L'importance du microenvironnement dans l'établissement du phénotype des cellules endothéliales soulève la question de la pertinence de la culture cellulaire, et de la différence de réponse entre des cellules endothéliales *in vivo* et des cellules cultivées *in vitro*. Cette question a été au centre d'une étude publiée en 2004 dont les résultats montrent des différences d'expression de certains récepteurs entre des cellules endothéliales HEVs (*High endothelial venules*) fraîchement isolées et ces même cellules mises en culture pendant deux jours (Lacorre, Baekkevold et al. 2004). La culture des cellules en condition de flux ou en présence d'autres types cellulaires permet de minimiser ces différences et de reproduire un environnement plus physiologique. La polarité cellulaire induite par la culture en transwell semble également plus proche des observations réalisées *in vivo* avec une face basale reposant sur une membrane basale et la face apicale exposée au flux sanguin.

Des études sont en cours au laboratoire sur les cellules endothéliales de type HCAECs, que nous avons utilisées pour l'analyse *in vitro* des interactions entre les plaquettes et les neutrophiles, et suggèrent que les cellules HCAECs présentent également des différences de phénotype en fonction des supports de culture (Gros, Ollivier et al., en préparation).

Nos résultats *in vitro* indiquent donc que les plaquettes limitent les activités cytotoxiques des neutrophiles en suspension et à l'inverse favorisent l'activation des neutrophiles adhérents aux cellules endothéliales. *In vivo*, ceci pourrait se traduire par une régulation différente par les plaquettes des neutrophiles circulant comparés aux neutrophiles infiltrés ou en cours de diapédèse dans les tissus. Nos résultats (Gros, Syvannarath et al. 2015) établissent que l'absence de plaquettes diminue la production de stress oxydant au niveau du péritoine après induction d'une réaction immuno-induite. De manière apparemment contradictoire, lorsque les complexes immuns sont injectés dans la circulation par voie intraveineuse à des souris contrôles ou thrombopéniques, nos résultats préliminaires suggèrent que l'absence de plaquette favoriserait la génération de stress oxydant (**Figure 49**). Ces résultats seront à confirmer, et à étendre à l'analyse de la sécrétion des granules neutrophilaires. Cette étude devra aussi être conduite sur des souris GPVI^{-/-}. D'autres modèles de réaction inflammatoire systémique pourront aussi être inclus dans cette nouvelle étude comme un modèle d'endotoxémie induite par le LPS.

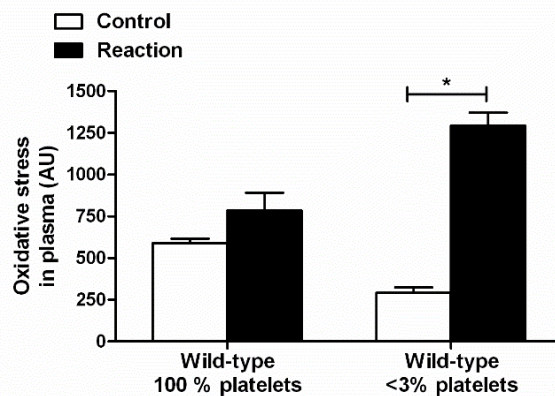


Figure 49 : Quantification du stress oxydant dans le plasma. Suite à l'injection par voie intraveineuse de complexes immuns BSA/anti-BSA (Bovine serum albumin) à des souris contrôles ou thrombopéniques ($n=3$), le plasma a été recueilli après 4 heures de réaction et le stress oxydant mesuré avec une sonde fluorescente. La moyenne en unité arbitraire (AU) \pm SEM sont représentées. * $p<0,05$ (Résultat du laboratoire non publié).

Inclure des souris dont les plaquettes présentent un déficit d'origine génétique en GPVI, en CLEC-2 ou en GPIb dans cette étude, comme dans nos autres études *in vivo*, est important pour valider les résultats obtenus avec les souris rendues thrombopéniques par immuno-déplétion. En effet, ces souris génétiquement modifiées constituent des contrôles nécessaires pour écarter tout artefact expérimental lié à la déplétion des plaquettes par un anticorps dirigé contre GPIb α .

En effet, dans nos études *in vivo*, pour comprendre le rôle des plaquettes dans les réactions inflammatoires, nous avons choisi d'induire des thrombopénies par injection intraveineuse d'un anticorps dirigé contre GPIb α . Cet anticorps monoclonal est bien décrit (Nieswandt, Bergmeier et al. 2000) et permet d'induire une thrombopénie sévère avec un compte de plaquettes inférieur à 3% comparé à la normale. Cette thrombopénie peut se maintenir pendant environ 5 jours sans provoquer de réaction inflammatoire systémique majeure d'après les paramètres évalués, sans pouvoir cependant exclure le déclenchement d'une réaction immunitaire. Cet anticorps provoque la destruction des plaquettes par un mécanisme indépendant de sa partie Fc, probablement par une agglutination des plaquettes sans activation. Les anticorps dirigés contre l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ provoquent aussi une thrombopénie mais celle-ci est dépendante de la partie Fc et s'accompagne d'une réaction anaphylactique.

Dans nos études nous avons également utilisé les souris transgéniques hIL4R α /GPIb α . Ces souris peuvent être déplétées de leurs plaquettes par un anticorps dirigé contre le récepteur humain de l'IL4 sans provoquer de réaction inflammatoire systémique (Boulaftali, Hess et al. 2013). Ces souris présentent l'avantage de pouvoir être ensuite transfusées avec des plaquettes sans que celles-ci ne soient détruites par l'anti-hIL4R. Elles sont également précieuses pour pouvoir analyser le rôle de GPIb α . En effet, les souris GPIb $^{-/-}$ reproduisent les défauts de la maladie de Bernard-Soulier avec une

macrothrombopénie et une désorganisation de la structure des plaquettes (Kanaji, Russell et al. 2002). Les souris hIL4R α /GPIb α ont néanmoins un compte plaquettaire diminué de 30% par rapport à la normale (Corken, Russell et al. 2014).

Des modèles de thrombopénie génétique existent également (Jirouskova, Shet et al. 2007, Bergmeier and Boulaftali 2014). Les gènes codant les facteurs de transcription GATA-1 et NF-E2 sont impliqués dans la plaquetto-genèse et leur délétion induit une thrombopénie. La mutation de NF-E2 ne permet pas d'obtenir des animaux viables car elle est létale en raison d'hémorragies importantes au stade embryonnaire/périnatal. De plus, l'absence de NF-E2 affecte aussi la lignée érythrocytaire. Lorsque les souris survivent, leurs plaquettes présentent une morphologie altérée et sont peu activables (Levin, Peng et al. 1999). L'absence de GATA-1 conduit à une thrombopénie avec une diminution de 85% du compte plaquettaire. Les mégacaryocytes observés chez ces souris sont nombreux mais immatures. Les plaquettes résiduelles sont également déstructurées et présentent des défauts d'activation en réponse à l'ADP et à l'adrénaline (Vyas, Ault et al. 1999). Modifier le gène codant le récepteur de la thrombopoïétine *c-Mpl* (Gurney, Carver-Moore et al. 1994) est également une stratégie pour provoquer une thrombopénie diminuant le compte plaquettaire de 90%. Néanmoins, cette mutation est présente sur les plaquettes résiduelles et elle n'est pas restreinte aux progéniteurs mégacaryocytaires. En effet, une réduction de 60% du nombre de progéniteurs de la niche hématopoïétique est décrite chez les souris *mpl*^{-/-} (Alexander, Roberts et al. 1996).

Ainsi l'immuno-déplétion avec un anti-GPIb α est la stratégie qui permet de diminuer le compte plaquettaire sans affecter ni la fonction des plaquettes résiduelles ni celle d'autres cellules de la lignée hématopoïétique. Cette approche permet également de moduler la sévérité de la thrombopénie en fonction de la quantité d'anticorps administrée.

IV. Clinique et nouvelles pistes thérapeutiques

La majorité des études sur le rôle et les fonctions des plaquettes dans les réactions inflammatoires est réalisée sur des modèles animaux. Ces modèles permettent effectivement de décrypter de manière approfondie les mécanismes mis en jeu, ce qui n'est pas possible chez l'humain pour des raisons éthiques évidentes. Néanmoins, quelques données ont été recueillies sur l'Homme ces dernières années.

Une étude expérimentale sur des sujets sains

Une étude (Schrottmaier, Kral et al. 2016) réalisée sur des volontaires sains a permis d'évaluer la réponse plaquettaire précoce en réponse à une injection intraveineuse de lipopolysaccharide de 2ng/kg. En parallèle, et avant toute injection, une même stimulation *in vitro* sur les cellules de ces mêmes patients a été réalisée. *In vivo*, l'injection de LPS, même à faible dose, entraîne une chute du compte plaquettaire

de 10% au cours de la première heure, reflétant ainsi les observations cliniques faites sur les patients septiques (Claushuis, van Vught et al. 2016). Une autre constatation intéressante de cette étude est que la réponse plaquettaire est graduée ; les auteurs observent une expression membranaire accrue de CD40L et une sécrétion de facteur plaquettaire 4 (PF4) en absence d'une augmentation de l'exposition à la membrane de la P-sélectine ou d'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Cette observation montre qu'il peut y avoir activation plaquettaire en absence d'agrégation ou de formation de thrombi en accord avec nos résultats (Ollivier, Syvannarath et al. 2014). Aucun agrégat leuco-plaquettaire n'est mis en évidence *in vivo*. Au contraire *in vitro* après une stimulation par le LPS du sang total, les plaquettes présentent une augmentation de l'exposition à leur membrane de la P-sélectine et du CD40L et de la production de ROS intra-plaquettaires. Des agrégats leuco-plaquettaires sont aussi observés tout comme une activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ces différences de niveau de réponse pourraient être liées à la présence *in vivo* de régulateurs des interactions plaquettes/leucocytes comme l'endothélium ou les forces de cisaillement.

Traitement des maladies inflammatoires

L'engagement des plaquettes dans les réactions inflammatoires ouvre de nouvelles perspectives de traitement des maladies avec une composante inflammatoire. L'utilisation de médicaments antiplaquettaires pourrait se substituer ou se combiner aux anti-inflammatoires actuellement utilisés (Pitchford 2007, Cattaneo 2015).

Des essais cliniques sont en cours pour mieux déterminer les fonctions inflammatoires et immunomodulatrices des plaquettes. On peut par exemple citer cette étude observationnelle prospective *PRICS* menée aux Etats-Unis (Dr Karhausen, Caroline du Nord, NCT02568410) sur des patients devant subir une intervention chirurgicale cardiaque. L'état d'activation des plaquettes sera analysé et l'existence d'une corrélation avec les marqueurs inflammatoires et la défaillance de certains organes sera déterminée.

Une autre étude observationnelle prospective *PlatSSep* vient d'être proposée en France (Dr Berthelot, Saint-Etienne, NCT02568410). Elle concernera les patients souffrant d'un sepsis sévère et étudiera la réponse des plaquettes à cette infection tout en cherchant à identifier des bio-marqueurs plaquettaires du sepsis.

Des essais cliniques ont déjà été menés pour tester l'efficacité de médicaments antiplaquettaires dans le traitement de maladies inflammatoires. Dans l'essai *PRINA* interventionnel randomisé en double aveugle (Dr Cattaneo, Italie, NCT01305369), des patients asthmatiques ont été traités avec du prasugrel. Le prasugrel est une thiényopyridine qui, après métabolisation, inhibe de manière irréversible le récepteur à l'ADP P2Y₁₂. Les résultats de cette étude ont montré une moindre hyperréactivité bronchique chez

les patients asthmatiques traités avec le prasugrel comparés aux patients recevant le traitement placebo, suggérant une diminution de la composante inflammatoire (Lussana, Di Marco et al. 2015).

Avant d'envisager l'utilisation en clinique de molécules ciblant les plaquettes pour traiter des maladies inflammatoires, les risques hémorragiques devront être évalués ainsi que le rôle des plaquettes dans chaque pathologie. En effet, les plaquettes ne seront une cible thérapeutique d'intérêt uniquement dans les pathologies dans lesquelles elles sont délétères.

Thrombopénie et saignement

Des études ont montré que la thrombopénie ne suffisait pas à expliquer la présence d'hémorragie chez la souris (Bergmeier, Rackebrandt et al. 2000, Nieswandt, Bergmeier et al. 2000, Dominguez, Govezensky et al. 2003) et chez l'humain (Aledort, Hayward et al. 2004). De plus, les souris GPVI-/- ne présentent pas de saignements spontanés alors que des saignements cutanés sont observés quand elles sont soumises à une dermatite immuno-induite. Chez l'Homme, la diminution de l'expression de GPVI a été décrite. L'étude des plaquettes d'un patient présentant un défaut d'agrégation en réponse au collagène est d'ailleurs à l'origine de l'identification de la glycoprotéine VI (Sugiyama, Okuma et al. 1987). Depuis ce premier patient en 1987, d'autres cas de déficit acquis ou inné de GPVI ont été décrits (Arthur, Dunkley et al. 2007). Ces patients sont difficiles à identifier car en absence d'autres anomalies plaquettaires ou hématopoïétiques, ils ne présentent que des saignements cutanéomuqueux modérés.

Ainsi, les circonstances conduisant à des saignements chez les patients avec une thrombopénie modérée ou porteurs d'un déficit d'expression de GPVI ne sont que rarement identifiées. Un suivi régulier avec un relevé des circonstances précises conduisant à des saignements et leur localisation permettrait de déterminer si les saignements sont associés à un état inflammatoire, comme nos résultats le montrent sur des modèles murins thrombopéniques ou GPVI-/-.

Cibler la glycoprotéine VI

L'étude de ces patients avec un déficit génétique ou acquis de GPVI confirme que GPVI ne joue pas un rôle essentiel dans l'hémostase primaire (Arthur, Dunkley et al. 2007). Au contraire, les données expérimentales chez la souris ont démontré que son absence limite les conséquences thrombotiques en particulier dans l'athérombose. Ce rôle majeur de GPVI dans la thrombose associé à l'absence de phénotype hémorragique en cas de déficit fait de GPVI une cible d'intérêt thérapeutique (Zahid, Mangin et al. 2012).

Plusieurs stratégies pour bloquer GPVI sont actuellement en cours de développement. La première stratégie consiste à développer une protéine recombinante GPVI-Fc (Jandrot-Perrus, Busfield et al. 2000, Goebel, Li et al. 2013) qui entrerait en compétition avec la GPVI des plaquettes au niveau de ses

sites de liaison, principalement sur le collagène. La seconde stratégie consiste à développer un fragment Fab bloquant dirigé contre GPVI à partir de l'IgG monoclonale 9O12 (Lecut, Feeney et al. 2003, Mangin, Tang et al. 2012). Ces deux traitements visent à améliorer la prise en charge de l'accident vasculaire cérébrale ischémique (AVC), pathologie dont le seul traitement est actuellement l'administration de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) pour induire la lyse du thrombus. Ce traitement doit cependant être administré dans les quatre heures suivants les premiers signes de l'AVC dans des unités neuro-vasculaires spécialisées. Son administration est soumise à de nombreuses contre-indications et est associée à un risque hémorragique. Une nouvelle approche thérapeutique, la thrombectomie, consiste à recanaliser l'artère en aspirant le caillot. Un antiplaquettaire sans danger comme un antagoniste de GPVI serait utile pour prévenir les récives précoces.

La glycoprotéine VI pourrait également être ciblée dans certaines maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde. L'équipe de Boilard (Boilard, Nigrovic et al. 2010) a en effet montré que des microparticules plaquettaires retrouvées dans le liquide synovial des patients et favorisant la réponse inflammatoire en libérant l'interleukine-1 sont formées suite à une activation des plaquettes dépendante de GPVI.

Nos études et les données de la littérature montrent qu'en inhibant la glycoprotéine VI dans des situations d'inflammation, les risques de saignements sont limités et n'affecteraient pas les organes vitaux que sont le cerveau et les poumons. En effet, GPVI n'est pas impliquée dans la prévention des saignements inflammatoires dans ces organes. Des saignements cutanés pourraient toutefois être observés. La survenue de saignements spontanés avec ces anti-GPVI serait aussi limitée au regard des patients présentant un déficit inné ou acquis en GPVI.

Cependant, dans certaines situations pathologiques l'utilisation d'anti-GPVI peut mener à des saignements. En effet, dans un modèle expérimental d'ischémie-reperfusion du myocarde par ligature de l'artère coronaire gauche chez la souris, la déplétion en GPVI, obtenue par injection d'un anti-GPVI (JAQ1) six jours avant l'induction de la lésion, améliore la reperfusion myocardique, diminue la taille de la zone infarctée et l'infiltration des leucocytes mais son utilisation est aussi associée à des saignements au niveau du myocarde chez une souris sur cinq probablement en raison du déficit complet en GPVI (Pachel, Mathes et al. 2016).

L'utilisation des anti-GPVI, comme de tous les antiplaquettaires, est donc soumise à une évaluation précise des risques hémorragiques et celle-ci ne peut être généralisée ; cette évaluation doit être réalisée dans chaque situation physiopathologique.

Adjuvant de la chimiothérapie

Le rôle des plaquettes dans la régulation des fonctions des leucocytes et la prévention des saignements dans un contexte inflammatoire a une implication clinique importante dans le cadre des tumeurs cancéreuses. En effet, en plus de leur rôle dans la propagation des métastases et la thrombose associée au cancer qui commencent à être bien documentées (Labelle, Begum et al. 2014), les plaquettes contribuent à la stabilité des vaisseaux tumoraux. Ce rôle a été mis en évidence dans des modèles ectopiques de tumeurs solides chez des souris thrombopéniques (Ho-Tin-Noe, Goerge et al. 2008, Ho-Tin-Noe, Carbo et al. 2009). La preuve de concept a aussi été apportée qu'en absence de plaquettes, l'action de la chimiothérapie par paclitaxel était potentialisée (Demers, Ho-Tin-Noe et al. 2011). Cependant, induire une thrombopénie profonde chez un patient souffrant d'un cancer n'est pas envisageable. L'identification précise des récepteurs plaquettaires responsables du maintien de l'intégrité vasculaire tumorale ouvrirait de nouvelles pistes thérapeutiques. Des agents pharmaceutiques dirigés contre ce(s) récepteur(s) pourraient être associés à la chimiothérapie sans affecter les autres fonctions plaquettaires.

Dans des études préliminaires, nous avons implanté en sous-cutanée de manière ectopique des cellules tumorales de type B16F1 (mélanome) sur des souris GPVI^{-/-} et Clec-2^{fl/fl}PF4Cre⁺ et leurs contrôles respectifs. Des souris rendues thrombopéniques ont également reçu cette injection de cellules tumorales. Après excision, pesée et digestion de la tumeur le contenu en hémoglobine est mesuré par un test colorimétrique. Nos résultats montrent des saignements modérés chez les souris avec un déficit plaquettaire en GPVI ou en CLEC-2 comparées aux souris thrombopéniques (**Figure 50**). Ceci pourrait suggérer un rôle redondant de GPVI et de CLEC-2. La suite des travaux consistera à inhiber les deux récepteurs en croisant les deux souches de souris. Des outils pharmacologiques seront aussi utilisés pour bloquer GPVI comme le Fab9O12 chez des souris humanisées pour GPVI. La GPVI et CLEC-2 pourront aussi être immuno-déplétés par l'injection respective des anticorps JAQ1 ou INU1 commercialisés. L'injection des molécules chimériques GPVI-Fc ou CLEC-2-Fc comme inhibiteurs compétitifs est aussi une stratégie expérimentale possible.

En plus de la quantification des saignements intra-tumoraux, la mobilisation des leucocytes au cours du développement de la tumeur et son contenu en leucocytes seront analysés par cytométrie en flux grâce à un panel d'anticorps dirigés contre les principales classes de leucocytes.

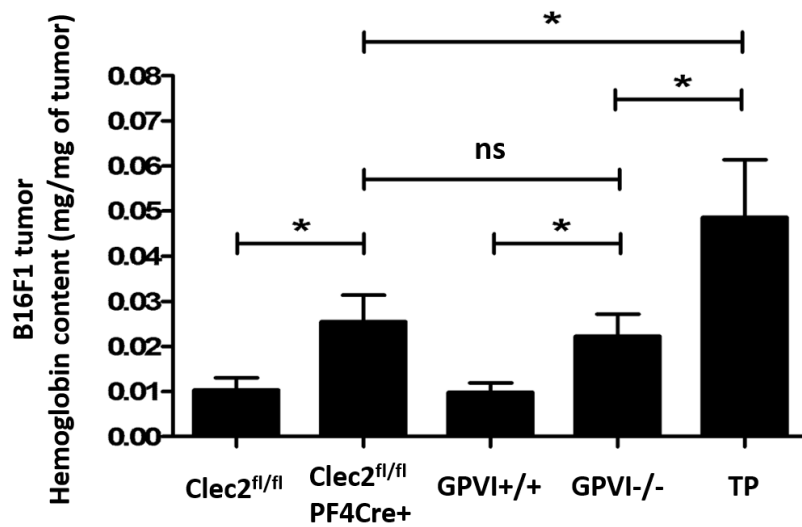


Figure 50 : Quantification du contenu intra-tumoral en hémoglobine. Le contenu en hémoglobine de tumeur B16F1 implantée chez des souris avec un déficit plaquettaire en GPVI (GPVI^{-/-}) ou en CLEC-2 (Clec2^{fl/fl}PF4Cre⁺), des souris thrombopéniques (TP), et leurs contrôles respectifs, est quantifié par absorbance à 405nm. La moyenne en mg d'hémoglobine par mg de tumeur \pm SEM sont représentées. * $p < 0,05$, $n \geq 10$ souris par groupe (Résultat du laboratoire non publié).

V. Conclusion

En conclusion, l'ensemble de ce travail montre qu'au-delà de leur fonction hémostatique les plaquettes participent aux différentes étapes d'une réaction inflammatoire. La graduation des réponses plaquettaires est un élément important à prendre en considération dans ce contexte. Les modalités de régulation des réactions inflammatoires par les plaquettes sont différentes d'une pathologie à l'autre, d'un organe à un autre et ne mettent pas en jeu les mêmes mécanismes d'activation que dans l'hémostase primaire. Nos résultats contribuent à une meilleure compréhension des fonctions des plaquettes dans les réactions inflammatoires et constituent ainsi une première étape vers de nouvelles applications des médicaments antiplaquettaires.

Références Bibliographiques

Adrover, J. M., J. A. Nicolas-Avila and A. Hidalgo (2016). "Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils." Trends Immunol **37**(5): 334-345.

Afshar-Kharghan, V., C. Q. Li, M. Khoshnevis-Asl and J. A. Lopez (1999). "Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Iba1 gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex." Blood **94**(1): 186-191.

Agrawal, S. M. and V. W. Yong (2011). "The many faces of EMMPRIN - roles in neuroinflammation." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 213-219.

Aguilar, A., F. Pertuy, A. Eckly, C. Strassel, D. Collin, C. Gachet, F. Lanza and C. Leon (2016). "Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation." Blood.

Aird, W. C. (2007(a)). "Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium." I. Structure, Function, and Mechanisms **100**(2): 158-173.

Aird, W. C. (2007(b)). "Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: II. Representative Vascular Beds." Circulation Research **100**(2): 174-190.

Aledort, L. M., C. P. Hayward, M. G. Chen, J. L. Nichol and J. Bussel (2004). "Prospective screening of 205 patients with ITP, including diagnosis, serological markers, and the relationship between platelet counts, endogenous thrombopoietin, and circulating antithrombopoietin antibodies." Am J Hematol **76**(3): 205-213.

Alexander, J. S., W. F. Patton, B. W. Christman, L. L. Cuiper and F. R. Haselton (1998). "Platelet-derived lysophosphatidic acid decreases endothelial permeability in vitro." Am J Physiol **274**(1 Pt 2): H115-122.

Alexander, W. S., A. W. Roberts, A. B. Maurer, N. A. Nicola, A. R. Dunn and D. Metcalf (1996). "Studies of the c-Mpl thrombopoietin receptor through gene disruption and activation." Stem Cells **14 Suppl 1**: 124-132.

Alshehri, O. M., C. E. Hughes, S. Montague, S. K. Watson, J. Frampton, M. Bender and S. P. Watson (2015). "Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets." Blood **126**(13): 1601-1608.

Amulic, B., C. Cazalet, G. L. Hayes, K. D. Metzler and A. Zychlinsky (2012). "Neutrophil function: from mechanisms to disease." Annu Rev Immunol **30**: 459-489.

Anabel, A. S., P. C. Eduardo, H. C. Pedro Antonio, S. M. Carlos, N. M. Juana, T. A. Honorio, V. S. Nicolas and A. R. Sergio Roberto (2014). "Human platelets express Toll-like receptor 3 and respond to poly I:C." Hum Immunol **75**(12): 1244-1251.

Andre, P., L. Nannizzi-Alaimo, S. K. Prasad and D. R. Phillips (2002). "Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease." Circulation **106**(8): 896-899.

Andrews, R. K., D. Karunakaran, E. E. Gardiner and M. C. Berndt (2007). "Platelet receptor proteolysis: a mechanism for downregulating platelet reactivity." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(7): 1511-1520.

Anggard, E. E. (1990). "The endothelium--the body's largest endocrine gland?" J Endocrinol **127**(3): 371-375.

Aramaki, K. M. and A. P. Reiner (1999). "A novel isoform of platelet glycoprotein Ib alpha is prevalent in African Americans." Am J Hematol **60**(1): 77-79.

- Arman, M. and K. Krauel (2015). "Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis." J Thromb Haemost **13**(6): 893-908.
- Arnljots, K., O. Sorensen, K. Lollike and N. Borregaard (1998). "Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells." Leukemia **12**(11): 1789-1795.
- Arthur, J. F., S. Dunkley and R. K. Andrews (2007). "Platelet glycoprotein VI-related clinical defects." Br J Haematol **139**(3): 363-372.
- Arthur, J. F., J. Qiao, Y. Shen, A. K. Davis, E. Dunne, M. C. Berndt, E. E. Gardiner and R. K. Andrews (2012). "ITAM receptor-mediated generation of reactive oxygen species in human platelets occurs via Syk-dependent and Syk-independent pathways." J Thromb Haemost **10**(6): 1133-1141.
- Arthus, M. M. (1903). "Injections répétées de sérum de cheval chez le lapin." Comptes rendus des séances de la société de biologie et de ses filiales **55**(Séance du 16 juin): 817-820.
- Assinger, A. (2014). "Platelets and Infection – An Emerging Role of Platelets in Viral Infection." Frontiers in Immunology **5**(649).
- Astarita, J. L., S. E. Acton and S. J. Turley (2012). "Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer." Front Immunol **3**: 283.
- Bainton, D. F., J. L. Ulliyot and M. G. Farquhar (1971). "The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow." J Exp Med **134**(4): 907-934.
- Baker, R. I., J. Eikelboom, E. Lofthouse, N. Staples, V. Afshar-Kharghan, J. A. Lopez, Y. Shen, M. C. Berndt and G. Hankey (2001). "Platelet glycoprotein Ibalph Kozak polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke." Blood **98**(1): 36-40.
- Baluk, P., P. Bolton, A. Hirata, G. Thurston and D. M. McDonald (1998). "Endothelial gaps and adherent leukocytes in allergen-induced early- and late-phase plasma leakage in rat airways." Am J Pathol **152**(6): 1463-1476.
- Barrow, A. D., E. Astoul, A. Floto, G. Brooke, I. A. Relou, N. S. Jennings, K. G. Smith, W. Ouwehand, R. W. Farndale, D. R. Alexander and J. Trowsdale (2004). "Cutting edge: TREM-like transcript-1, a platelet immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif encoding costimulatory immunoreceptor that enhances, rather than inhibits, calcium signaling via SHP-2." J Immunol **172**(10): 5838-5842.
- Barrow, A. D. and J. Trowsdale (2006). "You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling." Eur J Immunol **36**(7): 1646-1653.
- Basil, M. C. and B. D. Levy (2016). "Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation." Nat Rev Immunol **16**(1): 51-67.
- Baumann, U., J. Köhl, T. Tschernig, K. Schwerter-Strumpf, J. S. Verbeek, R. E. Schmidt and J. E. Gessner (2000). "A Codominant Role of FcγRI/III and C5aR in the Reverse Arthus Reaction." The Journal of Immunology **164**(2): 1065-1070.
- Bender, M., I. Hagedorn and B. Nieswandt (2011). "Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl₃ -induced thrombosis." J Thromb Haemost **9**(7): 1423-1426.
- Bender, M., F. May, V. Lorenz, I. Thielmann, I. Hagedorn, B. A. Finney, T. Vogtle, K. Remer, A. Braun, M. Bosl, S. P. Watson and B. Nieswandt (2013). "Combined in vivo depletion of glycoprotein VI and C-type lectin-like receptor 2 severely compromises hemostasis and abrogates arterial thrombosis in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(5): 926-934.

- Benezech, C., S. Nayar, B. A. Finney, D. R. Withers, K. Lowe, G. E. Desanti, C. L. Marriott, S. P. Watson, J. H. Caamano, C. D. Buckley and F. Barone (2014). "CLEC-2 is required for development and maintenance of lymph nodes." *Blood* **123**(20): 3200-3207.
- Bengtsson, T., S. Zalavary, O. Stendahl and M. Grenegard (1996). "Release of oxygen metabolites from chemoattractant-stimulated neutrophils is inhibited by resting platelets: role of extracellular adenosine and actin polymerization." *Blood* **87**(10): 4411-4423.
- Berger, G., D. W. Hartwell and D. D. Wagner (1998). "P-Selectin and platelet clearance." *Blood* **92**(11): 4446-4452.
- Bergmeier, W. and Y. Boulaftali (2014). "Adoptive transfer method to study platelet function in mouse models of disease." *Thromb Res* **133 Suppl 1**: S3-5.
- Bergmeier, W., C. L. Piffath, T. Goerge, S. M. Cifuni, Z. M. Ruggeri, J. Ware and D. D. Wagner (2006). "The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(45): 16900-16905.
- Bergmeier, W., K. Rackebrandt, W. Schroder, H. Zirngibl and B. Nieswandt (2000). "Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIIb-IX with novel monoclonal antibodies." *Blood* **95**(3): 886-893.
- Bertozzi, C. C., A. A. Schmaier, P. Mericko, P. R. Hess, Z. Zou, M. Chen, C. Y. Chen, B. Xu, M. M. Lu, D. Zhou, E. Sebzda, M. T. Santore, D. J. Merianos, M. Stadtfeld, A. W. Flake, T. Graf, R. Skoda, J. S. Maltzman, G. A. Koretzky and M. L. Kahn (2010). "Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling." *Blood* **116**(4): 661-670.
- Bianchi, M., A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R. A. Seger, A. Zychlinsky and J. Reichenbach (2009). "Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis." *Blood* **114**(13): 2619-2622.
- Boilard, E., P. A. Nigrovic, K. Larabee, G. F. Watts, J. S. Coblyn, M. E. Weinblatt, E. M. Massarotti, E. Remold-O'Donnell, R. W. Farndale, J. Ware and D. M. Lee (2010). "Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production." *Science* **327**(5965): 580-583.
- Bonnefoy, A., R. A. Romijn, P. A. Vandervoort, V. A. N. R. I, J. Vermynen and M. F. Hoylaerts (2006). "von Willebrand factor A1 domain can adequately substitute for A3 domain in recruitment of flowing platelets to collagen." *J Thromb Haemost* **4**(10): 2151-2161.
- Borregaard, N. (2010). "Neutrophils, from Marrow to Microbes." *Immunity* **33**(5): 657-670.
- Borregaard, N. and J. B. Cowland (1997). "Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte." *Blood* **89**(10): 3503-3521.
- Boulaftali, Y., P. R. Hess, T. M. Getz, A. Cholka, M. Stolla, N. Mackman, A. P. Owens, 3rd, J. Ware, M. L. Kahn and W. Bergmeier (2013). "Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation." *J Clin Invest* **123**(2): 908-916.
- Boulaftali, Y., P. R. Hess, M. L. Kahn and W. Bergmeier (2014). "Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity." *Circ Res* **114**(7): 1174-1184.
- Boxio, R., C. Bossenmeyer-Pourié, N. Steinckwich, C. Dournon and O. Nüße (2004). "Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils." *Journal of Leukocyte Biology* **75**(4): 604-611.

- Brewer, D. B. (2006). "Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet." Br J Haematol **133**(3): 251-258.
- Brill, A., H. Elinav and D. Varon (2004). "Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis." Cardiovasc Res **63**(2): 226-235.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch and A. Zychlinsky (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science **303**(5663): 1532-1535.
- Broos, K., S. F. De Meyer, H. B. Feys, K. Vanhoorelbeke and H. Deckmyn (2012). "Blood platelet biochemistry." Thromb Res **129**(3): 245-249.
- Broos, K., H. B. Feys, S. F. De Meyer, K. Vanhoorelbeke and H. Deckmyn (2011). "Platelets at work in primary hemostasis." Blood Reviews **25**(4): 155-167.
- Bryckaert, M., J. P. Rosa, C. V. Denis and P. J. Lenting (2015). "Of von Willebrand factor and platelets." Cell Mol Life Sci **72**(2): 307-326.
- Burnier, L., P. Fontana, B. R. Kwak and A. Angelillo-Scherrer (2009). "Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine." Thromb Haemost **101**(3): 439-451.
- Burns, A. R., C. W. Smith and D. C. Walker (2003). "Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung." Physiol Rev **83**(2): 309-336.
- Burns, A. R., F. Takei and C. M. Doerschuk (1994). "Quantitation of ICAM-1 expression in mouse lung during pneumonia." J Immunol **153**(7): 3189-3198.
- Cain, R. J., B. Vanhaesebroeck and A. J. Ridley (2012). "Different PI 3-kinase inhibitors have distinct effects on endothelial permeability and leukocyte transmigration." Int J Biochem Cell Biol **44**(11): 1929-1936.
- Camerer, E., J. B. Regard, I. Cornelissen, Y. Srinivasan, D. N. Duong, D. Palmer, T. H. Pham, J. S. Wong, R. Pappu and S. R. Coughlin (2009). "Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice." J Clin Invest **119**(7): 1871-1879.
- Carbo, C., I. del Conde and D. Duerschmied (2009). "Petechial bleeding after sunburn in a patient with mild thrombocytopenia." Am J Hematol **84**(8): 523.
- Carrim, N., J. F. Arthur, J. R. Hamilton, E. E. Gardiner, R. K. Andrews, N. Moran, M. C. Berndt and P. Metharom (2015). "Thrombin-induced reactive oxygen species generation in platelets: A novel role for protease-activated receptor 4 and GPIIb/IIIa." Redox Biol **6**: 640-647.
- Cattaneo, M. (2015). "The platelet P2 receptors in inflammation." Hamostaseologie **35**(3): 262-266.
- Cazenave, J. P., P. Ohlmann, D. Cassel, A. Eckly, B. Hechler and C. Gachet (2004). "Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood." Methods Mol Biol **272**: 13-28.
- Chang, Y., D. Bluteau, N. Debili and W. Vainchenker (2007). "From hematopoietic stem cells to platelets." J Thromb Haemost **5 Suppl 1**: 318-327.
- Chatterjee, M., Z. Huang, W. Zhang, L. Jiang, K. Hultenby, L. Zhu, H. Hu, G. P. Nilsson and N. Li (2011). "Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli." Blood **117**(14): 3907-3911.

- Chen, J., X. Fu, Y. Wang, M. Ling, B. McMullen, J. Kulman, D. W. Chung and J. A. Lopez (2010). "Oxidative modification of von Willebrand factor by neutrophil oxidants inhibits its cleavage by ADAMTS13." Blood **115**(3): 706-712.
- Chi, J. T., H. Y. Chang, G. Haraldsen, F. L. Jahnsen, O. G. Troyanskaya, D. S. Chang, Z. Wang, S. G. Rockson, M. van de Rijn, D. Botstein and P. O. Brown (2003). "Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10623-10628.
- Cicmil, M., J. M. Thomas, M. Leduc, C. Bon and J. M. Gibbins (2002). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets." Blood **99**(1): 137-144.
- Clark, S. R., A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Deviney, C. J. Doig, F. H. Green and P. Kubes (2007). "Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood." Nat Med **13**(4): 463-469.
- Claushuis, T. A., L. A. van Vught, B. P. Scicluna, M. A. Wiewel, P. M. Klein Klouwenberg, A. J. Hoogendijk, D. S. Ong, O. L. Cremer, J. Horn, M. Franitza, M. R. Toliat, P. Nurnberg, A. H. Zwinderman, M. J. Bonten, M. J. Schultz and T. van der Poll (2016). "Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients." Blood **127**(24): 3062-3072.
- Clemetson, K. J. (2007). "A short history of platelet glycoprotein Ib complex." Thromb Haemost **98**(1): 63-68.
- Cochrane, C. G. and B. S. Aikin (1966). "Polymorphonuclear leukocytes in immunologic reactions. The destruction of vascular basement membrane in vivo and in vitro." J Exp Med **124**(4): 733-752.
- Cohen, R. A., J. T. Shepherd and P. M. Vanhoutte (1983(a)). "Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets." Science **221**(4607): 273-274.
- Cohen, R. A., J. T. Shepherd and P. M. Vanhoutte (1983(b)). "5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries." Am J Physiol **245**(6): H1077-1080.
- Coller, B. S. (1984). "Bizzozzero and the discovery of the blood platelet." Lancet **1**(8380): 804.
- Cooper, D., K. D. Chitman, M. C. Williams and D. N. Granger (2003). "Time-dependent platelet-vessel wall interactions induced by intestinal ischemia-reperfusion." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **284**(6): G1027-1033.
- Corken, A., S. Russell, J. Dent, S. R. Post and J. Ware (2014). "Platelet glycoprotein Ib-IX as a regulator of systemic inflammation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(5): 996-1001.
- Corral, J., R. Gonzalez-Conejero, M. L. Lozano, J. Rivera and V. Vicente (1998). "New alleles of the platelet glycoprotein Ibalpha gene." Br J Haematol **103**(4): 997-1003.
- Crowle, A. J. (1975). "Delayed hypersensitivity in the mouse." Adv Immunol **20**: 197-264.
- Crozat, K., K. Hoebe, S. Ugolini, N. A. Hong, E. Janssen, S. Rutschmann, S. Mudd, S. Sovath, E. Vivier and B. Beutler (2007). "Jinx, an MCMV susceptibility phenotype caused by disruption of Unc13d: a mouse model of type 3 familial hemophagocytic lymphohistiocytosis." J Exp Med **204**(4): 853-863.
- Cullere, X., S. K. Shaw, L. Andersson, J. Hirahashi, F. W. Lusinskas and T. N. Mayadas (2005). "Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase." Blood **105**(5): 1950-1955.
- Curtis, B. R. and J. G. McFarland (2014). "Human platelet antigens - 2013." Vox Sang **106**(2): 93-102.

- D'Ambrosio, D., K. L. Hippen, S. A. Minskoff, I. Mellman, G. Pani, K. A. Siminovitch and J. C. Cambier (1995). "Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RIIB1." Science **268**(5208): 293-297.
- Dachary-Prigent, J., J. M. Freyssinet, J. M. Pasquet, J. C. Carron and A. T. Nurden (1993). "Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups." Blood **81**(10): 2554-2565.
- Daeron, M., S. Latour, O. Malbec, E. Espinosa, P. Pina, S. Pasmans and W. H. Fridman (1995). "The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation." Immunity **3**(5): 635-646.
- Danielli, J. F. (1940). "Capillary permeability and oedema in the perfused frog." J Physiol **98**(1): 109-129.
- De Candia, E. (2012). "Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history." Thromb Res **129**(3): 250-256.
- de Stoppelaar, S. F., C. van 't Veer, T. A. Claushuis, B. J. Albersen, J. J. Roelofs and T. van der Poll (2014). "Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia-derived sepsis in mice." Blood **124**(25): 3781-3790.
- Del Conde, I., M. A. Cruz, H. Zhang, J. A. Lopez and V. Afshar-Kharghan (2005). "Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system." J Exp Med **201**(6): 871-879.
- Del Principe, D., A. Menichelli, S. Di Giulio, W. De Matteis, M. Giordani, A. M. Pentassuglio and A. Finazzi-Agro (1990). "Stimulated platelets release factor(s) affecting the in vitro response of human polymorphonuclear cells." J Leukoc Biol **48**(1): 7-14.
- Del Rey, M. J., R. Fare, E. Izquierdo, A. Usategui, J. L. Rodriguez-Fernandez, A. Suarez-Fueyo, J. D. Canete and J. L. Pablos (2014). "Clinicopathological correlations of podoplanin (gp38) expression in rheumatoid synovium and its potential contribution to fibroblast platelet crosstalk." PLoS One **9**(6): e99607.
- Demers, M., B. Ho-Tin-Noe, D. Schatzberg, J. J. Yang and D. D. Wagner (2011). "Increased efficacy of breast cancer chemotherapy in thrombocytopenic mice." Cancer Res **71**(5): 1540-1549.
- Deppermann, C., P. Kraft, J. Volz, M. K. Schuhmann, S. Beck, K. Wolf, D. Stegner, G. Stoll and B. Nieswandt (2017). "Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice." Blood.
- Deppermann, C., P. Nurden, A. T. Nurden, B. Nieswandt and D. Stegner (2013). "The Nbeal2^{-/-} mouse as a model for the gray platelet syndrome." Rare Diseases **1**(1): e26561.
- Devi, S., M. P. Kuligowski, R. Y. Kwan, E. Westein, S. P. Jackson, A. R. Kitching and M. J. Hickey (2010). "Platelet recruitment to the inflamed glomerulus occurs via an alphaIIb beta3/GPVI-dependent pathway." Am J Pathol **177**(3): 1131-1142.
- Diacovo, T. G., S. J. Roth, J. M. Buccola, D. F. Bainton and T. A. Springer (1996). "Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18." Blood **88**(1): 146-157.
- Diagouraga, B., A. Grichine, A. Fertin, J. Wang, S. Khochbin and K. Sadoul (2014). "Motor-driven marginal band coiling promotes cell shape change during platelet activation." J Cell Biol **204**(2): 177-185.

- Diamond, M. S., D. E. Staunton, A. R. de Fougerolles, S. A. Stacker, J. Garcia-Aguilar, M. L. Hibbs and T. A. Springer (1990). "ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18)." J Cell Biol **111**(6 Pt 2): 3129-3139.
- Doeing, D. C., J. L. Borowicz and E. T. Crockett (2003). "Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods." BMC Clin Pathol **3**(1): 3.
- Doerschuk, C. M. (2001). "Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs." Microcirculation **8**(2): 71-88.
- Doerschuk, C. M., N. Beyers, H. O. Coxson, B. Wiggs and J. C. Hogg (1993). "Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung." J Appl Physiol (1985) **74**(6): 3040-3045.
- Doerschuk, C. M., R. K. Winn, H. O. Coxson and J. M. Harlan (1990). "CD18-dependent and -independent mechanisms of neutrophil emigration in the pulmonary and systemic microcirculation of rabbits." J Immunol **144**(6): 2327-2333.
- Dominguez, V., T. Govezensky, G. Gevorkian and C. Larralde (2003). "Low platelet counts alone do not cause bleeding in an experimental immune thrombocytopenic purpura in mice." Haematologica **88**(6): 679-687.
- Dowling, M. R., E. C. Josefsson, K. J. Henley, P. D. Hodgkin and B. T. Kile (2010). "Platelet senescence is regulated by an internal timer, not damage inflicted by hits." Blood **116**(10): 1776-1778.
- Dütting, S., M. Bender and B. Nieswandt (2012). "Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?!" Trends in Pharmacological Sciences **33**(11): 583-590.
- Eash, K. J., A. M. Greenbaum, P. K. Gopalan and D. C. Link (2010). "CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow." J Clin Invest **120**(7): 2423-2431.
- Eckly, A., J. L. Gendrault, B. Hechler, J. P. Cazenave and C. Gachet (2001). "Differential involvement of the P2Y1 and P2YT receptors in the morphological changes of platelet aggregation." Thromb Haemost **85**(4): 694-701.
- Eckly, A., J. Y. Rinckel, F. Proamer, N. Ulas, S. Joshi, S. W. Whiteheart and C. Gachet (2016). "Respective contributions of single and compound granule fusion to secretion by activated platelets." Blood **128**(21): 2538-2549.
- Elias, C. G., J. P. Spellberg, B. Karan-Tamir, C. H. Lin, Y. J. Wang, P. J. McKenna, W. A. Muller, M. M. Zukowski and D. P. Andrew (1998). "Ligation of CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils." European Journal of Immunology **28**(6): 1948-1958.
- Engelmann, B. and S. Massberg (2013). "Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity." Nat Rev Immunol **13**(1): 34-45.
- Falati, S., S. Patil, P. L. Gross, M. Stapleton, G. Merrill-Skoloff, N. E. Barrett, K. L. Pixton, H. Weiler, B. Cooley, D. K. Newman, P. J. Newman, B. C. Furie, B. Furie and J. M. Gibbins (2006). "Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo." Blood **107**(2): 535-541.
- Fan, X., P. Shi, J. Dai, Y. Lu, X. Chen, X. Liu, K. Zhang, X. Wu, Y. Sun, K. Wang, L. Zhu, C. C. Zhang, J. Zhang, G. Q. Chen, J. Zheng and J. Liu (2014). "Paired immunoglobulin-like receptor B regulates platelet activation." Blood **124**(15): 2421-2430.

- Finney, B. A., E. Schweighoffer, L. Navarro-Nunez, C. Benezech, F. Barone, C. E. Hughes, S. A. Langan, K. L. Lowe, A. Y. Pollitt, D. Mourao-Sa, S. Sheardown, G. B. Nash, N. Smithers, C. Reis e Sousa, V. L. Tybulewicz and S. P. Watson (2012). "CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development." Blood **119**(7): 1747-1756.
- Fitch-Tewfik, J. L. and R. Flaumenhaft (2013). "Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells." Front Endocrinol (Lausanne) **4**: 77.
- Fornasa, G., E. Groyer, M. Clement, J. Dimitrov, C. Compain, A. T. Gaston, A. Varthaman, J. Khallou-Laschet, D. K. Newman, S. Graff-Dubois, A. Nicoletti and G. Caligiuri (2010). "TCR stimulation drives cleavage and shedding of the ITIM receptor CD31." J Immunol **184**(10): 5485-5492.
- Frieser, M., H. Nockel, F. Pausch, C. Roder, A. Hahn, R. Deutzmann and L. M. Sorokin (1997). "Cloning of the mouse laminin alpha 4 cDNA. Expression in a subset of endothelium." Eur J Biochem **246**(3): 727-735.
- Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann and A. Zychlinsky (2007). "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps." J Cell Biol **176**(2): 231-241.
- Fuchs, T. A., A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, Jr., S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig and D. D. Wagner (2010). "Extracellular DNA traps promote thrombosis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(36): 15880-15885.
- Fujita, H., Y. Hashimoto, S. Russell, B. Zieger and J. Ware (1998). "In Vivo Expression of Murine Platelet Glycoprotein Iba." Blood **92**(2): 488-495.
- Fullerton, J. N. and D. W. Gilroy (2016). "Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier." Nat Rev Drug Discov **15**(8): 551-567.
- Gachet, C. (2013). "Les mécanismes moléculaires de l'activation plaquettaire." Bulletin de l'Académie nationale de médecine **197**(2): 361-373.
- Garraud, O. and F. Cognasse (2015). "Are Platelets Cells? And if Yes, are They Immune Cells?" Frontiers in Immunology **6**(70).
- Gazit, S. L., B. Mariko, P. Therond, B. Decouture, Y. Xiong, L. Couty, P. Bonnin, V. Baudrie, S. M. Le Gall, B. Dizier, N. Zoghdani, J. Ransinan, J. R. Hamilton, P. Gaussem, P. L. Tharaux, J. Chun, S. R. Coughlin, C. Bachelot-Loza, T. Hla, B. Ho-Tin-Noe and E. Camerer (2016). "Platelet and Erythrocyte Sources of S1P Are Redundant for Vascular Development and Homeostasis, but Both Rendered Essential After Plasma S1P Depletion in Anaphylactic Shock." Circ Res **119**(8): e110-126.
- Ge, S., E. Woo and C. L. Haynes (2011). "Quantal regulation and exocytosis of platelet dense-body granules." Biophys J **101**(10): 2351-2359.
- Gibbins, J., J. Asselin, R. Farndale, M. Barnes, C. L. Law and S. P. Watson (1996). "Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets." J Biol Chem **271**(30): 18095-18099.
- Gimbrone, M. A., Jr., R. H. Aster, R. S. Cotran, J. Corkery, J. H. Jandl and J. Folkman (1969). "Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium." Nature **222**(5188): 33-36.
- Gimbrone, M. A., Jr., R. S. Cotran and J. Folkman (1974). "Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis." J Cell Biol **60**(3): 673-684.

- Gitz, E., A. Y. Pollitt, J. J. Gitz-Francois, O. Alshehri, J. Mori, S. Montague, G. B. Nash, M. R. Douglas, E. E. Gardiner, R. K. Andrews, C. D. Buckley, P. Harrison and S. P. Watson (2014). "CLEC-2 expression is maintained on activated platelets and on platelet microparticles." Blood **124**(14): 2262-2270.
- 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): e66960.
- Goerge, T., B. Ho-Tin-Noe, C. Carbo, C. Benarafa, E. Remold-O'Donnell, B. Q. Zhao, S. M. Cifuni and D. D. Wagner (2008). "Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia." Blood **111**(10): 4958-4964.
- Gould, T. J., T. T. Vu, L. L. Swystun, D. J. Dwivedi, S. H. Mai, J. I. Weitz and P. C. Liaw (2014). "Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(9): 1977-1984.
- Gros, A., V. Syvannarath, L. Lamrani, V. Ollivier, S. Loyau, T. Goerge, B. Nieswandt, M. Jandrot-Perrus and B. Ho-Tin-Noe (2015). "Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice." Blood **126**(8): 1017-1026.
- Grottum, K. A. and N. O. Solum (1969). "Congenital thrombocytopenia with giant platelets: a defect in the platelet membrane." Br J Haematol **16**(3): 277-290.
- Gruner, S., M. Prostedna, V. Schulte, T. Krieg, B. Eckes, C. Brakebusch and B. Nieswandt (2003). "Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo." Blood **102**(12): 4021-4027.
- Gunay-Aygun, M., T. C. Falik-Zaccari, T. Vilboux, Y. Zivony-Elboum, F. Gumruk, M. Cetin, M. Khayat, C. F. Boerkoel, N. Kfir, Y. Huang, D. Maynard, H. Dorward, K. Berger, R. Kleta, Y. Anikster, M. Arat, A. S. Freiberg, B. E. Kehrel, K. Jurk, P. Cruz, J. C. Mullikin, J. G. White, M. Huizing and W. A. Gahl (2011). "NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules." Nat Genet **43**(8): 732-734.
- Gurney, A. L., K. Carver-Moore, F. J. de Sauvage and M. W. Moore (1994). "Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice." Science **265**(5177): 1445-1447.
- Halai, K., J. Whiteford, B. Ma, S. Nourshargh and A. Woodfin (2014). "ICAM-2 facilitates luminal interactions between neutrophils and endothelial cells in vivo." J Cell Sci **127**(Pt 3): 620-629.
- 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.
- Hamzeh-Cognasse, H., P. Damien, A. Chabert, B. Pozzetto, F. Cognasse and O. Garraud (2015). "Platelets and infections - complex interactions with bacteria." Front Immunol **6**: 82.
- Harper, M. T. and A. W. Poole (2010). "Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation." J Thromb Haemost **8**(3): 454-462.
- Hartwig, J. H. and M. DeSisto (1991). "The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments." The Journal of Cell Biology **112**(3): 407-425.
- Hazenbos, W. L. W., J. E. Gessner, F. M. A. Hofhuis, H. Kuipers, D. Meyer, I. A. F. M. Heijnen, R. E. Schmidt, M. Sandor, P. J. A. Capel, M. Daëron, J. G. J. van de Winkel and J. S. Verbeek (1996).

"Impaired IgG-Dependent Anaphylaxis and Arthus Reaction in FcγRIII (CD16) Deficient Mice." Immunity **5**(2): 181-188.

Hechler, B. and C. Gachet (2011). "P2 receptors and platelet function." Purinergic Signal **7**(3): 293-303.

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.

Heijnen, H. and P. van der Sluijs (2015). "Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not?" J Thromb Haemost **13**(12): 2141-2151.

Heller, T., M. Hennecke, U. Baumann, J. E. Gessner, A. M. zu Vilsendorf, M. Baensch, F. Boulay, A. Kola, A. Klos, W. Bautsch and J. Kohl (1999). "Selection of a C5a receptor antagonist from phage libraries attenuating the inflammatory response in immune complex disease and ischemia/reperfusion injury." J Immunol **163**(2): 985-994.

Heltianu, C., M. Simionescu and N. Simionescu (1982). "Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: characteristic high-affinity binding sites in venules." J Cell Biol **93**(2): 357-364.

Henn, V., J. R. Slupsky, M. Grafe, I. Anagnostopoulos, R. Forster, G. Muller-Berghaus and R. A. Kroczeck (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." Nature **391**(6667): 591-594.

Herbertsson, H. and T. Bengtsson (2001). "Role of platelets and the arachidonic acid pathway in the regulation of neutrophil oxidase activity." Scand J Clin Lab Invest **61**(8): 641-649.

Herzog, B. H., J. Fu, S. J. Wilson, P. R. Hess, A. Sen, J. M. McDaniel, Y. Pan, M. Sheng, T. Yago, R. Silasi-Mansat, S. McGee, F. May, B. Nieswandt, A. J. Morris, F. Lupu, S. R. Coughlin, R. P. McEver, H. Chen, M. L. Kahn and L. Xia (2013). "Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2." Nature **502**(7469): 105-109.

Hess, P. R., D. R. Rawnsley, Z. Jakus, Y. Yang, D. T. Sweet, J. Fu, B. Herzog, M. Lu, B. Nieswandt, G. Oliver, T. Makinen, L. Xia and M. L. Kahn (2014). "Platelets mediate lymphovenous hemostasis to maintain blood-lymphatic separation throughout life." J Clin Invest **124**(1): 273-284.

Hidalgo, A., J. Chang, J. E. Jang, A. J. Peired, E. Y. Chiang and P. S. Frenette (2009). "Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury." Nat Med **15**(4): 384-391.

Hillgruber, C., B. Pöppelmann, C. Weishaupt, A. K. Steingraber, F. Wessel, W. E. Berdel, J. E. Gessner, B. Ho-Tin-Noé, D. Vestweber and T. Goerge (2015). "Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia." The Journal of Experimental Medicine.

Hirahashi, J., K. Hishikawa, S. Kaname, N. Tsuboi, Y. Wang, D. I. Simon, G. Stavrakis, T. Shimosawa, L. Xiao, Y. Nagahama, K. Suzuki, T. Fujita and T. N. Mayadas (2009). "Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury." Circulation **120**(13): 1255-1265.

Hitchcock, J. R., C. N. Cook, S. Bobat, E. A. Ross, A. Flores-Langarica, K. L. Lowe, M. Khan, C. C. Dominguez-Medina, S. Lax, M. Carvalho-Gaspar, S. Hubscher, G. E. Rainger, M. Cobbold, C. D. Buckley, T. J. Mitchell, A. Mitchell, N. D. Jones, N. Van Rooijen, D. Kirchhofer, I. R. Henderson, D. H. Adams, S. P. Watson and A. F. Cunningham (2015). "Inflammation drives thrombosis after Salmonella infection via CLEC-2 on platelets." J Clin Invest **125**(12): 4429-4446.

- Ho-Tin-Noe, B., C. Carbo, M. Demers, S. M. Cifuni, T. Goerge and D. D. Wagner (2009). "Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia." Am J Pathol **175**(4): 1699-1708.
- Ho-Tin-Noe, B., T. Goerge, S. M. Cifuni, D. Duerschmied and D. D. Wagner (2008). "Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage." Cancer Res **68**(16): 6851-6858.
- Ho-Tin-Noe, B., T. Goerge and D. D. Wagner (2009). "Platelets: guardians of tumor vasculature." Cancer Res **69**(14): 5623-5626.
- Horii, K., M. L. Kahn and A. B. Herr (2006). "Structural basis for platelet collagen responses by the immune-type receptor glycoprotein VI." Blood **108**(3): 936-942.
- Hou, T. Z., J. Bystrom, J. P. Sherlock, O. Qureshi, S. M. Parnell, G. Anderson, D. W. Gilroy and C. D. Buckley (2010). "A distinct subset of podoplanin (gp38) expressing F4/80+ macrophages mediate phagocytosis and are induced following zymosan peritonitis." FEBS Lett **584**(18): 3955-3961.
- Houston, D. S., J. T. Shepherd and P. M. Vanhoutte (1986). "Aggregating human platelets cause direct contraction and endothelium-dependent relaxation of isolated canine coronary arteries. Role of serotonin, thromboxane A₂, and adenine nucleotides." J Clin Invest **78**(2): 539-544.
- Hudson, B. G., S. T. Reeders and K. Tryggvason (1993). "Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis." J Biol Chem **268**(35): 26033-26036.
- Hwa, C. and W. C. Aird (2007). "The history of the capillary wall: doctors, discoveries, and debates." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(5): H2667-2679.
- Igarashi, Y. and Y. Yatomi (1998). "Sphingosine 1-phosphate is a blood constituent released from activated platelets, possibly playing a variety of physiological and pathophysiological roles." Acta Biochim Pol **45**(2): 299-309.
- 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.
- Ishida, F., K. Furihata, K. Ishida, J. Yan, K. Kitano, K. Kiyosawa and S. Furuta (1995). "The largest variant of platelet glycoprotein Ib alpha has four tandem repeats of 13 amino acids in the macroglycopeptide region and a genetic linkage with methionine145." Blood **86**(4): 1357-1360.
- Ishikawa, M., D. Cooper, T. V. Arumugam, J. H. Zhang, A. Nanda and D. N. Granger (2004). "Platelet-leukocyte-endothelial cell interactions after middle cerebral artery occlusion and reperfusion." J Cereb Blood Flow Metab **24**(8): 907-915.
- Italiano, J. E., Jr. and E. M. Battinelli (2009). "Selective sorting of alpha-granule proteins." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 173-176.
- Italiano, J. E., Jr., J. L. Richardson, S. Patel-Hett, E. Battinelli, A. Zaslavsky, S. Short, S. Ryeom, J. Folkman and G. L. Klement (2008). "Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released." Blood **111**(3): 1227-1233.
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker and C. R. Minick (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." J Clin Invest **52**(11): 2745-2756.

- Jain, S., M. Zuka, J. Liu, S. Russell, J. Dent, J. A. Guerrero, J. Forsyth, B. Maruszak, T. K. Gartner, B. Felding-Habermann and J. Ware (2007). "Platelet glycoprotein Iba supports experimental lung metastasis." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(21): 9024-9028.
- Jancinova, V., K. Drabikova, R. Nosal and E. Danihelova (2000). "Platelet-dependent modulation of polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence." Platelets **11**(5): 278-285.
- Jandrot-Perrus, M., S. Busfield, A.-H. Lagrue, X. Xiong, N. Debili, T. Chickering, J.-P. L. Couedic, A. Goodearl, B. Dussault, C. Fraser, W. Vainchenker and J.-L. Villeval (2000). "Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily." Blood **96**(5): 1798-1807.
- Jandrot-Perrus, M., A. H. Lagrue, M. Okuma and C. Bon (1997). "Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1." J Biol Chem **272**(43): 27035-27041.
- Jarvis, G. E., B. T. Atkinson, D. C. Snell and S. P. Watson (2002). "Distinct roles of GPVI and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens." Br J Pharmacol **137**(1): 107-117.
- Jiang, P. and M. Jandrot-Perrus (2014). "New advances in treating thrombotic diseases: GPVI as a platelet drug target." Drug Discov Today **19**(9): 1471-1475.
- Jirouskova, M., A. S. Shet and G. J. Johnson (2007). "A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations." J Thromb Haemost **5**(4): 661-669.
- Jones, C. I., N. E. Barrett, L. A. Moraes, J. M. Gibbins and D. E. Jackson (2012). "Endogenous inhibitory mechanisms and the regulation of platelet function." Methods Mol Biol **788**: 341-366.
- Jonnalagadda, D., L. T. Izu and S. W. Whiteheart (2012). "Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner." Blood **120**(26): 5209-5216.
- Joutsu-Korhonen, L., P. A. Smethurst, A. Rankin, E. Gray, I. J. M, C. M. Onley, N. A. Watkins, L. M. Williamson, A. H. Goodall, P. G. de Groot, R. W. Farndale and W. H. Ouwehand (2003). "The low-frequency allele of the platelet collagen signaling receptor glycoprotein VI is associated with reduced functional responses and expression." Blood **101**(11): 4372-4379.
- Jung, S. M., Y. Takemura, Y. Imamura, T. Hayashi, E. Adachi and M. Moroi (2008). "Collagen-type specificity of glycoprotein VI as a determinant of platelet adhesion." Platelets **19**(1): 32-42.
- Jung, S. M., K. Tsuji and M. Moroi (2009). "Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs." J Thromb Haemost **7**(8): 1347-1355.
- Kaczmarek, E., K. Koziak, J. Sevigny, J. B. Siegel, J. Anrather, A. R. Beaudoin, F. H. Bach and S. C. Robson (1996). "Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase." J Biol Chem **271**(51): 33116-33122.
- Kalluri, R. (2003). "Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis." Nat Rev Cancer **3**(6): 422-433.
- Kalupov, T., M. Brillard-Bourdet, S. Dade, H. Serrano, J. Wartelle, N. Guyot, L. Juliano, T. Moreau, A. Belaouaj and F. Gauthier (2009). "Structural characterization of mouse neutrophil serine proteases and identification of their substrate specificities: relevance to mouse models of human inflammatory diseases." J Biol Chem **284**(49): 34084-34091.

- Kamykowski, J., P. Carlton, S. Sehgal and B. Storrie (2011). "Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet α -granules." Blood **118**(5): 1370-1373.
- Kanaji, T., S. Russell and J. Ware (2002). "Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome." Blood **100**(6): 2102-2107.
- Karshovska, E., C. Weber and P. von Hundelshausen (2013). "Platelet chemokines in health and disease." Thromb Haemost **110**(5): 894-902.
- Kasirer-Friede, A., M. L. Kahn and S. J. Shattil (2007). "Platelet integrins and immunoreceptors." Immunol Rev **218**: 247-264.
- Kaushansky, K. (2005). "The molecular mechanisms that control thrombopoiesis." J Clin Invest **115**(12): 3339-3347.
- Kefalides, N. A. (1969). "The chemistry and structure of basement membranes." Arthritis Rheum **12**(4): 427-443.
- Kehrel, B. (1995). "Platelet-collagen interactions." Semin Thromb Hemost **21**(2): 123-129.
- Kisucka, J., C. E. Butterfield, D. G. Duda, S. C. Eichenberger, S. Saffaripour, J. Ware, Z. M. Ruggeri, R. K. Jain, J. Folkman and D. D. Wagner (2006). "Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(4): 855-860.
- Kitchens, C. S. and J. F. Pendergast (1986). "Human thrombocytopenia is associated with structural abnormalities of the endothelium that are ameliorated by glucocorticosteroid administration." Blood **67**(1): 203-206.
- Kitchens, C. S. and L. Weiss (1975). "Ultrastructural changes of endothelium associated with thrombocytopenia." Blood **46**(4): 567-578.
- 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.
- Kolaczowska, E., W. Grzybek, N. van Rooijen, H. Piccard, B. Plytycz, B. Arnold and G. Opdenakker (2009). "Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis." J Leukoc Biol **85**(3): 374-381.
- Kontinen, Y. T., T. F. Li, J. Mandelin, M. Liljestrom, T. Sorsa, S. Santavirta and I. Virtanen (2000). "Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium." Arthritis Rheum **43**(2): 275-280.
- Korkmaz, B., M. S. Horwitz, D. E. Jenne and F. Gauthier (2010). "Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases." Pharmacol Rev **62**(4): 726-759.
- Koupenova, M., O. Vitseva, C. R. MacKay, L. M. Beaulieu, E. J. Benjamin, E. Mick, E. A. Kurt-Jones, K. Ravid and J. E. Freedman (2014). "Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis." Blood **124**(5): 791-802.
- Kraft, P., M. K. Schuhmann, F. Fluri, K. Lorenz, A. Zerneck, G. Stoll, B. Nieswandt and C. Kleinschnitz (2015). "Efficacy and Safety of Platelet Glycoprotein Receptor Blockade in Aged and Comorbid Mice With Acute Experimental Stroke." Stroke **46**(12): 3502-3506.

- Kubes, P. (2016). "The versatile platelet contributes to inflammation, infection, hemostasis, coagulation and cancer." Semin Immunol **28**(6): 535.
- Kuijpers, R. W., N. M. Faber, H. T. Cuypers, W. H. Ouwehand and A. E. von dem Borne (1992). "NH₂-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib alpha has a methionine 145/threonine145 amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens." J Clin Invest **89**(2): 381-384.
- Kuijpers, R. W., W. H. Ouwehand, P. M. Bleeker, D. Christie and A. E. von dem Borne (1992). "Localization of the platelet-specific HPA-2 (Ko) alloantigens on the N-terminal globular fragment of platelet glycoprotein Ib alpha." Blood **79**(1): 283-288.
- Kulkarni, S., K. J. Woollard, S. Thomas, D. Oxley and S. P. Jackson (2007). "Conversion of platelets from a proaggregatory to a proinflammatory adhesive phenotype: role of PAF in spatially regulating neutrophil adhesion and spreading." Blood **110**(6): 1879-1886.
- Kumasaka, T., N. A. Doyle, W. M. Quinlan, L. Graham and C. M. Doerschuk (1996). "Role of CD 11/CD 18 in neutrophil emigration during acute and recurrent *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in rabbits." Am J Pathol **148**(4): 1297-1305.
- Labelle, M., S. Begum and R. O. Hynes (2014). "Platelets guide the formation of early metastatic niches." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(30): E3053-3061.
- Lacorre, D. A., E. S. Baekkevold, I. Garrido, P. Brandtzaeg, G. Haraldsen, F. Amalric and J. P. Girard (2004). "Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment." Blood **103**(11): 4164-4172.
- Lanza, F. G., C.; David, T.; Mangin, P. (2008). "Signalisation via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire." Hématologie **14**(4): 273-284.
- Lauterbach, M., P. O'Donnell, K. Asano and T. N. Mayadas (2008). "Role of TNF priming and adhesion molecules in neutrophil recruitment to intravascular immune complexes." J Leukoc Biol **83**(6): 1423-1430.
- Le Cabec, V., J. B. Cowland, J. Calafat and N. Borregaard (1996). "Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6454-6457.
- Lecut, C., L. A. Feeney, G. Kingsbury, J. Hopkins, F. Lanza, C. Gachet, J. L. Villeval and M. Jandrot-Perrus (2003). "Human platelet glycoprotein VI function is antagonized by monoclonal antibody-derived Fab fragments." Journal of Thrombosis and Haemostasis **1**(12): 2653-2662.
- Lerchenberger, M., B. Uhl, K. Stark, G. Zuchriegel, A. Eckart, M. Miller, D. Pühr-Westerheide, M. Praetner, M. Rehberg, A. G. Khandoga, K. Lauber, S. Massberg, F. Krombach and C. A. Reichel (2013). "Matrix metalloproteinases modulate ameboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue." Blood **122**(5): 770-780.
- Levin, J., J. P. Peng, G. R. Baker, J. L. Villeval, P. Lecine, S. A. Burstein and R. A. Shivdasani (1999). "Pathophysiology of thrombocytopenia and anemia in mice lacking transcription factor NF-E2." Blood **94**(9): 3037-3047.
- Li, C., J. Li, Y. Li, S. Lang, I. Yougbare, G. Zhu, P. Chen and H. Ni (2012). "Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries." Adv Hematol **2012**: 384685.
- Li, J., K. Kim, A. Barazia, A. Tseng and J. Cho (2015). "Platelet-neutrophil interactions under thromboinflammatory conditions." Cell Mol Life Sci **72**(14): 2627-2643.

- Li, J. J., Y. Q. Huang, R. Basch and S. Karpatkin (2001). "Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets." Thromb Haemost **85**(2): 204-206.
- Liliensiek, S. J., P. Nealey and C. J. Murphy (2009). "Characterization of endothelial basement membrane nanotopography in rhesus macaque as a guide for vessel tissue engineering." Tissue Eng Part A **15**(9): 2643-2651.
- Liu, C., C. Wu, Q. Yang, J. Gao, L. Li, D. Yang and L. Luo (2016). "Macrophages Mediate the Repair of Brain Vascular Rupture through Direct Physical Adhesion and Mechanical Traction." Immunity **44**(5): 1162-1176.
- Lopez, J. A., E. H. Ludwig and B. J. McCarthy (1992). "Polymorphism of human glycoprotein Ib alpha results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. Structure/function implications." J Biol Chem **267**(14): 10055-10061.
- Loria, G. D., P. A. Romagnoli, N. B. Moseley, A. Rucavado and J. D. Altman (2013). "Platelets support a protective immune response to LCMV by preventing splenic necrosis." Blood **121**(6): 940-950.
- Losche, W., M. Dressel, S. Krause, H. Redlich, P. Spangenberg and S. Heptinstall (1996). "Contact-induced modulation of neutrophil elastase secretion and phagocytic activity by platelets." Blood Coagul Fibrinolysis **7**(2): 210-213.
- Lotti, T., I. Ghersetich, C. Comacchi and J. L. Jorizzo (1998). "Cutaneous small-vessel vasculitis." J Am Acad Dermatol **39**(5 Pt 1): 667-687; quiz 688-690.
- Lowe, K. L., L. Navarro-Nunez, C. Benezech, S. Nayar, B. L. Kingston, B. Nieswandt, F. Barone, S. P. Watson, C. D. Buckley and G. E. Desanti (2015). "The expression of mouse CLEC-2 on leucocyte subsets varies according to their anatomical location and inflammatory state." Eur J Immunol **45**(9): 2484-2493.
- Loyau, S., B. Dumont, V. Ollivier, Y. Boulaftali, L. Feldman, N. Ajzenberg and M. Jandrot-Perrus (2012). "Platelet glycoprotein VI dimerization, an active process inducing receptor competence, is an indicator of platelet reactivity." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(3): 778-785.
- Lussana, F., F. Di Marco, S. Terraneo, M. Parati, C. Razzari, M. Scavone, E. A. Femia, A. Moro, S. Centanni and M. Cattaneo (2015). "Effect of prasugrel in patients with asthma: results of PRINA, a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study." J Thromb Haemost **13**(1): 136-141.
- Majno, G. and G. E. Palade (1961). "Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study." J Biophys Biochem Cytol **11**: 571-605.
- Mammadova-Bach, E., V. Ollivier, S. Loyau, M. Schaff, B. Dumont, R. Favier, G. Freyburger, V. Latger-Cannard, B. Nieswandt, C. Gachet, P. H. Mangin and M. Jandrot-Perrus (2015). "Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation." **126**(5): 683-691.
- 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.
- Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini and S. Jaillon (2011). "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **11**(8): 519-531.
- Manz, M. G. and S. Boettcher (2014). "Emergency granulopoiesis." Nat Rev Immunol **14**(5): 302-314.
- Marcus, A. J., M. J. Broekman, J. H. Drosopoulos, N. Islam, T. N. Alyonycheva, L. B. Safier, K. A. Hajjar, D. N. Posnett, M. A. Schoenborn, K. A. Schooley, R. B. Gayle and C. R. Maliszewski (1997).

"The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39." J Clin Invest **99**(6): 1351-1360.

Marcus, A. J., L. B. Safier, K. A. Hajjar, H. L. Ullman, N. Islam, M. J. Broekman and A. M. Eiroa (1991). "Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells." J Clin Invest **88**(5): 1690-1696.

Masini, E., M. G. Di Bello, S. Raspanti, T. B. Sacchi, E. Maggi and P. F. Mannaioni (1994). "Platelet aggregation and histamine release by immunological stimuli." Immunopharmacology **28**(1): 19-29.

Mayadas, T. N., X. Cullere and C. A. Lowell (2014). "The multifaceted functions of neutrophils." Annu Rev Pathol **9**: 181-218.

Mayadas, T. N., R. C. Johnson, H. Rayburn, R. O. Hynes and D. D. Wagner (1993). "Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice." Cell **74**(3): 541-554.

Mayadas, T. N., G. C. Tsokos and N. Tsuboi (2009). "Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury." Circulation **120**(20): 2012-2024.

Mazzarello, P., A. L. Calligaro and A. Calligaro (2001). "Giulio Bizzozero: a pioneer of cell biology." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 776-781.

McDonald, B., R. Urrutia, B. G. Yipp, C. N. Jenne and P. Kubes (2012). "Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis." Cell Host Microbe **12**(3): 324-333.

McGarrity, S. T., T. M. Hyers and R. O. Webster (1988). "Inhibition of neutrophil functions by platelets and platelet-derived products: description of multiple inhibitory properties." J Leukoc Biol **44**(2): 93-100.

McKenzie, S. E., S. M. Taylor, P. Malladi, H. Yuhan, D. L. Cassel, P. Chien, E. Schwartz, A. D. Schreiber, S. Surrey and M. P. Reilly (1999). "The role of the human Fc receptor Fc gamma RIIA in the immune clearance of platelets: a transgenic mouse model." J Immunol **162**(7): 4311-4318.

Meen, A. J., I. Oynebraten, T. M. Reine, A. Duelli, K. Svennevig, G. Pejler, T. Jenssen and S. O. Kolset (2011). "Serglycin is a major proteoglycan in polarized human endothelial cells and is implicated in the secretion of the chemokine GROalpha/CXCL1." J Biol Chem **286**(4): 2636-2647.

Meng, R., J. Wu, D. C. Harper, Y. Wang, M. A. Kowalska, C. S. Abrams, L. F. Brass, M. Poncz, T. J. Stalker and M. S. Marks (2015). "Defective release of alpha granule and lysosome contents from platelets in mouse Hermansky-Pudlak syndrome models." Blood **125**(10): 1623-1632.

Mestas, J. and C. C. Hughes (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." J Immunol **172**(5): 2731-2738.

Miner, J. H. (2011). "Organogenesis of the kidney glomerulus: Focus on the glomerular basement membrane." Organogenesis **7**(2): 75-82.

Minnear, F. L., S. Patil, D. Bell, J. P. Gainor and C. A. Morton (2001). "Platelet lipid(s) bound to albumin increases endothelial electrical resistance: mimicked by LPA." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(6): L1337-1344.

Miura, Y., T. Takahashi, S. M. Jung and M. Moroi (2002). "Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen." J Biol Chem **277**(48): 46197-46204.

- Miyasaka, M. and T. Tanaka (2004). "Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas." Nat Rev Immunol **4**(5): 360-370.
- Monboisse, J. C., G. Bellon, J. Dufer, A. Randoux and J. P. Borel (1987). "Collagen activates superoxide anion production by human polymorphonuclear neutrophils." Biochem J **246**(3): 599-603.
- Montrucchio, G., O. Bosco, L. Del Sorbo, P. Fascio Pecetto, E. Lupia, A. Goffi, P. Omede, G. Emanuelli and G. Camussi (2003). "Mechanisms of the priming effect of low doses of lipopoly-saccharides on leukocyte-dependent platelet aggregation in whole blood." Thromb Haemost **90**(5): 872-881.
- Mori, J., A. C. Pearce, J. C. Spalton, B. Grygielska, J. A. Eble, M. G. Tomlinson, Y. A. Senis and S. P. Watson (2008). "G6b-B inhibits constitutive and agonist-induced signaling by glycoprotein VI and CLEC-2." J Biol Chem **283**(51): 35419-35427.
- Moroi, M., S. M. Jung and N. Yoshida (1984). "Genetic polymorphism of platelet glycoprotein Ib." Blood **64**(3): 622-629.
- Morrell, C. N., A. A. Aggrey, L. M. Chapman and K. L. Modjeski (2014). "Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells." Blood **123**(18): 2759-2767.
- Muckian, C., A. Hillmann, D. Kenny and D. C. Shields (2000). "A novel variant of the platelet glycoprotein Ibalphamacroglycopeptide region lacks any copies of the "perfect" 13 amino acid repeat." Thromb Haemost **83**(3): 513-514.
- Mulligan, M. S., G. P. Wilson, R. F. Todd, C. W. Smith, D. C. Anderson, J. Varani, T. B. Issekutz, M. Miyasaka, T. Tamatani and et al. (1993). "Role of beta 1, beta 2 integrins and ICAM-1 in lung injury after deposition of IgG and IgA immune complexes." J Immunol **150**(6): 2407-2417.
- Mumford, A. D., A. L. Frelinger, 3rd, C. Gachet, P. Gresele, P. Noris, P. Harrison and D. Mezzano (2015). "A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders." Thromb Haemost **114**(1): 14-25.
- Mustard, J. F., H. C. Rowsell and E. A. Murphy (1966). "Platelet economy (platelet survival and turnover)." Br J Haematol **12**(1): 1-24.
- Nachman, R. L. and E. A. Jaffe (2004). "Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology." J Clin Invest **114**(8): 1037-1040.
- Nakamura-Ishizu, A., K. Takubo, M. Fujioka and T. Suda (2014). "Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin." Biochem Biophys Res Commun **454**(2): 353-357.
- Nakamura-Ishizu, A., K. Takubo, H. Kobayashi, K. Suzuki-Inoue and T. Suda (2015). "CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow." J Exp Med **212**(12): 2133-2146.
- Nathan, C. (2002). "Points of control in inflammation." Nature **420**(6917): 846-852.
- Navarro-Nunez, L., S. A. Langan, G. B. Nash and S. P. Watson (2013). "The physiological and pathophysiological roles of platelet CLEC-2." Thromb Haemost **109**(6): 991-998.
- Newland, S. A., I. C. Macaulay, A. R. Floto, E. C. de Vet, W. H. Ouwehand, N. A. Watkins, P. A. Lyons and D. R. Campbell (2007). "The novel inhibitory receptor G6B is expressed on the surface of platelets and attenuates platelet function in vitro." Blood **109**(11): 4806-4809.

- Ni, H., C. V. Denis, S. Subbarao, J. L. Degen, T. N. Sato, R. O. Hynes and D. D. Wagner (2000). "Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen." J Clin Invest **106**(3): 385-392.
- Nieswandt, B., W. Bergmeier, K. Rackebrandt, J. E. Gessner and H. Zirngibl (2000). "Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice." Blood **96**(7): 2520-2527.
- 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." Emboj **20**(9): 2120-2130.
- Nieswandt, B., V. Schulte, W. Bergmeier, R. Mokhtari-Nejad, K. Rackebrandt, J. P. Cazenave, P. Ohlmann, C. Gachet and H. Zirngibl (2001). "Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice." J Exp Med **193**(4): 459-469.
- Nieswandt, B., D. Varga-Szabo and M. Elvers (2009). "Integrins in platelet activation." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 206-209.
- Nieuwenhuis, H. K., J. W. Akkerman, W. P. Houdijk and J. J. Sixma (1985). "Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia." Nature **318**(6045): 470-472.
- Nourshargh, S. and R. Alon (2014). "Leukocyte migration into inflamed tissues." Immunity **41**(5): 694-707.
- Nourshargh, S., P. L. Hordijk and M. Sixt (2010). "Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(5): 366-378.
- Nurden, A. T. (2011). "Platelets, inflammation and tissue regeneration." Thromb Haemost **105 Suppl 1**: S13-33.
- Nurden, A. T. and J. P. Caen (1975). "Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function." Nature **255**(5511): 720-722.
- Nurden, A. T., K. Freson and U. Seligsohn (2012). "Inherited platelet disorders." Haemophilia **18 Suppl 4**: 154-160.
- Nurden, A. T. and P. Nurden (2016). "Should any genetic defect affecting alpha-granules in platelets be classified as gray platelet syndrome?" Am J Hematol **91**(7): 714-718.
- Nuyttens, B. P., T. Thijs, H. Deckmyn and K. Broos (2011). "Platelet adhesion to collagen." Thromb Res **127 Suppl 2**: S26-29.
- Oh, J., R. Takahashi, S. Kondo, A. Mizoguchi, E. Adachi, R. M. Sasahara, S. Nishimura, Y. Imamura, H. Kitayama, D. B. Alexander, C. Ide, T. P. Horan, T. Arakawa, H. Yoshida, S. Nishikawa, Y. Itoh, M. Seiki, S. Itoharu, C. Takahashi and M. Noda (2001). "The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis." Cell **107**(6): 789-800.
- Ollivier, V., B. Arnaud, M. Jandrot-Perrus and N. Ajzenberg (2009). "Monocytes downregulate the early stage of collagen-induced platelet activation by a PECAM-1-dependent mechanism." J Thromb Haemost **7**(1): 143-151.

- Ollivier, V., V. Syvannarath, A. Gros, A. Butt, S. Loyau, M. Jandrot-Perrus and B. Ho-Tin-Noe (2014). "Collagen can selectively trigger a platelet secretory phenotype via glycoprotein VI." PLoS One **9**(8): e104712.
- Owen, C. A. (2008). "Leukocyte cell surface proteinases: regulation of expression, functions, and mechanisms of surface localization." Int J Biochem Cell Biol **40**(6-7): 1246-1272.
- Ozaki, Y., K. Suzuki-Inoue and O. Inoue (2013). "Platelet receptors activated via multimerization: glycoprotein VI, GPIb-IX-V, and CLEC-2." J Thromb Haemost **11 Suppl 1**: 330-339.
- Ozelo, M. C., D. S. Costa, L. H. Siqueira, T. M. Machado, V. Castro, M. S. Goncalves, R. C. Menezes, M. Soares, J. M. Annichino-Bizzacchi, F. F. Costa and V. R. Arruda (2004). "Genetic variability of platelet glycoprotein Ibalpha gene." Am J Hematol **77**(2): 107-116.
- Pachel, C., D. Mathes, A. P. Arias-Loza, W. Heitzmann, P. Nordbeck, C. Deppermann, V. Lorenz, U. Hofmann, B. Nieswandt and S. Frantz (2016). "Inhibition of Platelet GPVI Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury." Arterioscler Thromb Vasc Biol **36**(4): 629-635.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald and Z. Werb (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 221-233.
- Parks, W. C., C. L. Wilson and Y. S. Lopez-Boado (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." Nat Rev Immunol **4**(8): 617-629.
- Patil, S., D. K. Newman and P. J. Newman (2001). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen." Blood **97**(6): 1727-1732.
- Paty, P. S., P. F. Sherman, J. M. Shepard, A. B. Malik and J. E. Kaplan (1992). "Role of adenosine in platelet-mediated reduction in pulmonary vascular permeability." Am J Physiol **262**(3 Pt 2): H771-777.
- Paul, W. E. (2013). Fundamental Immunology (7th edition).
- Pavelka, M. R., J. (2004). Functional Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology Springer.
- Payne, H., T. Ponomaryov, S. P. Watson and A. Brill (2017). "Mice with a deficiency in CLEC-2 are protected against deep vein thrombosis." Blood **129**(14): 2013-2020.
- Peng, X., S. Ramstrom, T. Kurz, M. Grenegard and M. Segelmark (2014). "The neutrophil serine protease PR3 induces shape change of platelets via the Rho/Rho kinase and Ca(2+) signaling pathways." Thromb Res **134**(2): 418-425.
- Pennings, G. J., A. S. Yong, C. Wong, M. Al-Tamimi, E. E. Gardiner, R. K. Andrews and L. Kritharides (2014). "Circulating levels of soluble EMMPRIN (CD147) correlate with levels of soluble glycoprotein VI in human plasma." Platelets **25**(8): 639-642.
- Perretti, M., X. Leroy, E. J. Bland and T. Montero-Melendez (2015). "Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation." Trends Pharmacol Sci **36**(11): 737-755.
- Pertuy, F., A. Eckly, J. Weber, F. Proamer, J. Y. Rinckel, F. Lanza, C. Gachet and C. Leon (2014). "Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets." Blood **123**(8): 1261-1269.
- Peters, A., L. A. Pitcher, J. M. Sullivan, M. Mitsdoerffer, S. E. Acton, B. Franz, K. Wucherpfennig, S. Turley, M. C. Carroll, R. A. Sobel, E. Bettelli and V. K. Kuchroo (2011). "Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation." Immunity **35**(6): 986-996.

- Phillipson, M., B. Heit, P. Colarusso, L. Liu, C. M. Ballantyne and P. Kubes (2006). "Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade." J Exp Med **203**(12): 2569-2575.
- Pidard, D., P. Renesto, M. C. Berndt, S. Rabhi, K. J. Clemetson and M. Chignard (1994(a)). "Neutrophil proteinase cathepsin G is proteolytically active on the human platelet glycoprotein Ib-IX receptor: characterization of the cleavage sites within the glycoprotein Ib alpha subunit." Biochem J **303** (Pt 2): 489-498.
- Pidard, D., P. Renesto, S. Rabhi and M. Chignard (1994(b)). "Regulation of the structure and activity of platelet adhesion receptors by leukocyte proteinases." Nouv Rev Fr Hematol **36 Suppl 1**: S99-101.
- Pitchford, S. C. (2007). "Novel uses for anti-platelet agents as anti-inflammatory drugs." British Journal of Pharmacology **152**(7): 987-1002.
- Pober, J. S. and W. C. Sessa (2007). "Evolving functions of endothelial cells in inflammation." Nat Rev Immunol **7**(10): 803-815.
- Polgar, J., J. M. Clemetson, B. E. Kehrel, M. Wiedemann, E. M. Magnenat, T. N. Wells and K. J. Clemetson (1997). "Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor." J Biol Chem **272**(21): 13576-13583.
- Poole, A., J. M. Gibbins, M. Turner, M. J. van Vugt, J. G. van de Winkel, T. Saito, V. L. Tybulewicz and S. P. Watson (1997). "The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen." Embo j **16**(9): 2333-2341.
- Poschl, E., U. Schlotzer-Schrehardt, B. Brachvogel, K. Saito, Y. Ninomiya and U. Mayer (2004). "Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development." Development **131**(7): 1619-1628.
- Privratsky, J. R., D. K. Newman and P. J. Newman (2010). "PECAM-1: conflicts of interest in inflammation." Life Sci **87**(3-4): 69-82.
- Proebstl, D., M. B. Voisin, A. Woodfin, J. Whiteford, F. D'Acquisto, G. E. Jones, D. Rowe and S. Nourshargh (2012). "Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo." J Exp Med **209**(6): 1219-1234.
- Pugh, N., A. M. C. Simpson, P. A. Smethurst, P. G. de Groot, N. Raynal and R. W. Farndale (2010). "Synergism between platelet collagen receptors defined using receptor-specific collagen-mimetic peptide substrata in flowing blood." Blood **115**(24): 5069-5079.
- Qiao, J., M. Al-Tamimi, R. I. Baker, R. K. Andrews and E. E. Gardiner (2015). "The platelet Fc receptor, FcgammaRIIa." Immunol Rev **268**(1): 241-252.
- Qin, L., W. M. Quinlan, N. A. Doyle, L. Graham, J. E. Sligh, F. Takei, A. L. Beaudet and C. M. Doerschuk (1996). "The roles of CD11/CD18 and ICAM-1 in acute *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in mice." J Immunol **157**(11): 5016-5021.
- Quinn, M., M. Ammons and F. Deleo (2006). "The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction." Clinical Science **111**(1): 1-20.
- Ransohoff, R. M. and B. Engelhardt (2012). "The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system." Nat Rev Immunol **12**(9): 623-635.

Rayes, J., S. Lax, A. Gros, S. Wichaiyo, S. Jadoui, V. Ollivier, M. Jandrot-Perrus, S. Watson and B. Ho-Tin-Noé (2017, en révision). "The contribution of platelet GPVI and CLEC-2 to vascular integrity during inflammation is stimulus and organ dependent."

Rayes, J. and S. P. Watson (2015). "Platelet GPVI repairs its own damage." Blood **126**(8): 933-934.

Reglero-Real, N., B. Colom, J. V. Bodkin and S. Nourshargh (2016). "Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules: Role and Regulation of Expression in Inflammation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **36**(10): 2048-2057.

Ren, Q., C. Wimmer, M. C. Chicka, S. Ye, Y. Ren, F. M. Hughson and S. W. Whiteheart (2010). "Munc13-4 is a limiting factor in the pathway required for platelet granule release and hemostasis." Blood **116**(6): 869-877.

Ren, Q., S. Ye and S. W. Whiteheart (2008). "The platelet release reaction: just when you thought platelet secretion was simple." Curr Opin Hematol **15**(5): 537-541.

Renesto, P. and M. Chignard (1995). "Neutrophil-mediated platelet activation: a key role for serine proteinases." Gen Pharmacol **26**(5): 905-910.

Renesto, P., M. Si-Tahar, M. Moniatte, V. Balloy, A. Van Dorselaer, D. Pidard and M. Chignard (1997). "Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor." Blood **89**(6): 1944-1953.

Reth, M. (1989). "Antigen receptor tail clue." Nature **338**(6214): 383-384.

Ricard-Blum, S. (2011). "The Collagen Family." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **3**(1).

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. López (1999). "The Glycoprotein Ib-IX-V Complex Is a Platelet Counterreceptor for P-Selectin." The Journal of Experimental Medicine **190**(6): 803-814.

Rondina, M. T. and O. Garraud (2014). "Emerging Evidence for Platelets as Immune and Inflammatory Effector Cells." Frontiers in Immunology **5**(653).

Sadoul, K. (2015). "New explanations for old observations: marginal band coiling during platelet activation." J Thromb Haemost **13**(3): 333-346.

Sandor, N., S. Lukacs, R. Ungai-Salanki, N. Orgovan, B. Szabo, R. Horvath, A. Erdei and Z. Bajtay (2016). "CD11c/CD18 Dominates Adhesion of Human Monocytes, Macrophages and Dendritic Cells over CD11b/CD18." PLoS One **11**(9): e0163120.

Savage, J. S., C. M. Williams, O. Konopatskaya, I. Hers, M. T. Harper and A. W. Poole (2013). "Munc13-4 is critical for thrombosis through regulating release of ADP from platelets." Journal of Thrombosis and Haemostasis **11**(4): 771-775.

Savill, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson and C. Haslett (1989). "Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages." J Clin Invest **83**(3): 865-875.

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 $\alpha\text{6}\beta\text{1}$ is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis." Circulation **128**(5): 541-552.

- Schaphorst, K. L., E. Chiang, K. N. Jacobs, A. Zaiman, V. Natarajan, F. Wigley and J. G. Garcia (2003). "Role of sphingosine-1 phosphate in the enhancement of endothelial barrier integrity by platelet-released products." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(1): L258-267.
- Schmitt, A., J. Guichard, J.-M. Massé, N. Debili and E. M. Cramer (2001). "Of mice and men: Comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets." Experimental Hematology **29**(11): 1295-1302.
- Schrotmaier, W. C., J. B. Kral, M. Zeitlinger, M. Salzmann, B. Gilma and A. Assinger (2016). "Platelet activation at the onset of human endotoxemia is undetectable in vivo." Platelets **27**(5): 479-483.
- Schuhmann, M. K., J. Guthmann, G. Stoll, B. Nieswandt, P. Kraft and C. Kleinschnitz (2017). "Blocking of platelet glycoprotein receptor Ib reduces "thrombo-inflammation" in mice with acute ischemic stroke." J Neuroinflammation **14**(1): 18.
- Schulte, D., V. Kuppers, N. Dartsch, A. Broermann, H. Li, A. Zarbock, O. Kamenyeva, F. Kiefer, A. Khandoga, S. Massberg and D. Vestweber (2011). "Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability." EMBO J **30**(20): 4157-4170.
- Schulz, C., M. L. von Bruhl, V. Barocke, P. Cullen, K. Mayer, R. Okrojek, A. Steinhart, Z. Ahmad, E. Kremmer, B. Nieswandt, J. Frampton, S. Massberg and R. Schmidt (2011). "EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall." J Thromb Haemost **9**(5): 1007-1019.
- Schwiebert, L. M., W. C. Rice, B. A. Kudlow, A. L. Taylor and E. M. Schwiebert (2002). "Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells." American Journal of Physiology - Cell Physiology **282**(2): C289-C301.
- Sehgal, S. and B. Storrie (2007). "Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release." J Thromb Haemost **5**(10): 2009-2016.
- Seizer, P., O. Borst, H. F. Langer, A. Bultmann, G. Munch, Y. Herouy, K. Stellos, B. Kramer, B. Bigalke, B. Buchele, M. G. Bachem, D. Vestweber, T. Simmet, M. Gawaz and A. E. May (2009). "EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction." Thromb Haemost **101**(4): 682-686.
- Seizer, P. and A. E. May (2013). "Platelets and matrix metalloproteinases." Thromb Haemost **110**(5): 903-909.
- Semple, J. W., J. E. Italiano, Jr. and J. Freedman (2011). "Platelets and the immune continuum." Nat Rev Immunol **11**(4): 264-274.
- Senaldi, G. and P. F. Piguet (1997). "Platelets play a role in the pathogenesis of the irritant reaction in mice." J Invest Dermatol **108**(3): 248-252.
- Senis, Y. A., A. Mazharian and J. Mori (2014). "Src family kinases: at the forefront of platelet activation." Blood **124**(13): 2013-2024.
- Senis, Y. A., M. G. Tomlinson, A. Garcia, S. Dumon, V. L. Heath, J. Herbert, S. P. Cobbold, J. C. Spalton, S. Ayman, R. Antrobus, N. Zitzmann, R. Bicknell, J. Frampton, K. S. Authi, A. Martin, M. J. Wakelam and S. P. Watson (2007). "A comprehensive proteomics and genomics analysis reveals novel transmembrane proteins in human platelets and mouse megakaryocytes including G6b-B, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif protein." Mol Cell Proteomics **6**(3): 548-564.

- Serhan, C. N. and J. Savill (2005). "Resolution of inflammation: the beginning programs the end." Nat Immunol **6**(12): 1191-1197.
- Shashidharamurthy, R., R. A. Hennigar, S. Fuchs, P. Palaniswami, M. Sherman and P. Selvaraj (2008). "Extravasations and emigration of neutrophils to the inflammatory site depend on the interaction of immune-complex with Fc γ receptors and can be effectively blocked by decoy Fc γ receptors." Blood **111**(2): 894-904.
- Shepro, D., S. L. Welles and H. B. Hechtman (1984). "Vasoactive agonists prevent erythrocyte extravasation in thrombocytopenic hamsters." Thromb Res **35**(4): 421-430.
- Sheshachalam, A., N. Srivastava, T. Mitchell, P. Lacy and G. Eitzen (2014). "Granule Protein Processing and Regulated Secretion in Neutrophils." Frontiers in Immunology **5**.
- Si-Tahar, M., D. Pidard, V. Balloy, M. Moniatte, N. Kieffer, A. Van Dorsselaer and M. Chignard (1997). "Human neutrophil elastase proteolytically activates the platelet integrin α IIb β 3 through cleavage of the carboxyl terminus of the α IIb subunit heavy chain. Involvement in the potentiation of platelet aggregation." J Biol Chem **272**(17): 11636-11647.
- Sidibe, A. and B. A. Imhof (2014). "VE-cadherin phosphorylation decides: vascular permeability or diapedesis." Nat Immunol **15**(3): 215-217.
- Simon, D. I., Z. Chen, H. Xu, C. Q. Li, J. Dong, L. V. McIntire, C. M. Ballantyne, L. Zhang, M. I. Furman, M. C. Berndt and J. A. Lopez (2000). "Platelet glycoprotein α IIb is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)." J Exp Med **192**(2): 193-204.
- Simsek, S., P. M. Bleeker, C. E. van der Schoot and A. E. von dem Borne (1994). "Association of a variable number of tandem repeats (VNTR) in glycoprotein Ib α and HPA-2 alloantigens." Thromb Haemost **72**(5): 757-761.
- Siperstein, M. D., R. H. Unger and L. L. Madison (1968). "Studies of muscle capillary basement membranes in normal subjects, diabetic, and prediabetic patients." J Clin Invest **47**(9): 1973-1999.
- Smethurst, P. A., L. Joutsu-Korhonen, M. N. O'Connor, E. Wilson, N. S. Jennings, S. F. Garner, Y. Zhang, C. G. Knight, T. R. Dafforn, A. Buckle, I. J. MJ, P. G. De Groot, N. A. Watkins, R. W. Farndale and W. H. Ouwehand (2004). "Identification of the primary collagen-binding surface on human glycoprotein VI by site-directed mutagenesis and by a blocking phage antibody." Blood **103**(3): 903-911.
- Sonnenberg, A., P. W. Modderman and F. Hogervorst (1988). "Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6." Nature **336**(6198): 487-489.
- Sorokin, L. (2010). "The impact of the extracellular matrix on inflammation." Nat Rev Immunol **10**(10): 712-723.
- Soulet, C., B. Hechler, M. P. Gratacap, M. Plantavid, S. Offermanns, C. Gachet and B. Payrastre (2005). "A differential role of the platelet ADP receptors P2Y1 and P2Y12 in Rac activation." J Thromb Haemost **3**(10): 2296-2306.
- Spalton, J. C., J. Mori, A. Y. Pollitt, C. E. Hughes, J. A. Eble and S. P. Watson (2009). "The novel Syk inhibitor R406 reveals mechanistic differences in the initiation of GPVI and CLEC-2 signaling in platelets." J Thromb Haemost **7**(7): 1192-1199.
- Speth, C., G. Rambach, R. Wurzner, C. Lass-Flörl, H. Kozarcin, O. A. Hamad, B. Nilsson and K. N. Ekdahl (2015). "Complement and platelets: Mutual interference in the immune network." Mol Immunol **67**(1): 108-118.

- Sporn, L. A., V. J. Marder and D. D. Wagner (1989). "Differing polarity of the constitutive and regulated secretory pathways for von Willebrand factor in endothelial cells." J Cell Biol **108**(4): 1283-1289.
- Stark, K., A. Eckart, S. Haidari, A. Tirniceriu, M. Lorenz, M. L. von Bruhl, F. Gartner, A. G. Khandoga, K. R. Legate, R. Pless, I. Hepper, K. Lauber, B. Walzog and S. Massberg (2013). "Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs." Nat Immunol **14**(1): 41-51.
- Stefanini, L. and W. Bergmeier (2010). "CalDAG-GEFI and platelet activation." Platelets **21**(4): 239-243.
- Stefanini, L., D. S. Paul, R. F. Robledo, E. R. Chan, T. M. Getz, R. A. Campbell, D. O. Kechele, C. Casari, R. Piatt, K. M. Caron, N. Mackman, A. S. Weyrich, M. C. Parrott, Y. Boulaftali, M. D. Adams, L. L. Peters and W. Bergmeier (2015). "RASA3 is a critical inhibitor of RAP1-dependent platelet activation." J Clin Invest **125**(4): 1419-1432.
- Stegner, D., C. Deppermann, P. Kraft, M. Morowski, C. Kleinschnitz, G. Stoll and B. Nieswandt (2013). "Munc13-4-mediated secretion is essential for infarct progression but not intracranial hemostasis in acute stroke." Journal of Thrombosis and Haemostasis **11**(7): 1430-1433.
- Stegner, D., E. J. Haining and B. Nieswandt (2014). "Targeting Glycoprotein VI and the Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif Signaling Pathway." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **34**(8): 1615-1620.
- Stocker, T. J., H. Ishikawa-Ankerhold, S. Massberg and C. Schulz (2017). "Small but mighty: Platelets as central effectors of host defense." Thromb Haemost.
- Sugiyama, T., H. Kohara, M. Noda and T. Nagasawa (2006). "Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches." Immunity **25**(6): 977-988.
- 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.
- Suzuki-Inoue, K., G. L. Fuller, A. Garcia, J. A. Eble, S. Pohlmann, O. Inoue, T. K. Gartner, S. C. Hughan, A. C. Pearce, G. D. Laing, R. D. Theakston, E. Schweighoffer, N. Zitzmann, T. Morita, V. L. Tybulewicz, Y. Ozaki and S. P. Watson (2006). "A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2." Blood **107**(2): 542-549.
- Suzuki-Inoue, K., O. Inoue, G. Ding, S. Nishimura, K. Hokamura, K. Eto, H. Kashiwagi, Y. Tomiyama, Y. Yatomi, K. Umemura, Y. Shin, M. Hirashima and Y. Ozaki (2010). "Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets." J Biol Chem **285**(32): 24494-24507.
- Suzuki-Inoue, K., O. Inoue and Y. Ozaki (2011). "Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects." J Thromb Haemost **9 Suppl 1**: 44-55.
- Suzuki-Inoue, K., Y. Kato, O. Inoue, M. K. Kaneko, K. Mishima, Y. Yatomi, Y. Yamazaki, H. Narimatsu and Y. Ozaki (2007). "Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells." J Biol Chem **282**(36): 25993-26001.
- Suzuki-Inoue, K., D. Tulasne, Y. Shen, T. Bori-Sanz, O. Inoue, S. M. Jung, M. Moroi, R. K. Andrews, M. C. Berndt and S. P. Watson (2002). "Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling." J Biol Chem **277**(24): 21561-21566.

- Sylvestre, D. L. and J. V. Ravetch (1994). "Fc receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade." Science **265**(5175): 1095-1098.
- Takai, T., M. Li, D. Sylvestre, R. Clynes and J. V. Ravetch (1994). "FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects." Cell **76**(3): 519-529.
- Takei, H., A. Araki, H. Watanabe, A. Ichinose and F. Sendo (1996). "Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis." J Leukoc Biol **59**(2): 229-240.
- Tamura, S., K. Suzuki-Inoue, N. Tsukiji, T. Shirai, T. Sasaki, M. Osada, K. Satoh and Y. Ozaki (2016). "Podoplanin-positive periaarteriolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2." Blood **127**(13): 1701-1710.
- Thon, J. N. and J. E. Italiano (2012). "Platelets: production, morphology and ultrastructure." Handb Exp Pharmacol(210): 3-22.
- Thon, J. N., C. G. Peters, K. R. Machlus, R. Aslam, J. Rowley, H. Macleod, M. T. Devine, T. A. Fuchs, A. S. Weyrich, J. W. Semple, R. Flaumenhaft and J. E. Italiano, Jr. (2012). "T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling." J Cell Biol **198**(4): 561-574.
- Thurston, G., J. S. Rudge, E. Ioffe, H. Zhou, L. Ross, S. D. Croll, N. Glazer, J. Holash, D. M. McDonald and G. D. Yancopoulos (2000). "Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage." Nat Med **6**(4): 460-463.
- Tomlinson, M. G., S. D. Calaminus, O. Berlanga, J. M. Auger, T. Bori-Sanz, L. Meyaard and S. P. Watson (2007). "Collagen promotes sustained glycoprotein VI signaling in platelets and cell lines." J Thromb Haemost **5**(11): 2274-2283.
- Tsuji, M., Y. Ezumi, M. Arai and H. Takayama (1997). "A Novel Association of Fc Receptor γ -Chain with Glycoprotein VI and Their Co-expression as a Collagen Receptor in Human Platelets." Journal of Biological Chemistry **272**(38): 23528-23531.
- Uff, S., J. M. Clemetson, T. Harrison, K. J. Clemetson and J. Emsley (2002). "Crystal structure of the platelet glycoprotein Ib(alpha) N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation." J Biol Chem **277**(38): 35657-35663.
- Ulrichs, H., K. Vanhoorelbeke, S. Cauwenberghs, S. Vauterin, H. Kroll, S. Santoso and H. Deckmyn (2003). "Von Willebrand Factor But Not α -Thrombin Binding to Platelet Glycoprotein Ib α Is Influenced by the HPA-2 Polymorphism." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **23**(7): 1302-1307.
- Valles, J., M. T. Santos, A. J. Marcus, L. B. Safier, M. J. Broekman, N. Islam, H. L. Ullman and J. Aznar (1993). "Downregulation of human platelet reactivity by neutrophils. Participation of lipoxigenase derivatives and adhesive proteins." J Clin Invest **92**(3): 1357-1365.
- Vanhoutte, P. M. and D. S. Houston (1985). "Platelets, endothelium, and vasospasm." Circulation **72**(4): 728-734.
- Versteeg, H. H., J. W. Heemskerk, M. Levi and P. H. Reitsma (2013). "New fundamentals in hemostasis." Physiol Rev **93**(1): 327-358.
- Vestweber, D. (2015). "How leukocytes cross the vascular endothelium." Nat Rev Immunol **15**(11): 692-704.
- Vestweber, D., F. Wessel and A. F. Nottebaum (2014). "Similarities and differences in the regulation of leukocyte extravasation and vascular permeability." Semin Immunopathol **36**(2): 177-192.

- Veyradier, A. and P. Coppo (2011). "[ADAMTS13, von Willebrand factor specific cleaving protease]." Med Sci (Paris) **27**(12): 1097-1105.
- Vivier, E. and M. Daeron (1997). "Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs." Immunol Today **18**(6): 286-291.
- Voisin, M.-B., D. Pröbstl and S. Nourshargh (2010). "Venular Basement Membranes Ubiquitously Express Matrix Protein Low-Expression Regions: Characterization in Multiple Tissues and Remodeling during Inflammation." The American Journal of Pathology **176**(1): 482-495.
- Vyas, P., K. Ault, C. W. Jackson, S. H. Orkin and R. A. Shivdasani (1999). "Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets." Blood **93**(9): 2867-2875.
- Wagner, D. D. and P. S. Frenette (2008). "The vessel wall and its interactions." Blood **111**(11): 5271-5281.
- Wang, C. H., J. Y. Dai, L. Wang, J. F. Jia, Z. H. Zheng, J. Ding, Z. N. Chen and P. Zhu (2011). "Expression of CD147 (EMMPRIN) on neutrophils in rheumatoid arthritis enhances chemotaxis, matrix metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes." J Cell Mol Med **15**(4): 850-860.
- Wang, Y., J. Chen, M. Ling, J. A. Lopez, D. W. Chung and X. Fu (2015). "Hypochlorous acid generated by neutrophils inactivates ADAMTS13: an oxidative mechanism for regulating ADAMTS13 proteolytic activity during inflammation." J Biol Chem **290**(3): 1422-1431.
- Wang, Y., M. Sakuma, Z. Chen, V. Ustinov, C. Shi, K. Croce, A. C. Zago, J. Lopez, P. Andre, E. Plow and D. I. Simon (2005). "Leukocyte Engagement of Platelet Glycoprotein Iba α via the Integrin Mac-1 Is Critical for the Biological Response to Vascular Injury." Circulation **112**(19): 2993-3000.
- Ware, J., S. Russell and Z. M. Ruggeri (1997). "Cloning of the Murine Platelet Glycoprotein Iba α Gene Highlighting Species-Specific Platelet Adhesion." Blood Cells, Molecules, and Diseases **23**(2): 292-301.
- Washington, A. V., S. Gibot, I. Acevedo, J. Gattis, L. Quigley, R. Feltz, A. De La Mota, R. L. Schubert, J. Gomez-Rodriguez, J. Cheng, A. Dutra, E. Pak, O. Chertov, L. Rivera, J. Morales, J. Lubkowski, R. Hunter, P. L. Schwartzberg and D. W. McVicar (2009). "TREM-like transcript-1 protects against inflammation-associated hemorrhage by facilitating platelet aggregation in mice and humans." J Clin Invest **119**(6): 1489-1501.
- Washington, A. V., R. L. Schubert, L. Quigley, T. Disipio, R. Feltz, E. H. Cho and D. W. McVicar (2004). "A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the alpha-granules of megakaryocytes and platelets." Blood **104**(4): 1042-1047.
- Watson, S. P., J. M. Auger, O. J. T. McCarty and A. C. Pearce (2005). "GPVI and integrin α IIb β 3 signaling in platelets." Journal of Thrombosis and Haemostasis **3**(8): 1752-1762.
- Watson, S. P., J. M. J. Herbert and A. Y. Pollitt (2010). "GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity." Journal of Thrombosis and Haemostasis **8**(7): 1456-1467.
- Weber, C., L. Fraemohs and E. Dejana (2007). "The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation." Nat Rev Immunol **7**(6): 467-477.
- Wessel, F., M. Winderlich, M. Holm, M. Frye, R. Rivera-Galdos, M. Vockel, R. Linnepe, U. Ipe, A. Stadtmann, A. Zarbock, A. F. Nottebaum and D. Vestweber (2014). "Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin." Nat Immunol **15**(3): 223-230.

- Weyrich, A. S. (2014). "Platelets: more than a sack of glue." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2014**(1): 400-403.
- Weyrich, A. S., S. Lindemann and G. A. Zimmerman (2003). "The evolving role of platelets in inflammation." J Thromb Haemost **1**(9): 1897-1905.
- White, J. G. (1968). "The substructure of human platelet microtubules." Blood **32**(4): 638-648.
- White, J. G. (2010). "Platelet interior imaging technologies." Blood **116**(26): 6150-6151.
- Witkop, C. J., M. Krumwiede, H. Sedano and J. G. White (1987). "Reliability of absent platelet dense bodies as a diagnostic criterion for Hermansky-Pudlak syndrome." Am J Hematol **26**(4): 305-311.
- Wong, C., Y. Liu, J. Yip, R. Chand, J. L. Wee, L. Oates, B. Nieswandt, A. Reheman, H. Ni, N. Beauchemin and D. E. Jackson (2009). "CEACAM1 negatively regulates platelet-collagen interactions and thrombus growth in vitro and in vivo." Blood **113**(8): 1818-1828.
- Woodfin, A., M. B. Voisin, B. A. Imhof, E. Dejana, B. Engelhardt and S. Nourshargh (2009). "Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1." Blood **113**(24): 6246-6257.
- Wu, X., M. H. Helfrich, M. A. Horton, L. P. Feigen and J. B. Lefkowitz (1994). "Fibrinogen mediates platelet-polymorphonuclear leukocyte cooperation during immune-complex glomerulonephritis in rats." J Clin Invest **94**(3): 928-936.
- Yang, L., R. M. Froio, T. E. Sciuto, A. M. Dvorak, R. Alon and F. W. Luscinskas (2005). "ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow." Blood **106**(2): 584-592.
- Yano, K., D. Gale, S. Massberg, P. K. Cheruvu, R. Monahan-Earley, E. S. Morgan, D. Haig, U. H. von Andrian, A. M. Dvorak and W. C. Aird (2007). "Phenotypic heterogeneity is an evolutionarily conserved feature of the endothelium." Blood **109**(2): 613-615.
- Yeaman, M. R. (2014). "Platelets: at the nexus of antimicrobial defence." Nat Rev Microbiol **12**(6): 426-437.
- Yip, J., M. Alshahrani, N. Beauchemin and D. E. Jackson (2016). "CEACAM1 regulates integrin alphaIIb beta3-mediated functions in platelets." Platelets **27**(2): 168-177.
- Yipp, B. G., B. Petri, D. Salina, C. N. Jenne, B. N. Scott, L. D. Zbytniuk, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H. C. Meijndert, S. E. Malawista, A. de Boisfleury Chevance, K. Zhang, J. Conly and P. Kubes (2012). "Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo." Nat Med **18**(9): 1386-1393.
- Yousefi, S., J. A. Gold, N. Andina, J. J. Lee, A. M. Kelly, E. Kozlowski, I. Schmid, A. Straumann, J. Reichenbach, G. J. Gleich and H. U. Simon (2008). "Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense." Nat Med **14**(9): 949-953.
- Youssefian, T., A. Drouin, J. M. Masse, J. Guichard and E. M. Cramer (2002). "Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation." Blood **99**(11): 4021-4029.
- 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.

Zalavary, S., M. Grenegard, O. Stendahl and T. Bengtsson (1996). "Platelets enhance Fc(gamma) receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization." J Leukoc Biol **60**(1): 58-68.

Zarbock, A., R. K. Polanowska-Grabowska and K. Ley (2007). "Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation." Blood Rev **21**(2): 99-111.

Résumé

Les plaquettes jouent un rôle central dans l'hémostase et dans la réponse immunitaire. Elles interviennent en effet à toutes les étapes des réactions inflammatoires. Nos objectifs ont été de : (i) caractériser les mécanismes plaquettaires responsables de la prévention des saignements inflammatoires, qui sont à différencier des saignements provoqués par un traumatisme, et de (ii) caractériser les déterminants de la régulation des activités cytotoxiques des neutrophiles par les plaquettes. *In vivo* dans un modèle de réaction immuno-induite cutanée, nous avons mis en évidence le rôle de la glycoprotéine (GP) VI dans la prévention des saignements inflammatoires provoqués par les neutrophiles. Nos résultats suggèrent que GPVI exercerait son effet protecteur par une action mécanique associée à l'activation de sa voie de signalisation ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) en absence d'une agrégation plaquettaire. En revanche, dans un modèle d'inflammation pulmonaire aigue les récepteurs à ITAM, GPVI et CLEC-2 (*C-type lectin-like receptor 2*), ne sont pas requis alors que l'absence de GPIb conduit à des saignements inflammatoires. *In vitro*, nous avons montré que la régulation par les plaquettes des activités cytotoxiques des neutrophiles est déterminée par l'interaction préalable des neutrophiles avec les cellules endothéliales. Ainsi, nos résultats contribuent à une meilleure compréhension des fonctions des plaquettes dans les réactions inflammatoires, une première étape nécessaire au développement de nouvelles applications thérapeutiques des médicaments antiplaquettaires.

Abstract

Platelets are crucial players in hemostasis and immune responses. They intervene at various stages of inflammatory reactions. Our objectives were : (i) to characterize platelet mechanisms responsible for the prevention of inflammatory bleeding, which differs from trauma-induced bleeding, and (ii) to characterize the determinants of the regulation of neutrophil cytotoxic activities by platelets. *In vivo*, in an immune complex-mediated cutaneous inflammation, we demonstrated the role of glycoprotein (GP) VI in the prevention of inflammatory bleeding caused by neutrophils. Our results suggest that GPVI has a protective effect, independent of platelet aggregation, by a mechanical action associated to an activation of the ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)-based signaling pathway. In contrast, in an acute pulmonary inflammatory model, the ITAM receptors GPVI and CLEC-2 (*C-type lectin-like receptor 2*) were not required while the absence of platelet GPIb led to inflammatory bleeding. *In vitro*, we showed that physical interactions between neutrophils and endothelial cells are major determinants that guide the regulatory action of platelets towards neutrophil cytotoxic activities. In conclusion, our results contribute to a better understanding of platelet functions in inflammatory reactions, a necessary first step for future therapeutic applications of antiplatelet agents.