



HAL
open science

Le rôle de la GPVI et des intégrines plaquettaires en hémostase, en thrombose et dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires

Emily Janus-Bell

► To cite this version:

Emily Janus-Bell. Le rôle de la GPVI et des intégrines plaquettaires en hémostase, en thrombose et dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires. Hématologie. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ090 . tel-03665152

HAL Id: tel-03665152

<https://theses.hal.science/tel-03665152v1>

Submitted on 11 May 2022

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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

INSERM UMR_S1255 Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines : hémostasie, thrombose, transfusion

THÈSE

Présentée par

Emily JANUS-BELL

Soutenue le **26 mars 2021**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/S spécialité : Hématologie et physiopathologie vasculaire

Le rôle de la GPVI et des intégrines plaquettaires en hémostasie, en thrombose et dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires

THÈSE dirigée par :

M Pierre H. MANGIN

DR2, Inserm, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme Marie-Pierre GRATACAP

CRCN, Inserm, Université de Toulouse

M Alexandre KAUSKOT

CRCN, Inserm, Université Paris-Saclay

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Mme Pauline SOULAS-SPRAUEL

PU-PH, Université de Strasbourg

INSERM UMR_S1255

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

Directeur : Professeur Christian GACHET

Etablissement Français du Sang (EFS) – Grand Est

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

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

Directeur de thèse :

Docteur Pierre H. MANGIN

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

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement Pierre Mangin de m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse sous sa supervision. Merci de m'avoir si rapidement intégré à ton équipe. J'ai appris énormément à tes côtés, plus que je ne peux le dire ici. Merci pour ta confiance, pour tes conseils mais également pour ton soutien et tes encouragements tout au long de ma thèse.

J'adresse mes remerciements à Christian Gachet, directeur de l'unité 1255 et de l'EFS Grand-Est, qui m'a permis d'intégrer son laboratoire lors de mon Master 2 et de poursuivre avec une thèse dans cet environnement pluridisciplinaire particulièrement enrichissant.

A BPI France, à l'ARMESA et à la Société Française d'Hématologie qui ont financé mon travail, je leur en suis reconnaissante.

Je remercie Marie-Pierre Gratacap, Pauline Soulas-Sprauel, Alexandre Kauskot et Mathieu Fiore pour avoir accepté de siéger dans mon jury et d'évaluer mon travail de thèse.

Un immense merci à Nicolas pour tout le temps passé à me transmettre un nombre incalculable de techniques. A tes côtés j'ai appris à travailler bien plus efficacement, le tout toujours dans la bonne humeur ! Merci pour tous tes petits conseils toujours utiles. Merci également pour les discussions sur le trail... On se croiera probablement sur les sentiers !

Merci aux membres de la « team PM », comme on l'appelle. Merci à Clarisse pour son aide précieuse, tout particulièrement pendant ma première année. Merci pour les après-midis flux, les journées tMCAO et les allers-retours à l'IRM. Merci à Catherine B. d'être toujours là pour répondre à mes questions « bêtes », pour les explications de cytométrie et pour tous les conseils avisés ! Un grand merci à Mariane Litt pour les schémas. Merci également à Marion qui m'a aidé à faire mes premiers pas dans la recherche.

Merci à l'équipe de l'animalerie, Monique, Catherine Z., Kitty, Nolwenn et Lauriane pour votre aide précieuse pendant toute la durée de ma thèse. Merci au labo plaquettes et tout particulièrement à Véro de m'avoir appris à laver des plaquettes. Merci à Jean-Yves pour cette

superbe modélisation de la transmigration des neutrophiles ! Je voudrais également remercier l'ensemble des membres du laboratoire pour votre aide, que ce soit de loin ou de près, pendant ces quelques années.

Un grand merci à mes collègues doctorants. A Julie devenue rapidement une véritable amie. Merci pour les weekends de randonnée, les soirées en tout genre et pour les remontages de moral. Nos années de thèse auront été riches en émotions et en situations inédites et c'est le moins que l'on puisse dire. A toi de jouer maintenant, c'est la dernière ligne droite ! Merci à Inès, toujours là pour me dire que tout va bien se passer. Merci à Marie-Belle, Camille, Valentin, Usman, Quentin, Cyril, Anaïs et Sasha, sans oublier Adèle venue compléter l'équipe cette année.

Merci à David de toujours m'écouter et de ne pas avoir fui son bureau à chaque fois que je venais manipuler. Merci également à Sylvie pour les petits cours d'Alsacien !

Merci à mes parents pour leur soutien, vous êtes toujours là quand il faut. Merci à mon frère Philip, la prochaine thèse de la famille elle est pour toi !

Je tiens également à remercier mes amis Jessica, Claire-Marine, Thomas, Quentin et Hervé pour leur soutien et les quelques moments que l'on a pu partager ces derniers temps pour me changer les idées. Merci aux traileurs du weekend pour ces séances décompression sur les sentiers du Saint-Odile, d'Andlau et de Mollkirch !

Pour finir, merci à toi Luc, pour ton soutien infailible ces derniers mois. Rédiger une thèse pendant le confinement ce n'était pas gagné d'avance ! Promis les soirées rédaction c'est fini. Au fait, samedi matin on peut faire une sortie, je n'ai ni paragraphe à corriger ni PowerPoint à préparer ! Plus sérieusement, merci d'être là tout simplement.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	viii
ABREVIATIONS	x
PREAMBULE.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. Le système vasculaire.....	7
A. La structure des vaisseaux sanguins	7
B. La composition cellulaire et moléculaire de la paroi vasculaire	9
1. Les cellules endothéliales.....	9
2. Les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les péricytes	12
3. La matrice extracellulaire.....	13
3.1. La membrane basale.....	13
3.2. Les fibres élastiques	14
3.3. Les protéoglycanes	15
3.4. Les glycoprotéines de la paroi vasculaire	16
3.4.1. Les collagènes	16
3.4.2. Les laminines.....	18
3.4.3. Le facteur Willebrand.....	19
3.4.4. La fibronectine	21
3.4.5. La vitronectine.....	23
3.4.6. Les thrombospondines.....	24
3.4.7. Le fibrinogène	24
II. Les plaquettes sanguines, l'hémostase et la thrombose artérielle	27
A. Les plaquettes : définition et structure	27
B. Le rôle des plaquettes en hémostase : l'hémostase primaire.....	30
1. Les mécanismes moléculaires de l'hémostase primaire.....	30
2. Les récepteurs plaquettaires impliqués dans l'hémostase primaire	32
2.1. Les récepteurs entraînant une signalisation basée sur des tyrosine-kinases.....	32

2.1.1.	Le complexe GPIb-IX-V	32
2.1.2.	Les récepteurs entraînant une signalisation à partir d'un domaine ITAM33	
2.1.2.1.	La GPVI.....	34
2.1.2.2.	CLEC-2.....	39
2.1.2.3.	FcγRIIA	42
2.1.3.	Les intégrines	43
2.1.3.1.	L'intégrine α2β1	48
2.1.3.2.	L'intégrine α5β1	51
2.1.3.3.	L'intégrine α6β1	52
2.1.3.4.	L'intégrine αIIbβ3	53
2.1.3.5.	L'intégrine αvβ3	57
2.2.	Les récepteurs aux agonistes solubles	58
2.2.1.	Le récepteur P2X ₁	59
2.2.2.	Le récepteur P2Y ₁	60
2.2.3.	Le récepteur P2Y ₁₂	62
2.2.4.	Le récepteur TP	63
2.2.5.	Les récepteurs PAR.....	63
C.	Le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire	66
D.	La thrombose artérielle et les traitements antiplaquettaires	67
1.	La physiopathologie de l'athérosclérose et la thrombose artérielle	67
2.	Les traitements de la thrombose artérielle : focus sur les approches pharmacologiques.....	69
2.1.	L'aspirine et les traitements ciblant les récepteurs TP	69
2.2.	Les antagonistes des récepteurs P2Y ₁₂	70
2.3.	La bithérapie antiplaquettaire	72
2.4.	Les inhibiteurs de l'intégrine αIIbβ3	73
2.5.	Les nouvelles cibles pharmacologiques	74
2.5.1.	L'axe GPIb-IX-V/facteur Willebrand	74
2.5.2.	La GPVI	75
2.5.3.	Les récepteurs PAR.....	76
E.	Les fonctions non hémostatiques des plaquettes	77
III.	L'inflammation.....	79

A.	Le mécanisme général de la réaction inflammatoire.....	79
B.	Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la réaction inflammatoire.....	80
1.	L'activation des cellules endothéliales.....	80
2.	La diapédèse des leucocytes.....	81
2.1.	L'adhérence transitoire et le roulement des leucocytes.....	81
2.2.	L'arrêt des leucocytes.....	83
2.3.	Le crawling des leucocytes.....	83
2.4.	La transmigration des leucocytes	83
2.5.	Le passage des leucocytes à travers la membrane basale.....	85
C.	Le rôle des plaquettes dans l'inflammation.....	85
IV.	Les saignements en conditions inflammatoires.....	89
A.	Le rôle des neutrophiles dans le déclenchement des saignements en conditions inflammatoires.....	89
B.	La participation des plaquettes dans le déclenchement des saignements en conditions inflammatoires.....	90
C.	Le rôle des plaquettes dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires	90
1.	Les plaquettes dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires : mécanismes cellulaires	91
2.	Les plaquettes dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires : mécanismes moléculaires	93
	RESULTATS EXPERIMENTAUX	99
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	169
	ANNEXE	179
	BIBLIOGRAPHIE	197

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Schéma général de la structure des vaisseaux sanguins.	6
Figure 2 : Schéma de la composition de la paroi des capillaires et des artères.....	8
Figure 3 : La structure des protéoglycanes.....	15
Figure 4 : La structure du collagène.....	17
Figure 5 : La structure du FW	20
Figure 6 : La structure de la fibronectine	21
Figure 7 : La structure du fibrinogène.....	25
Figure 8 : Les mécanismes moléculaires de l'hémostase primaire	31
Figure 9 : La structure du complexe GPVI/FcR γ	35
Figure 10 : La voie de signalisation déclenchée par le complexe GPVI/FcR γ	37
Figure 11 : La voie de signalisation déclenchée par le récepteur CLEC-2	41
Figure 12 : Les différentes conformations des intégrines	45
Figure 13 : Les mécanismes moléculaires de l'activation des intégrines β 3 plaquettaires (signalisation <i>inside-out</i>).....	47
Figure 14 : La signalisation <i>outside-in</i> des intégrines β 1 plaquettaires	50
Figure 15 : La signalisation <i>outside-in</i> de l'intégrine α IIb β 3.....	56
Figure 16 : Les voies de signalisation déclenchées par les récepteurs aux agonistes solubles P2Y $_1$, P2Y $_{12}$, P2X $_1$ et TP.....	61
Figure 17 : La voie de signalisation déclenchée par les récepteurs PAR.....	65
Figure 18 : Le développement d'une plaque d'athérosclérose.....	68
Figure 19 : Les antiplaquettaires utilisés en clinique et les nouvelles cibles pharmacologiques	71
Figure 20 : Les différentes étapes de la diapédèse des leucocytes.....	82
Figure 21 : Le rôle des plaquettes dans l'arrêt du saignement en conditions inflammatoires .	92

Liste des tableaux

Tableau 1 : Le contenu des granules plaquettaires	29
Tableau 2 : Résumé des interactions moléculaires impliquant les plaquettes dans l'inflammation	87
Tableau 3 : Résumé des récepteurs plaquettaires impliqués dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires	95

ABBREVIATIONS

AA	Acide arachidonique
AC	Adénylate cyclase
ADAM	<i>A desintegrin and metalloproteinase</i>
ADAMTS13	<i>A desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeat 13</i>
ADAP	<i>Adhesion and degranulation promoting adapter protein</i>
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ApoE	Apolipoprotéine E
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
Btk	Protéine kinase de Bruton
CalDAG-GEFI	<i>Calcium and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor 1</i>
CD40L	CD40 ligand
CIB1	<i>Calcium and integrin-binding protein 1</i>
CLEC-2	<i>C-type lectin-like receptor-2</i>
COX	Cyclooxygénase
CRP	<i>Collagen-related peptide</i>
CYP450	Cytochrome P 450
DAG	Diacylglycérol
Dok1	<i>Docking protein 1</i>
ED	Extra-domaine
EMMPRIN	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i>
FACIT	<i>Fibril-associated collagens with interrupted triple helices</i>
Fak	<i>Focal adhesion kinase</i>
FcR γ	Chaîne γ des récepteurs Fc
FT	Facteur tissulaire
FW	Facteur Willebrand

Gads	<i>Grb2-related adapter downstream of Shc</i>
GAG	Glycosaminoglycane
Gly	Glycine
GP	Glycoprotéine
hemITAM	<i>Hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
Hyp	Hydroxyproline
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule 1</i>
Ig	Immunoglobulines
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JAM-A	Molécule d'adhérence de jonction A
KBPs	<i>Kindlin binding proteins</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LAD	Déficit d'adhérence leucocytaire
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LM	Laminine
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MLC	<i>Myosin light chain</i>
MPO	Myéloperoxydase
NETs	<i>Neutrophil-extracellular traps</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Monoxyde d'azote
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I
PAR	<i>Protease-activated receptors</i>
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule -1</i>

PF4	Facteur-4 plaquettaire
PG	Prostaglandine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PL	Phospholipase
PPP	Plasma pauvre en plaquettes
Pro	Proline
PRP	Plasma riche en plaquettes
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
Rap	<i>Ras-related protein</i>
Rasa3	<i>Ras GTPase-activating protein 3</i>
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
rpA	Réaction passive inversée d'Arthus
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SCO	Système canaliculaire ouvert
SH2	<i>Src homology 2</i>
SLP-76	<i>Scr homology 2 domain-countaining leukocyte phoshoprotein of 76 kDa</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
TFPI	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TLT-1	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) like transcript – 1</i>
tMCAO	Occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne
TNF α	Facteur de nécrose tumorale α
TP	Récepteur au thromboxane et aux prostaglandines
TSP	Thrombospondine

TxA2	Thromboxane A2
UV	Ultra-violets
VAV-1	<i>Vav guanine nucleotide exchange factor 1</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VE-cadhérines	Cadhérines endothéliales vasculaires
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>

PREAMBULE

L'hémostase regroupe l'ensemble des processus biologiques assurant le maintien de l'intégrité vasculaire et permettant l'arrêt des saignements. Suite à une lésion vasculaire, le vaisseau se contracte afin de réduire le débit sanguin et les plaquettes adhèrent à la paroi lésée formant ainsi un agrégat plaquettaire qui limite le saignement en colmatant la brèche. Interviennent ensuite la cascade enzymatique de la coagulation qui consolide l'agrégat plaquettaire grâce à un réseau de fibrine, ainsi que la fibrinolyse résorbant le caillot afin de rétablir la circulation sanguine normale (Versteeg et al., 2013).

Au niveau d'une artère malade, l'érosion ou la rupture d'une plaque d'athérosclérose conduit à l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes entraînant la formation d'un thrombus blanc, riche en plaquettes et en fibrine. Ce thrombus peut occlure l'artère soit au niveau de la plaque, soit suite à la formation d'un embolie et entraîner des pathologies ischémiques graves comme l'accident vasculaire cérébral (AVC) ou l'infarctus du myocarde. Ces événements représentent aujourd'hui la première cause de mortalité dans le monde. D'après l'organisation mondiale de la santé, le nombre de décès d'origine cardiovasculaire est estimé aux alentours de 17,7 millions chaque année, dont 7,4 millions dus à des pathologies coronariennes et 6,7 millions à des AVC (World Health Organization, 2017).

L'utilisation d'antiagrégants plaquettaires dans le traitement et la prévention de la thrombose artérielle est aujourd'hui bien établie. Les agents antiplaquettaires utilisés en clinique ont prouvé leur efficacité par leur capacité à réduire de manière significative la mortalité et la morbidité des pathologies thrombotiques, mais ils sont également responsables de risques de saignement et doivent donc faire l'objet d'une attention toute particulière lors de leur prescription. Mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliquant les plaquettes dans l'hémostase et la thrombose artérielle permet de mieux maîtriser les traitements antiplaquettaires et de développer de nouveaux agents antiplaquettaires avec un risque hémorragique faible présentant donc un rapport bénéfice/risque plus élevé.

Une cible particulièrement intéressante pour le développement d'un nouvel antiplaquettaire plus sûr est la glycoprotéine (GP) VI, un récepteur d'activation plaquettaire. En effet, la GPVI est exprimée spécifiquement sur les plaquettes, n'a pas de rôle majeur en hémostase comme mis en évidence chez des patients déficients pour ce récepteur qui présentent uniquement des saignements modérés (Jandrot-Perrus et al., 2019) et elle est impliquée en thrombose artérielle (Hechler and Gachet, 2011; Kuijpers et al., 2009). Deux agents ciblant la GPVI sont actuellement évalués dans des essais cliniques. Il a récemment été montré que la

GPVI ne lie pas uniquement le collagène, mais aussi le fibrinogène et la fibrine (Alshehri et al., 2015; Induruwa et al., 2018; Mammadova-Bach et al., 2015; Mangin et al., 2018; Onselaer et al., 2017). Il semble donc important de comprendre l'importance de ces différentes interactions dans le processus de croissance et de stabilité du thrombus.

D'autres cibles potentielles pour le développement de nouveaux antiplaquettaires sont les intégrines $\beta 1$ plaquettaires, impliquées dans les étapes initiales d'adhérence et d'activation des plaquettes. Un rôle des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ en thrombose expérimentale a été mis en évidence (He et al., 2003a; Schaff et al., 2013). Concernant la troisième intégrine $\beta 1$ plaquettaire, l' $\alpha 5\beta 1$, un récepteur à la fibronectine, son rôle en hémostase et en thrombose artérielle n'était pas connu au moment d'entreprendre ce travail.

Une situation inflammatoire peut induire un risque hémorragique et lorsque le saignement se développe au niveau d'organes sensibles comme le cerveau, les conséquences sont graves pour le patient. Des études semblent indiquer que les récepteurs plaquettaires jouant un rôle dans l'arrêt du saignement suite à un traumatisme, comme le complexe GPIb-IX-V et l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$, ne participeraient pas à l'arrêt du saignement en conditions inflammatoires (Deppermann et al., 2017; Goerge et al., 2008; Rayes et al., 2018a). A ce jour, le rôle des intégrines $\beta 1$ dans ce processus n'est pas connu.

Mon travail de thèse a visé à mieux caractériser le rôle de la GPVI et des intégrines plaquettaires en hémostase, en thrombose et dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires. J'ai tout d'abord étudié le rôle de l'interaction entre la GPVI et le fibrinogène dans la croissance et la stabilité du thrombus. Je me suis ensuite intéressée au rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ plaquettaire à la fois en hémostase et en thrombose artérielle. Enfin, j'ai évalué le rôle des intégrines plaquettaires dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

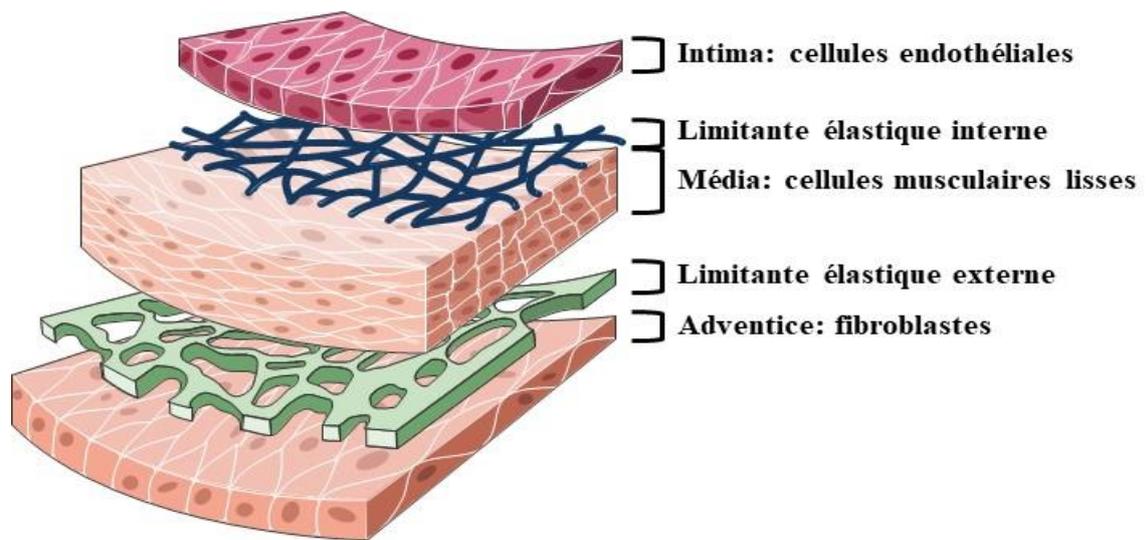


Figure 1 : Schéma général de la structure des vaisseaux sanguins.

I. Le système vasculaire

Le système vasculaire comprend l'ensemble des vaisseaux sanguins, à savoir les artères, les artérioles, les capillaires, les veinules et les veines. La paroi de ces vaisseaux est composée d'une couche de cellules endothéliales formant l'endothélium et du sous-endothélium. La composition cellulaire et moléculaire du sous-endothélium varie sensiblement en fonction du type de vaisseau. La fonction principale du système vasculaire est de distribuer l'oxygène et les nutriments aux différents organes tout en éliminant les déchets.

A. La structure des vaisseaux sanguins

La paroi des vaisseaux est constituée de trois couches : l'intima, la média et l'adventice. L'intima, au contact du sang circulant dans la lumière du vaisseau, se compose d'une couche de cellules endothéliales orientées dans le sens du flux sanguin reposant sur la membrane basale, liant l'endothélium au tissu conjonctif. La limitante élastique interne formée de fibres élastiques sépare l'intima de la média. Cette dernière est composée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses disposées de manière longitudinale et d'une matrice extracellulaire comprenant du collagène de type I et III, des fibres élastiques et des protéoglycanes (O'Connell et al., 2008; Rhodin, 1967; Waller et al., 1992). La média est séparée de l'adventice par une limitante élastique externe. L'adventice, la couche la plus externe de la paroi vasculaire, est constituée de fibroblastes, de collagène de type I et III et de fibres élastiques (Mazurek et al., 2017; Rhodin, 1967) (**Figure 1**).

Les artères distribuent le sang chargé en oxygène depuis le ventricule cardiaque gauche vers les organes en fonction du besoin. Leur paroi épaisse avec une média riche en fibres élastiques et en cellules musculaires lisses maintient la pression sanguine *via* la contraction de la paroi. Les artères se divisent pour former les artérioles d'un diamètre inférieur à 0,5 mm composées d'une ou de deux couches de cellules musculaires lisses, ne présentant pas de lame élastique externe et dont l'adventice est composé uniquement d'une couche de fibres de collagène et élastiques. Elles sont responsables de la résistance périphérique permettant de réduire la pression sanguine arrivant aux capillaires. Les capillaires, d'un diamètre de 5 à 10 μm , se composent de cellules endothéliales entourées par une membrane basale et de péricytes. De par leur paroi fine, ils sont responsables des échanges entre le sang et les organes. Les

capillaires convergent ensuite vers les veinules dont la paroi est entourée de cellules musculaires lisses ou de péricytes selon leur taille. Enfin, les veines présentent peu de couches de cellules musculaires lisses dans la média, mais un adventice épais avec du collagène et des fibres musculaires lisses. Leur paroi est moins épaisse que celle des artères mais la lumière des veines est plus grande (Aird, 2007; Mazurek et al., 2017) (**Figure 2**).

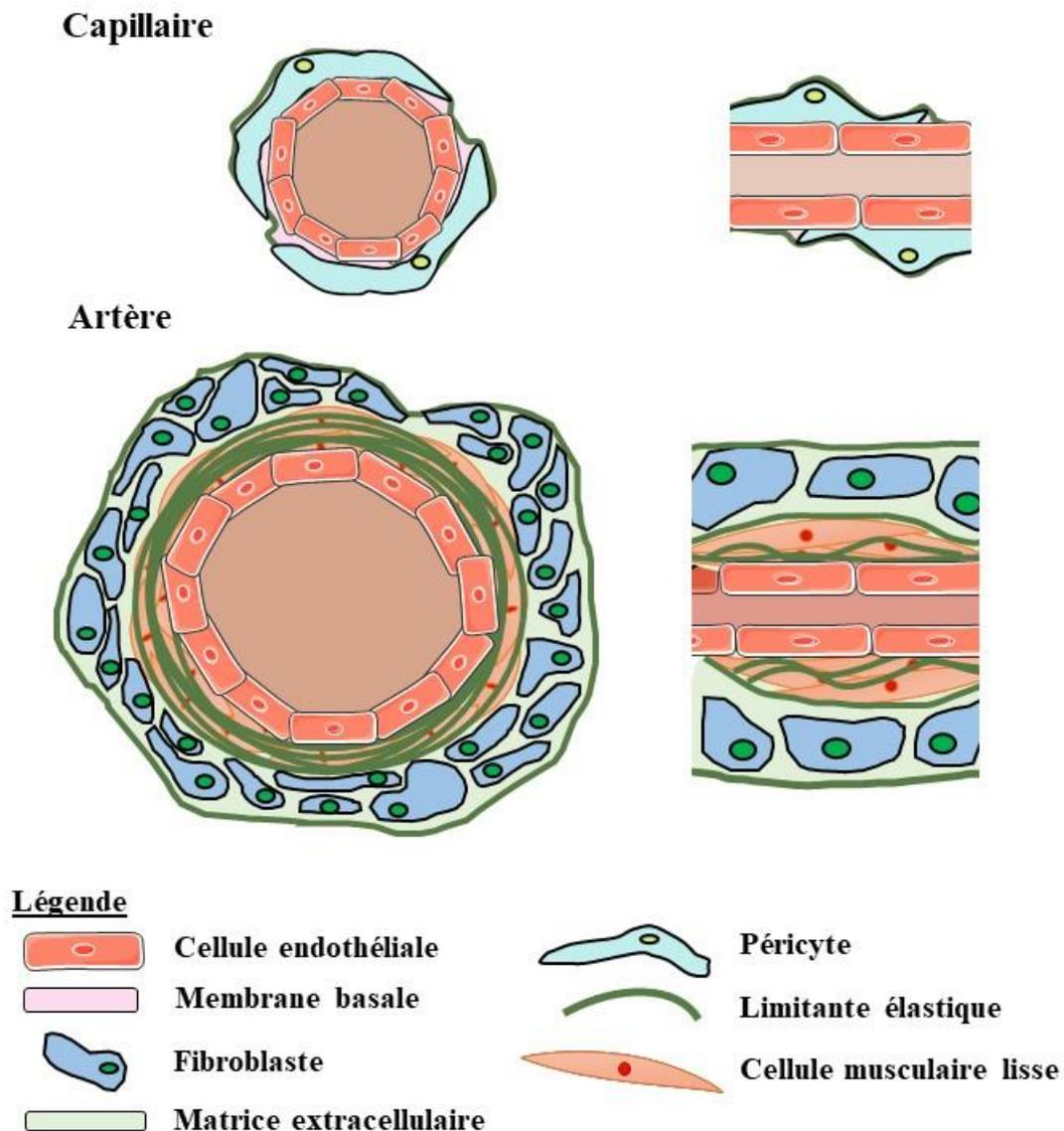


Figure 2 : Schéma de la composition de la paroi des capillaires et des artères (Adapté de Schöneberg et al., 2018).

B. La composition cellulaire et moléculaire de la paroi vasculaire

1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales forment une monocouche de cellules aplaties et polarisées tapissant la paroi interne du système cardiovasculaire et formant l'endothélium. Leur face luminale est en contact avec le sang circulant, alors que leur face basolatérale est ancrée sur des protéines de la membrane basale qui sont synthétisées, entre autres, par les cellules endothéliales. En effet, les cellules endothéliales produisent et sécrètent dans le sous-endothélium des protéines comme le facteur Willebrand (FW), les collagènes, la fibronectine et les laminines (Jaffe et al., 1974; Kramer et al., 1985; Mandarino et al., 1993). Le FW est également retenu dans des granules de stockage, que l'on appelle corps de Weibel-Palade, et est sécrété dans le sang après activation des cellules endothéliales, par exemple durant un processus inflammatoire.

La perméabilité sélective de l'endothélium

L'endothélium permet de contenir le sang dans son compartiment tout en facilitant les échanges gazeux et de nutriments entre le sang et les organes qu'il doit alimenter. La perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales est contrôlée par deux types de jonctions cellulaires majoritaires : les jonctions intermédiaires et les jonctions serrées. Les jonctions intermédiaires sont principalement composées de cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine) qui lie des caténines telles que la p120-caténine permettant de stabiliser la VE-cadhérine dans la membrane plasmique et d'empêcher son internalisation (Xiao et al., 2005), et l' α -caténine faisant le lien entre la VE-cadhérine et le cytosquelette d'actine. Pour leur part, les jonctions serrées permettent l'adhérence des cellules endothéliales entre elles *via* les occludines et les claudines (Furuse et al., 1993; Krug et al., 2014; Morita et al., 1999). L'assemblage de ces jonctions serrées dépendrait de la formation préalable des jonctions intermédiaires (Taddei et al., 2008). Enfin, on trouve également un troisième type de jonctions endothéliales, les jonctions communicantes formant des canaux transmembranaires.

Les échanges de gaz et de petites molécules comme les ions entre le compartiment vasculaire et l'environnement, à travers la barrière endothéliale, se font librement par diffusion passive. Cependant, le passage de fluide, de macromolécules et de cellules circulantes vers

l'espace interstitiel est régulé. Ce passage peut se faire de deux manières : i) par voie transcellulaire aussi appelée transcytose, qui fait intervenir des canaux, des transporteurs ou des vésicules, permettant de transporter du glucose et de l'albumine par exemple (Komarova and Malik, 2010; Schubert et al., 2001; Tirupathi et al., 1997) ; ou ii) par voie paracellulaire peu sélective, par passage dans les espaces entre les cellules c'est-à-dire par les jonctions inter-endothéliales suite à leur ouverture transitoire (Komarova and Malik, 2010).

Le maintien de l'intégrité vasculaire

La langue française définit l'intégrité comme l'état d'une chose qui est conservé sans altération de son état original. L'intégrité vasculaire correspond donc à l'absence d'altération des vaisseaux sanguins et de leurs composants, que ce soit au niveau de la structure ou de la fonction, cette dernière faisant référence ici à leur capacité à retenir le sang dans le système vasculaire et à éviter la fuite de plasma et/ou de cellules sanguines. Par définition, le maintien de l'intégrité vasculaire fait donc intervenir la conservation de la barrière semi-perméable, c'est-à-dire la perméabilité sélective de l'endothélium et donc le maintien des jonctions inter-endothéliales.

En effet, les jonctions intercellulaires sont critiques dans le maintien de l'intégrité vasculaire, et notamment les jonctions intermédiaires puisque les souris déficientes pour la VE-cadhérine (Carmeliet et al., 1999) ou traitées avec un anticorps anti-VE-cadhérine (Corada et al., 1999) présentent une hyperperméabilité vasculaire induisant le décès des souris à l'état embryonnaire. Pour leur part, les jonctions serrées sont particulièrement importantes au niveau cérébral puisque les souris déficientes pour la claudine-5 meurent peu après la naissance d'un défaut de la barrière hématoencéphalique (Nitta et al., 2003). Enfin, le rôle du troisième type de jonctions, les jonctions communicantes, dans la régulation de la perméabilité vasculaire n'est pas encore clair.

Il est important de noter qu'en fonction de l'organe, la perméabilité et les jonctions inter-endothéliales peuvent varier, surtout au niveau des capillaires. En effet, chez l'Homme on trouve trois types de capillaires qui se distinguent par la morphologie de leur monocouche de cellules endothéliales : i) ceux à endothélium continu qui se trouvent dans la peau, les poumons, le cerveau, le cœur et la rétine et permettent un passage limité de macromolécules ; ii) ceux à endothélium fenêtré facilitant les échanges que l'on retrouve également au niveau de la peau

mais aussi du rein, de l'intestin, des glandes exocrines et endocrines ; et enfin iii) ceux à endothélium discontinu présents dans certains sinusoides, au niveau du foie et de la moelle osseuse qui permettent un passage encore plus important de macromolécules (Potente and Mäkinen, 2017; Sarin, 2010).

Le rôle anti- et pro-thrombotique des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales jouent un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie vasculaire. D'une part, en situation normale, elles présentent une fonction antithrombotique permettant de prévenir l'activation des plaquettes et de la coagulation. Les cellules endothéliales préviennent l'activation des plaquettes grâce i) au glycocalyx chargé négativement qui empêche leur adhérence, ii) aux ectonucléotidases CD39 et CD73 qui dégradent l'adénosine diphosphate (ADP) et l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine, stimulant la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intraplaquettaire qui maintient les plaquettes au repos (Marcus et al., 1997; Minor et al., 2019), iii) à la production de prostaglandine (PG) I₂ et de monoxyde d'azote (NO). La PGI₂ interagit avec les récepteurs IP plaquettaires couplés à la protéine Gs activant l'adénylate cyclase (AC), alors que le NO diffuse à travers la membrane et induit l'activation de la guanylate cyclase (GC). Ces deux enzymes conduisent respectivement à la formation d'AMPc et de GMPc, inhibant les fonctions plaquettaires (Mellion et al., 1981; Moncada et al., 1976). D'autre part, les cellules endothéliales ont un rôle anticoagulant car i) l'héparane sulfate exprimé à leur surface potentialise l'activité de l'antithrombine III et du cofacteur II de l'héparine (Rosenberg, 1989; Tollefsen and Pestka, 1985), ii) elles produisent de la thrombomoduline activant la protéine C qui elle, inactive les FVa et FVIIIa essentiels à la coagulation (Loghmani and Conway, 2018) et iii) elles expriment l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) limitant la génération de thrombine (Kato, 2002). Enfin, les cellules endothéliales ont un rôle pro-fibrinolytique puisqu'elles libèrent l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), protéase transformant le plasminogène en plasmine qui dégrade alors la fibrine (Suzuki et al., 2011).

A l'inverse, suite à leur activation par des stimuli physiologiques ou pathologiques, les cellules endothéliales exposent à leur surface de la P-sélectine et libèrent du FW, des molécules permettant l'adhérence des plaquettes conférant ainsi un phénotype prothrombotique aux cellules endothéliales (Cleator et al., 2006). Elles produisent et libèrent aussi de l'endothéline, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'angiotensine II aux propriétés vasoconstrictrices (Arner and Högestätt, 1991; Davel et al., 2011) réduisant le flux sanguin

local et facilitant l'adhérence des plaquettes. Les cellules endothéliales activées expriment également du facteur tissulaire (FT) alors que l'expression de thrombomoduline est réduite, favorisant ainsi un état pro-coagulant (Moore et al., 1987). Enfin, les cellules endothéliales activées sécrètent l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I (PAI-1) réduisant l'activité fibrinolytique (Handt et al., 1996).

2. Les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les péricytes

Les cellules musculaires lisses, principal composant de la média des artères et des veines, sont fusiformes et mononucléées. Dans les artères saines, leur phénotype est majoritairement contractile permettant d'assurer le maintien du tonus vasculaire. Lors d'une lésion vasculaire ou d'un renouvellement de la paroi, les cellules musculaires lisses peuvent acquérir un phénotype sécrétoire (Frisantiene et al., 2018). Elles participent alors au maintien de la matrice extracellulaire, matrice dynamique qui subit un remodelage continu, avec la production de collagène, d'élastine, de fibronectine et de protéoglycanes (Wanjare et al., 2015). En situation pathologique, les cellules musculaires lisses participent au développement des plaques d'athérosclérose en sécrétant une quantité accrue de composants de la matrice extracellulaire (Frisantiene et al., 2018).

Les fibroblastes, de forme étoilée ou fusiformes, sont les principales cellules de l'adventice des artères et des veines. Ce sont les principaux producteurs de la matrice extracellulaire de l'adventice avec notamment du collagène, de l'élastine et de la fibronectine. Les fibroblastes sont impliqués dans la réparation tissulaire grâce à leur capacité à dégrader les tissus lésés et à régénérer les composants de la matrice (Stenmark et al., 2013). En situation pathologique, ils participent également au développement des lésions d'athérosclérose par formation de la néo-intima (Shi et al., 1996) et aux réponses inflammatoires par production de cytokines, de facteurs de croissance et de protéases (Tieu et al., 2009).

Les péricytes sont des cellules localisées autour des capillaires présentant de longs prolongements cytoplasmiques. Ces prolongements permettent la communication intercellulaire, notamment avec les cellules endothéliales afin de maintenir la barrière hémato-encéphalique (Chen et al., 2017b). Les péricytes participent également à la synthèse de la

matrice extracellulaire, à la contraction des vaisseaux, à la réparation tissulaire et à l'angiogenèse (Thomas et al., 2017).

3. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est un réseau composé à partir d'un répertoire de plusieurs centaines de protéines divisées en deux principales classes de macromolécules. On retrouve les protéoglycanes et les protéines fibreuses, ces dernières étant composées notamment de collagènes, d'élastine et de glycoprotéines comme la fibronectine et les laminines (Theocharis et al., 2019). La matrice extracellulaire sert d'ancrage pour les cellules afin de former les tissus et elle participe à la régulation de multiples processus cellulaires. Elle est notamment impliquée dans la transmission de signaux de prolifération, de migration, de survie et de différenciation des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des fibroblastes formant la paroi vasculaire. La matrice extracellulaire est dynamique et subit un remodelage constant afin d'assurer son maintien et donc la fonction et l'intégrité du tissu. On trouve d'une part la matrice interstitielle située entre les cellules comme dans l'adventice et d'autre part une structure plus spécialisée et plus organisée appelée membrane basale située dans l'intima et sur laquelle reposent les cellules endothéliales (Theocharis et al., 2019). Au niveau vasculaire, une lésion de la paroi peut exposer de la matrice extracellulaire, ce qui permet alors l'adhérence et l'activation des plaquettes.

3.1. La membrane basale

Les cellules endothéliales reposent sur une matrice péricellulaire très organisée appelée membrane basale. Elle est principalement composée de collagène de type IV, de laminines, de nidogène et de perlécan (LeBleu et al., 2007). Un réseau de laminines qui permet l'adhérence des cellules endothéliales est connecté par le nidogène et le perlécan (Aumailley et al., 1989) à un réseau de collagène de type IV sous-jacent, permettant de stabiliser la membrane basale (Kühn et al., 1981).

La membrane basale forme une barrière semi-perméable de par sa composition en collagène et sa densité en protéines qui régulent la perméabilité vasculaire (Rowe and Weiss,

2008). Elle possède des fonctions à la fois pro-angiogéniques puisqu'elle peut stocker et libérer du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et anti-angiogéniques par sa capacité à libérer des domaines du collagène IV, possédant des propriétés anti-angiogéniques (Okada and Yamawaki, 2019).

Le rôle de la membrane basale dans l'adhérence et l'activation plaquettaire

La plupart des composants de la membrane basale des vaisseaux sanguins permettent l'adhérence des plaquettes après une lésion vasculaire, notamment le nidogène, le collagène de type IV et les laminines ainsi que le FW et la fibronectine que l'on retrouve également dans cette structure.

3.2. Les fibres élastiques

Les fibres élastiques de la matrice extracellulaire permettent aux tissus sujets à des étirements répétés comme les vaisseaux sanguins de s'étirer puis de retrouver leur forme initiale à chaque cycle cardiaque. Elles présentent deux composants majeurs : l'élastine et les microfibrilles. L'élastine est synthétisée sous forme de monomères de tropo-élastine soluble par les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Mecham et al., 1981, 1983; Narayanan et al., 1976). La tropo-élastine contenant des domaines hydrophobes s'assemble bout à bout par des domaines contenant des lysines, formant ainsi de petits agrégats insolubles. Le deuxième composant des fibres élastiques, les microfibrilles, sont composées de fibrillines et des fibulines (Roark et al., 1995). Elles servent de socle permettant à l'élastine de s'y lier formant ainsi des fibres élastiques matures (Sato et al., 2007). L'importance des fibres élastiques de la matrice extracellulaire est attestée par l'existence de maladies cardiovasculaires comme le syndrome de Marfan dû à une mutation génétique de la fibrilline entraînant une altération de la média des vaisseaux pouvant aller jusqu'à la dissection aortique (Bitterman and Sponseller, 2017).

Le rôle des fibres élastiques dans l'adhérence et l'activation plaquettaire

Il a été montré que la fibrilline permet l'adhérence des plaquettes en condition de flux faible (Ross et al., 1998) et que des peptides dérivés de l'élastine réduiraient l'agrégation des plaquettes et la formation de thrombi à la fois *in vitro* et *in vivo* (Kawecki et al., 2014). Ces résultats suggèrent que les fibres élastiques pourraient moduler le processus hémostatique.

3.3. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont sécrétés par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Ils incluent les protéoglycanes de la membrane basale comme le perlecan (500 kDa) ou l'agrine (200 kDa) et ceux retrouvés plus en profondeur dans la matrice extracellulaire comme le versican (400 kDa) et la décorine (environ 36 kDa) (Iozzo and Schaefer, 2015) (**Figure 3**). Ces protéoglycanes sont composés d'une protéine centrale sur laquelle s'attachent de manière covalente des glycosaminoglycanes (GAG), polysaccharides anioniques présentant des répétitions de disaccharides, comme la chondroïtine sulfate, le kératane sulfate ou encore l'héparane sulfate, faisant de chaque GAG une chaîne unique.

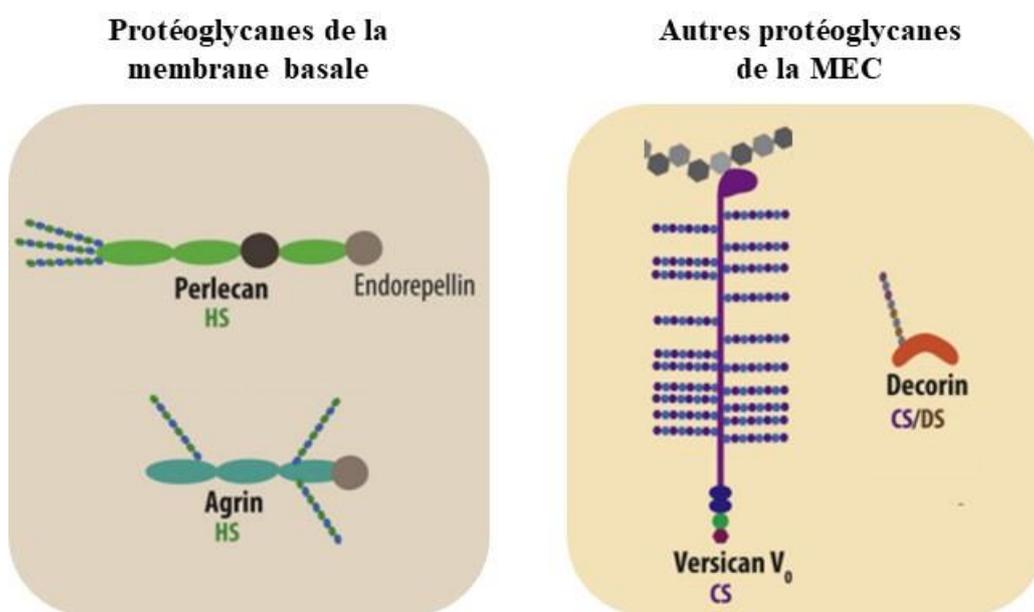


Figure 3 : La structure des protéoglycanes (Adapté de Theocharis *et al*, 2016). CS, chondroïtine sulfate; DS, dermatane sulfate ; HS, héparane sulfate ; MEC, matrice extracellulaire.

Les protéoglycanes sont importants pour l'organisation de la matrice extracellulaire. De par leurs GAGs chargés négativement, leur propriété hydrophile et leur conformation étendue, les protéoglycanes forment un hydrogel remplissant les espaces intercellulaires et permettant de supporter les variations de pression (Buschmann and Grodzinsky, 1995). Ils sont impliqués

dans la signalisation, la prolifération, la migration, la différenciation et l'adhérence cellulaire, mais aussi dans l'interaction des cytokines et des facteurs de croissance (Hildebrand et al., 1994; Wight et al., 1992). Les protéoglycanes modulent également l'angiogenèse puisque le perlécan peut être pro-angiogénique par son extrémité N-terminale mais aussi anti-angiogénique par son domaine V situé à l'extrémité C terminale (Gubbiotti et al., 2017).

Le rôle des protéoglycanes dans l'hémostase

Les protéoglycanes régulent également l'hémostase. Ils joueraient un rôle procoagulant par le versican qui inhiberait l'activité anticoagulante du TFPI (Zheng et al., 2006). D'autre part, les charges négatives des GAG permettent l'activation du facteur FXII et donc le déclenchement de la coagulation (Wujak et al., 2015). Les protéoglycanes sont impliqués dans l'adhérence et l'activation des plaquettes, comme la décorine et le perlécan *via* l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Bix et al., 2007; Guidetti et al., 2002). Il a également été proposé que le versican assure l'adhérence plaquettaire en condition de flux faible (Mazzucato et al., 2002). Enfin, le perlécan aurait des propriétés antithrombotiques du fait de la présence d'héparane sulfate qui lie G6b-B, un récepteur inhibiteur des plaquettes (Vögtle et al., 2019).

3.4. Les glycoprotéines de la paroi vasculaire

La matrice extracellulaire de la paroi vasculaire contient de nombreuses glycoprotéines comme les collagènes et les laminines. D'autres sont présentes à la fois dans la paroi vasculaire et dans la circulation comme le FW, la fibronectine, la vitronectine et les thrombospondines. Enfin, d'autres glycoprotéines adhésives, comme le fibrinogène, sont essentiellement présentes dans le plasma.

3.4.1. Les collagènes

Les collagènes, protéines les plus abondantes de la matrice extracellulaire, sont synthétisés par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (Jaffe et al., 1976; Jones et al., 1979). Chez les vertébrés, on en trouve 28 types différents (Ricard-Blum, 2011). Ils sont formés de chaînes polypeptidiques α enroulées en hélices gauches sur

lesquelles on trouve des répétitions du motif Glycine (Gly)-X-Y où X et Y représentent respectivement la proline et l'hydroxyproline. L'association de trois hélices gauches forme une triple hélice droite, précurseur soluble du collagène appelé procollagène. Les extrémités C- et N-terminales du procollagène sont ensuite retirées par protéolyse ce qui permet de former le tropocollagène, s'organisant en polymère de collagène insoluble (Sorushanova et al., 2019) (Figure 4).

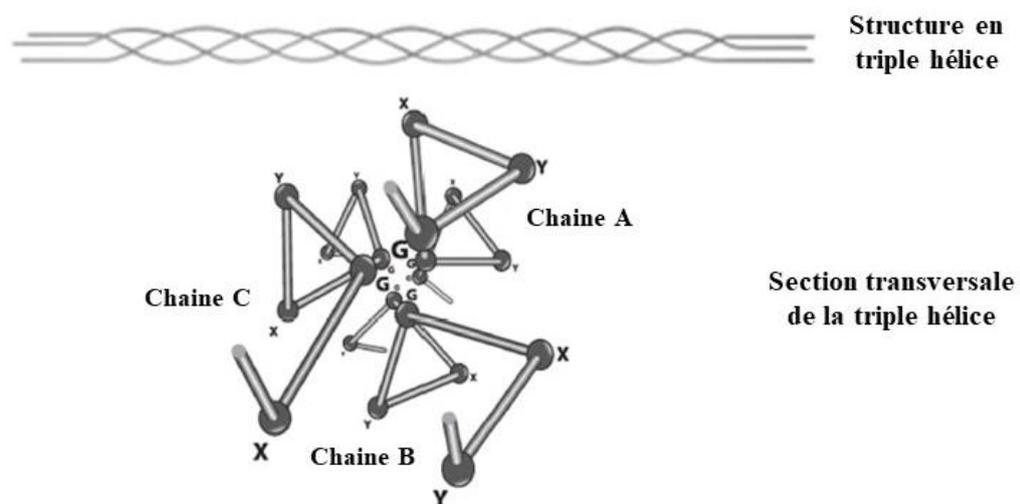


Figure 4 : La structure du collagène (Adapté de Sorushanova et al., 2019).

Au niveau vasculaire, on trouve trois grandes catégories de collagène (Osidak et al., 2015). La première est constituée des collagènes fibrillaires avec les collagènes de type I et III majoritairement, mais aussi le collagène V, retrouvés dans la média et l'adventice (Murata et al., 1986). La deuxième catégorie est composée des collagènes formant des réseaux avec le type IV, constituant majeur de la membrane basale, et le type VIII surtout présent dans le sous-endothélium (Kittelberger et al., 1990; Kühn, 1995). Enfin, la dernière catégorie comprend les autres collagènes avec i) les collagènes formant des microfibrilles perlées comme le type VI dans l'intima (von der Mark et al., 1984), ii) les collagènes associés aux fibrilles, appelés *Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices* (FACIT), avec les types XIV et XVI proches de la membrane basale, iii) les collagènes associés à la membrane basale comme les collagène XV, XVIII et XIX (Myers et al., 1996, 1997; Saarela et al., 1998), iv) les collagènes liés aux membranes comme le type XIII exprimé par les cellules endothéliales (Hägg et al.,

1998) et v) le collagène d’ancrage de type VII se trouvant dans le sous-endothélium (Sakai et al., 1986).

Les collagènes jouent un rôle structural puisqu’ils sont responsables de la résistance et de l’élasticité du vaisseau. Ils sont également impliqués dans la différenciation, la prolifération, l’adhérence, la migration et l’infiltration cellulaire (Heino, 2007; Hurskainen et al., 2010; Koyama et al., 1996; Liu et al., 2018). L’importance des collagènes dans les vaisseaux sanguins est attestée par des maladies comme le syndrome d’Ehlers-Danlos de type vasculaire induit par des mutations du gène codant le collagène III et caractérisé par une anomalie d’élasticité vasculaire entraînant des dissections et des ruptures d’anévrisme (Pepin et al., 2014).

Le rôle des collagènes dans l’adhérence et l’activation plaquettaire

Suite à une lésion vasculaire exposant la membrane basale et la matrice interstitielle, les collagènes sont exposés. Ils permettent l’adhérence, l’activation et l’agrégation des plaquettes et participent donc à la formation d’un clou hémostatique (Knight et al., 1999; Nieswandt and Watson, 2003; Ross et al., 1995; Saelman et al., 1994; Savage et al., 1996).

3.4.2. Les laminines

Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques composées d’une chaîne α , d’une chaîne β et d’une chaîne γ reliées par des ponts disulfures. Chez les mammifères, on trouve 16 isoformes dont le nom dépend de la composition, par exemple la laminine (LM) 411 contient les chaînes $\alpha 4$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ (Aumailley et al., 2005). Les laminines sont synthétisées par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (Gospodarowicz et al., 1981; Walker-Caprioglio et al., 1995; Woodley et al., 1988). Elles font partie des composants les plus abondants de la membrane basale où elles forment un réseau interagissant avec le collagène IV (Yurchenco, 2011). Au niveau vasculaire, on trouve quatre isoformes majeures : LM411, LM421, LM511 et LM521 (Hallmann et al., 2005; Schaff et al., 2013). Elles participent à l’angiogenèse et à l’architecture des vaisseaux par régulation de l’adhérence, la prolifération, la différenciation et la migration des cellules (Tzu and Marinkovich, 2008).

Le rôle des laminines dans l’hémostase

Au niveau hémostatique, les laminines permettent l’adhérence des plaquettes en condition statique et de flux *via* l’intégrine $\alpha 6 \beta 1$ (Hindriks et al., 1992; Ill et al., 1984; Inoue et

al., 2006; Schaff et al., 2013; Sonnenberg et al., 1988). De plus, en condition de flux, elles peuvent lier le FW, favorisant ainsi l'adhérence des plaquettes *via* la GPIb (Inoue et al., 2008; Schaff et al., 2013). Les laminines entraînent également l'activation des plaquettes suite à l'interaction avec $\alpha 6\beta 1$ et la GPVI pour les laminines possédant une chaîne $\alpha 5$, (Inoue et al., 2006; Schaff et al., 2013). Les laminines contribueraient à la formation de thrombi *in vivo* (Schaff et al., 2013) et à la coagulation en activant le FXII favorisant ainsi la formation de fibrine (White-Adams et al., 2010).

3.4.3. Le facteur Willebrand

Le FW est une glycoprotéine multimérique du plasma impliquée dans l'hémostase. On le retrouve également dans les cellules endothéliales et les mégacaryocytes, cellules par lesquelles il est synthétisé (Jaffe et al., 1974; Sporn et al., 1985). Il est tout d'abord exprimé sous forme de molécules de pro-FW qui s'associent par des ponts disulfures pour former des dimères (500 kDa), puis des multimères de haut poids moléculaire (jusqu'à 20,000 kDa) (Sadler, 2009; Wagner and Marder, 1984). Ces derniers sont internalisés dans les granules α plaquettaires et les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, où ils sont stockés (Cramer et al., 1985; Wagner et al., 1982). Les corps de Weibel-Palade libèrent du FW de manière constitutive à la fois dans le sang où il constitue la majorité du FW circulant, et dans le sous-endothélium (Giblin et al., 2008).

Le FW est composé de plusieurs domaines : i) le domaine A1 qui lie la GPIb α des plaquettes et le collagène de type IV, ii) le domaine A2 site de clivage du FW par *A Desintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeat 13* (ADAMTS13) réduisant la taille et la réactivité des multimères circulants, iii) le domaine A3 site de liaison du collagène sous-endothélial de type I et III, iv) le domaine C4 présentant une séquence RGD qui lie l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ et v) le domaine D3 site de liaison du FVIII (Brehm, 2017) (**Figure 5**).

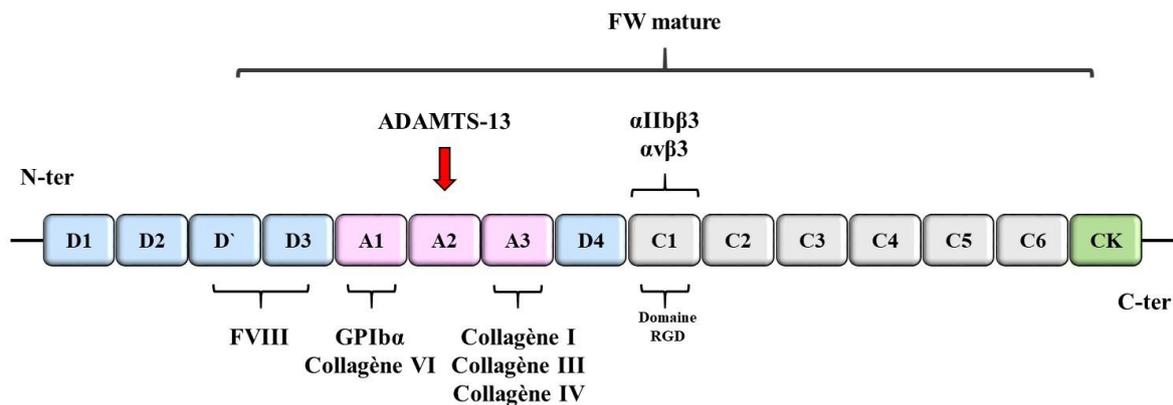


Figure 5 : La structure du FW (Adapté de Brehm *et al.*, 2017). ADAMTS-13, *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeat-13* ; RGD, Arginine-Glycine-Acide aspartique

Le rôle du FW dans l'hémostase

Un rôle majeur du FW est d'assurer l'attachement des plaquettes au site d'une lésion vasculaire par sa capacité à s'attacher à de nombreuses protéines exposées comme les laminines ou le collagène. Il joue un rôle particulièrement important à des taux de cisaillement supérieurs à $1,000\text{ s}^{-1}$, puisqu'il est la seule protéine adhésive capable d'assurer l'adhérence des plaquettes par son interaction avec la GPIIb α (Savage *et al.*, 1996). Le FW peut également interagir avec l'intégrine α IIb β 3 plaquettaire ce qui pourrait favoriser l'adhérence stable et l'agrégation des plaquettes (Goto *et al.*, 1995; Savage *et al.*, 1996). De plus, il est impliqué dans l'attachement des plaquettes à la surface d'un thrombus déjà formé et contribue donc à la croissance des thrombi (Kulkarni *et al.*, 2000). Chez l'Homme, le rôle du FW en hémostase est mis en évidence par la maladie de Willebrand, dont il existe trois types. Les types 1 et 3, définis par un défaut quantitatif en FW modéré et généralement inférieur à 40% pour le type 1 et sévère avec une absence totale de FW circulant pour le type 3. Ce défaut quantitatif conduit à une réduction d'adhérence et d'agrégation des plaquettes. La maladie de Willebrand de type 2 est caractérisée par un défaut qualitatif c'est-à-dire une dysfonction du FW, et est divisée en 4 sous-types. Le sous-type 2A où l'on retrouve un défaut en FW multimérique de haut poids moléculaire conduisant également à une réduction d'adhérence des plaquettes ; le sous-type 2B caractérisé par une augmentation de l'affinité du FW pour la GPIIb α induisant la formation de complexes plaquettes – FW rapidement éliminés de la circulation, conduisant ainsi à une thrombopénie. Une perte des multimères de FW est également constatée; le sous-type 2M pour lequel l'adhérence des plaquettes est aussi réduite du fait d'une mutation réduisant l'affinité du FW

pour les plaquettes ou le collagène ; et enfin le sous-type 2N lié à des mutations impactant l'affinité du FW pour le FVIII (Leebeek and Eikenboom, 2016).

De plus, le FW joue également un rôle dans la coagulation puisqu'il transporte le FVIII *via* son domaine D3 et de ce fait le protège de la dégradation et l'amène au site de lésion vasculaire facilitant la coagulation (Fay et al., 1991). Certains patients souffrant de maladie de Willebrand présentent également une réduction du FVIII circulant, secondaire à la réduction du FW, induisant davantage de saignements que ceux dus au simple déficit en FW. Cette observation est tout particulièrement vraie pour la maladie de Willebrand de type 3 souvent associée à un déficit sévère en FVIII induisant des hémarthroses (van Galen et al., 2012).

3.4.4. La fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine exprimée dans de nombreux tissus qui joue d'une part un rôle structural et d'autre part un rôle de régulation des fonctions des cellules ancrées dans la matrice extracellulaire. Elle se compose de monomères comprenant trois domaines répétés majeurs, FNI, FNII et FNIII, ainsi qu'une région variable « V » (Maurer et al., 2015b). Par épissage alternatif, jusqu'à 20 isoformes différents peuvent être générés, incluant ou non des extra-domaines (ED) A et EDB et la région « V » (Ffrench-Constant, 1995). Les monomères s'assemblent en dimères par des ponts disulfures, qui peuvent ensuite s'associer pour former des multimères (**Figure 6**).

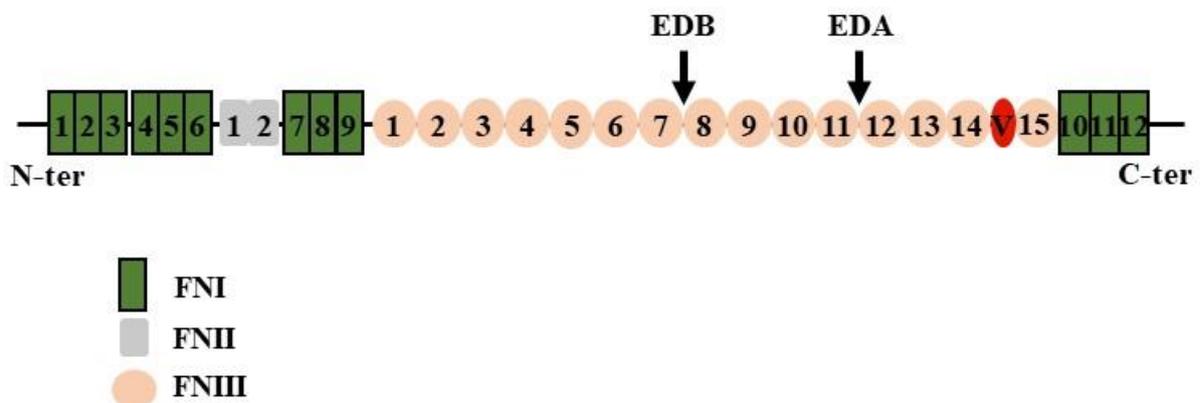


Figure 6 : La structure de la fibronectine. EDA, extradomaine A; EDB, extradomaine B; FNI, domaine de type I; FNII, domaine de type II; FNIII, domaine de type III; V, région variable (Adapté de To *et al.*, 2011).

La fibronectine se trouve sous deux formes principales : la fibronectine plasmatique soluble et la fibronectine cellulaire insoluble. La fibronectine plasmatique ne contient ni EDA ni EDB, mais la région « V » peut être présente (Magnusson and Mosher, 1998). Elle est synthétisée par les hépatocytes (Tamkun and Hynes, 1983) et sécrétée dans le sang où elle circule dans sa conformation compacte inactive à une concentration de 300 µg/mL chez l'Homme (Rocco et al., 1984). La fibronectine plasmatique compacte peut interagir avec des récepteurs de surface cellulaire comme l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, ce qui permet son passage en forme étendue (Baneyx et al., 2001; Fogerty et al., 1990). Elle expose alors des domaines permettant son auto-assemblage comme le domaine FN1-5 ainsi que plusieurs domaines FNIII (Bultmann et al., 1998; Hocking et al., 1994; Schwarzbauer, 1991; Sechler et al., 2001), ce qui conduit à la formation d'un réseau fibrillaire. La fibronectine cellulaire, quant à elle, présente des domaines EDA et/ou EDB (To and Midwood, 2011). Elle est synthétisée par différents types cellulaires dont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes de la paroi vasculaire (Jaffe and Mosher, 1978; Lyons-Giordano et al., 1987; Ruoslahti et al., 1973). Elle est également synthétisée par les mégacaryocytes et stockée dans les granules α plaquettaires (Schick et al., 1997; Wencel-Drake et al., 1985). La fibronectine cellulaire est retrouvée dans l'intima, la média et l'adventice sous forme de fibrilles (Takasaki et al., 1991).

La fibronectine permet l'assemblage et l'organisation de la matrice extracellulaire en y incorporant les collagènes I et III, la fibrilline et le fibrinogène (McDonald et al., 1982; Pereira et al., 2002; Sabatier et al., 2009). Elle joue un rôle important lors du développement embryonnaire et tout particulièrement dans la mise en place des vaisseaux sanguins (Astrof and Hynes, 2009), ce qui est confirmé par le décès au stade embryonnaire des souris déficientes en fibronectine suite à des défauts vasculaires (George et al., 1993). Elle permet aussi l'adhérence, la migration et la différenciation des cellules (To and Midwood, 2011). Plus récemment, il a été montré que la fibronectine est aussi impliquée dans la thromboinflammation, c'est-à-dire une interaction et une coopération entre la thrombose et l'inflammation, liée à l'ischémie/reperfusion au niveau cérébral et cardiaque (Chorawala et al., 2018; Dhanesha et al., 2015, 2019) et dans l'athérosclérose (Doddapattar et al., 2015, 2018).

Le rôle de la fibronectine dans l'adhérence et l'activation plaquettaire

La fibronectine assure l'adhérence et l'activation des plaquettes en condition statique et de flux, avec un maximum d'adhérence à 300 s⁻¹ (Beumer et al., 1994; McCarty et al., 2004;

Polanowska-Grabowska et al., 1999). Les récepteurs plaquettaires impliqués dans ces interactions sont les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$ et $\alpha \text{IIb}\beta 3$ qui interagissent avec la séquence RGD de la fibronectine (Beumer et al., 1994; McCarty et al., 2004). La fibronectine régule également la stabilité et la croissance des thrombi puisqu'en son absence la formation d'un thrombus occlusif est retardée (Matuskova et al., 2006; Ni et al., 2003), et ce surtout *via* l'EDA (Chauhan et al., 2008; Prakash et al., 2015).

3.4.5. La vitronectine

La vitronectine est une glycoprotéine multimérique synthétisée par le foie (Suzuki et al., 1985). On la retrouve principalement dans le plasma où elle circule à une concentration de 200 à 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans sa forme repliée peu réactive (Kobayashi et al., 1994). La forme multimérique réactive de la vitronectine est présente dans la matrice extracellulaire, la paroi vasculaire et les plaquettes (Parker et al., 1989; Seiffert and Schleef, 1996; Stockmann et al., 1993). Suite à l'activation plaquettaire, elle est sécrétée.

La vitronectine est impliquée dans l'adhérence, l'étalement, la migration et la prolifération des cellules.

Le rôle de la vitronectine dans l'hémostase

La vitronectine participe à l'hémostase puisqu'elle permet l'adhérence et l'agrégation des plaquettes (Asch and Podack, 1990; Reheman et al., 2005; Wu et al., 2004) en liant les intégrines $\alpha \nu\beta 3$ et $\alpha \text{IIb}\beta 3$. De plus, la vitronectine serait impliquée dans la croissance et la stabilisation des thrombi (Konstantinides et al., 2001; Wu et al., 2004), en effet chez les souris déficientes en vitronectine l'occlusion vasculaire semble retardée (Eitzman et al., 2000; Reheman et al., 2005). La vitronectine joue un rôle dans la coagulation en liant le complexe thrombine – antithrombine, protégeant ainsi la thrombine de l'inactivation par l'antithrombine (Ill and Ruoslahti, 1985; Podack et al., 1986). Elle lie également le PAI-1 formant un complexe qui serait inhibiteur de la thrombine activée (Stoop et al., 2000).

3.4.6. Les thrombospondines

Les thrombospondines (TSP) constituent une famille de cinq glycoprotéines synthétisées par les mégacaryocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses (Cramer et al., 1989; Jaffe et al., 1983; Mosher et al., 1982). Les TSP sont présentes dans les granules α plaquettaires (Wencel-Drake et al., 1985), dans la paroi vasculaire notamment au niveau de l'intima et de la média (Stenina et al., 2003) et dans le plasma où elles circulent à la concentration de 100 à 300 ng/mL (McCrohan et al., 1987).

Les TSP régulent les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire en interagissant avec des récepteurs cellulaires, des protéines de la matrice extracellulaire et des cytokines (Adams and Lawler, 2011). Elles influencent des processus biologiques comme l'angiogenèse et la réparation tissulaire (Muppala et al., 2015; Sweetwyne and Murphy-Ullrich, 2012).

Le rôle des thrombospondines dans l'adhérence et l'activation plaquettaire

Au niveau de l'hémostase, les plaquettes adhèrent sur une surface de TSP1, processus dépendant des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha \text{IIb}\beta 3$ en condition statique (Agbanyo et al., 1993) et faisant également intervenir la GPIb α et le CD36 en condition de flux (Jurk et al., 2003; Nergiz-Unal et al., 2011). Les TSP sont impliquées dans l'agrégation plaquettaire (Boukerche and McGregor, 1988; Isenberg et al., 2008; Tuszynski et al., 1988) et jouent également un rôle en thrombose en recrutant les plaquettes et en stabilisant le thrombus (Bonnefoy et al., 2006).

3.4.7. Le fibrinogène

Le fibrinogène est une glycoprotéine hexamérique soluble jouant un rôle clé en hémostase. Il est synthétisé par les hépatocytes du foie (Drury and McMaster, 1929) puis libéré dans le plasma où il circule à la concentration de 2 à 4 mg/mL (Lowe et al., 1997). Le fibrinogène est également stocké dans les granules α plaquettaires (Harrison et al., 1990; Wencel-Drake et al., 1985), suite à son endocytose médiée par l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ depuis la circulation, et dans les cellules endothéliales (Kurozumi et al., 1984)

Au niveau structurel, le fibrinogène est composé de trois chaînes polypeptidiques, A α , B β et γ , chacune présente en deux exemplaires. Les chaînes individuelles forment d'abord des

hétérodimères $A\alpha$ - γ et $B\beta$ - γ , puis des semi-molécules trimériques $A\alpha$ - $B\beta$ - γ et enfin des complexes hexamériques $(A\alpha$ - $B\beta$ - γ)₂ liés par des ponts disulfures. La partie centrale du fibrinogène hexamérique, appelée région E, est constituée des extrémités N terminales des six chaînes présentant les sites de clivages des fibrinopeptides A et B. Au niveau latéral, on trouve les domaines globulaires appelés régions D, composés des extrémités C terminales des chaînes $B\beta$ et γ (Kattula et al., 2017) (**Figure 7**).

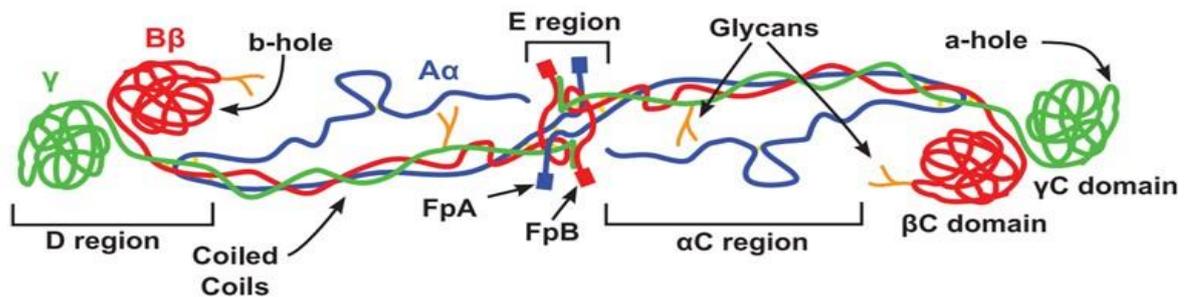


Figure 7 : La structure du fibrinogène. FpA, fibrinopeptide A; FpB; fibrinopeptide B (Adapté de Köhler *et al.*, 2015).

Le rôle du fibrinogène dans l'adhérence et l'activation plaquettaire

Le fibrinogène joue un rôle crucial en hémostase en assurant l'agrégation plaquettaire. En effet, il possède deux séquences RGD sur les chaînes $A\alpha$ et une séquence de douze acides aminés sur l'extrémité C terminale de la chaîne γ qui lie l'intégrine α IIb β 3 activée, permettant ainsi de lier les plaquettes entre elles (Smith et al., 1990). En condition statique, les plaquettes adhèrent et s'activent sur le fibrinogène (Savage and Ruggeri, 1991). En condition de flux faible, leur adhérence reste plutôt faible et limitée aux conditions de flux bas (Polanowska-Grabowska et al., 1999; Savage et al., 1996). Par l'intermédiaire de la thrombine issue de la cascade de la coagulation, le fibrinogène soluble est transformé en fibrine insoluble *via* le clivage des fibrinopeptides A et B (Litvinov et al., 2005) permettant son assemblage pour former un réseau insoluble de fibrine stabilisant les agrégats plaquettaires. Le fibrinogène interviendrait également dans la croissance des thrombi par sa capacité à activer les plaquettes suite à la liaison à la GPVI (Mangin et al., 2018).

L'importance du fibrinogène en hémostase est confirmée par l'existence de maladies comme l'afibrinogénémie et la dysfibrinogénémie caractérisées respectivement par une absence totale de fibrinogène circulant et un fibrinogène circulant non fonctionnel (Tiscia and Margaglione, 2018). Ces maladies peuvent induire des saignements, mais parfois également des thromboses microvasculaires que l'on n'explique pas à ce jour (Mukaddam et al., 2015). Il a été proposé que la thrombine qui n'est pas utilisée pour générer de la fibrine chez ces patients reste disponible pour agir en tant qu'activateur plaquettaire conduisant à la formation de thrombi (Dupuy et al., 2001). Ces pathologies sont reproduites dans le système murin avec une réduction de l'agrégation plaquettaire et une augmentation du temps de saignement chez des souris pour lesquelles le fibrinogène est génétiquement inactivé (Holmbäck et al., 1996; Suh et al., 1995).

II. Les plaquettes sanguines, l'hémostase et la thrombose artérielle

A. Les plaquettes : définition et structure

Les plaquettes sanguines sont de petites cellules anucléées discoïdes issues du remodelage du cytoplasme des mégacaryocytes de la moelle osseuse (Pease, 1956; Ru et al., 2016). Chez l'Homme, les plaquettes ont un diamètre d'environ 2 micromètres. Les deux tiers circulent 7 à 10 jours à une concentration de 150 000 à 450 000 plaquettes par microlitre. Le tiers restant se trouve dans la rate (Aster, 1966). Elles sont éliminées par les macrophages de la rate et du foie (Quach et al., 2018).

Les plaquettes se composent principalement d'une membrane plasmique, d'un cytoplasme, d'un cytosquelette et d'organites. La membrane plasmique est constituée d'une bicouche asymétrique comprenant des phospholipides, du cholestérol, des glycolipides, des protéoglycanes et des glycoprotéines (Gremmel et al., 2016). Elle présente des invaginations formant le système canaliculaire ouvert (SCO) qui permet d'augmenter la surface d'échange entre la plaquette et le milieu extérieur et qui constitue également une réserve de membrane pour le changement de forme qui survient lors de l'activation plaquettaire (Escolar et al., 1989).

Le cytosquelette plaquettaire se compose principalement de microtubules formant un réseau circonférentiel sous la membrane plasmique, appelé bande marginale, et de filaments d'actomyosine à la fois sous la membrane plasmique et dans le cytosol. Il est responsable de la forme discoïde des plaquettes au repos ainsi que du changement de forme lors de l'activation aboutissant à la sécrétion du contenu des granules plaquettaires (White, 1969).

Les organites plaquettaires comprennent les mitochondries, les grains de glycogène, le système tubulaire dense et les granules. Les granules plaquettaires sont de trois types : les granules α , les granules denses ou δ et les granules lysosomales ou λ . Ils permettent le stockage de protéines et d'enzymes. Les granules α sont les plus abondants (environ 40 par plaquette chez l'Homme) (Eckly et al., 2016), et contiennent principalement des glycoprotéines adhésives (fibrinogène, FW), des facteurs de la coagulation (facteur V, XI, XIII, FT), des facteurs de croissance (facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), VEGF) ainsi que de la P-sélectine (Harrison and Cramer, 1993). Les granules δ , moins de 10 par plaquette humaine, (Eckly et al., 2016) contiennent notamment de l'ADP, de l'ATP et du calcium impliqués dans

l'agrégation plaquettaire, ainsi que des polyphosphates impliqués dans la coagulation (McNicol and Israels, 1999). Enfin, les granules λ contiennent des protéases (**Tableau 1**). Les granules α et δ plaquettaire jouent un rôle crucial en hémostase suite à la libération de facteurs pro-agrégants et procoagulants qui amplifient l'activation et l'agrégation des plaquettes et la coagulation permettant la formation du clou hémostatique. Les patients ayant un défaut qualitatif ou/et quantitatif des granules α ou δ ainsi que de leur contenu présentent respectivement un syndrome des plaquettes grises ou la maladie du pool vide, avec une tendance hémorragique mise en évidence par la présence d'ecchymoses, d'épistaxis et de ménorragies (Masliah-Planchon et al., 2013; Pluthero et al., 2018). Les granules plaquettaire jouent également un rôle au-delà de l'hémostase puisqu'ils sont impliqués dans l'angiogenèse et la réparation tissulaire *via* la libération de facteurs de croissance, ainsi que dans l'athérosclérose.

Tableau 1 : Le contenu des granules plaquettaires. ADP, adénosine diphosphate; ATP, adénosine triphosphate; EGF, facteur de croissance épidermique; FW, facteur Willebrand; PAI-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1; PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes; PF4, facteur plaquettaire 4; TGF- β , *transforming growth factor-1*; TLT-1, *triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-like transcript-1*; TSP-1, thrombospondine-1; VEGF, facteur de croissance endothélial vasculaire.

Granules α	Granules δ	Granules λ
Glycoprotéines adhésives: fibrinogène, FW, TSP-1, fibronectine, vitronectine	Ca ²⁺	Hydrolases
Facteurs de la coagulation: facteurs V, XI, XIII, facteur tissulaire, kininogène de haut poids moléculaire	ADP	Métalloprotéases
Inhibiteurs de la fibrinolyse: α 2-anti-plasmine, PAI-1	ATP	
Facteurs de croissance: PDGF, TGF- β , EGF, VEGF, PF4	Sérotonine	
P-sélectine	Polyphosphate	
TLT-1	Pyrophosphate	
Albumine		

B. Le rôle des plaquettes en hémostase : l'hémostase primaire

Le processus d'hémostase inclut l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse, dont la première phase, l'hémostase primaire, est assurée par les plaquettes qui adhèrent, s'activent et agrègent au site lésé.

1. Les mécanismes moléculaires de l'hémostase primaire

Les mécanismes moléculaires de l'hémostase primaire ont été largement décrits. Suite à une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent aux protéines sous-endothéliales exposées au flux sanguin. En condition de flux rapide où les contraintes de cisaillement à la paroi sont importantes, le FW lié au collagène sous-endothélial recrute les plaquettes par interaction avec le complexe GPIb-IX-V (Savage et al., 1996). L'adhérence stable des plaquettes est assurée par l'interaction entre les intégrines de la famille $\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$, et leurs ligands respectifs le collagène, la fibronectine et les laminines (Bergmeier and Hynes, 2012). L'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ intervient également dans l'adhérence stable des plaquettes par liaison au FW et à la fibronectine sous-endothéliale. L'interaction entre le collagène et la GPVI déclenche une cascade de signalisation intracellulaire qui renforce l'activation plaquettaire (Zahid et al., 2012). Ceci se traduit par le changement de forme des plaquettes, qui se contractent et émettent des filopodes, et par la libération du contenu des granules plaquettaires comprenant l'ADP et l'ATP. Les plaquettes activées synthétisent et libèrent également du thromboxane A2 (TxA2). Ces agonistes solubles *via* leurs récepteurs, P2Y₁ et P2Y₁₂ pour l'ADP, P2X₁ pour l'ATP et le récepteur au thromboxane et aux prostaglandines (TP) pour le TxA2, amplifient l'activation plaquettaire en augmentant l'affinité de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ pour son ligand principal, le fibrinogène soluble. Ce dernier relie les plaquettes entre elles pour assurer leur agrégation et la constitution du clou hémostatique (Versteeg et al., 2013). Certaines plaquettes activées exposent à leur surface la phosphatidylsérine, un phospholipide chargé négativement, permettant le recrutement de facteurs de coagulation et la génération de thrombine aboutissant à la formation d'un réseau de fibrine insoluble qui stabilise l'agrégat et arrête les saignements en conditions physiologiques (Palta et al., 2014) (**Figure 8**).

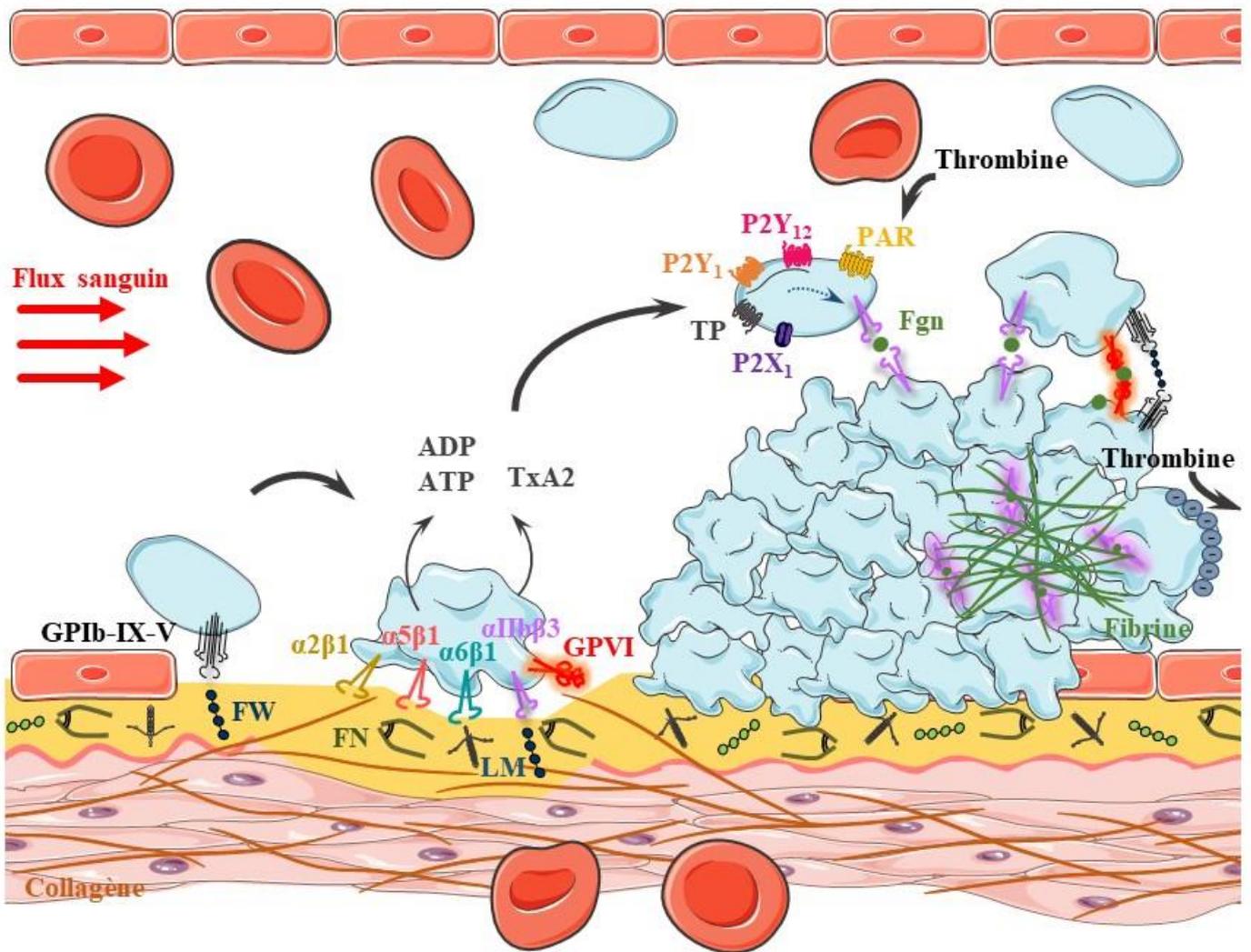


Figure 8 : Les mécanismes moléculaires de l'hémostase primaire. ADP, adénosine diphosphate; ATP, adénosine triphosphate; Fgn, fibrinogène; FN, fibronectine; FW, facteur Willebrand; GP, glycoprotéine; LM, laminines; PAR, *protease-activated receptor* ; TP, récepteur au thromboxane et aux prostaglandines; TxA2, thromboxane A2.

2. Les récepteurs plaquettaires impliqués dans l'hémostase primaire

L'hémostase primaire repose sur la capacité des plaquettes à former le clou hémostatique au site d'une lésion vasculaire afin de limiter le saignement. Ce processus est assuré par des récepteurs qui permettent l'adhérence, l'activation et l'agrégation plaquettaire. On distingue les récepteurs entraînant une signalisation basée sur des tyrosines kinases et les récepteurs aux agonistes solubles dont la majorité sont des récepteurs couplés aux protéines G même s'il existe un récepteur canal ionique, le récepteur P2X₁.

2.1. Les récepteurs entraînant une signalisation basée sur des tyrosine-kinases

2.1.1. Le complexe GPIb-IX-V

Le complexe GPIb-IX-V est exprimé uniquement dans la lignée mégacaryocytaire, c'est-à-dire dans les mégacaryocytes et les plaquettes. Il fait partie de la superfamille des protéines riches en leucines (Hickey et al., 1989; Lopez et al., 1988). C'est un multimère composé de quatre glycoprotéines transmembranaires : 2 sous-unités GPIb α liées à 4 sous-unités GPIb β par des ponts disulfures formant la sous-unité GPIb ; cette dernière est associée de manière non covalente à 2 sous-unités GPIX et à une ou deux sous-unités GPV (Du et al., 1987; Li and Emsley, 2013; Mo et al., 2012; Modderman et al., 1992). On retrouve 25 000 copies de GPIb-IX et 12 500 copies de GPV par plaquette (Modderman et al., 1992).

Le complexe GPIb-IX-V est le récepteur plaquettaire majeur du FW. Son rôle principal est d'assurer l'attachement des plaquettes par interaction avec le domaine A1 du FW sous-endothélial ou du FW plasmatique adsorbé sur la matrice exposée lors d'une lésion vasculaire (Andrews and Berndt, 2008). Il est le seul récepteur à assurer ce rôle à des taux de cisaillement supérieurs à 1,000 s⁻¹, tels que ceux qui sont présents dans les artères (Savage et al., 1996). Le site de liaison du FW se trouve sur la partie N-terminale de la sous-unité GPIb α . La GPIb α lie également la TSP-1, la thrombine, le FXII, le kininogène de haut poids moléculaire, la P-sélectine et l'intégrine leucocytaire α M β 2 (*macrophage-1 antigen* (Mac-1)) (Bradford et al., 1997, 2000; Jurk et al., 2003; Romo et al., 1999; Simon et al., 2000). Bien que le complexe n'ait pas de motif de signalisation propre identifié à ce jour, la liaison du FW au complexe

GPIb-IX-V entraîne une cascade de signalisation *via* la Src-kinase et la phospholipase (PL) C γ 2 menant à la mobilisation des stocks internes de calcium puis au changement de forme des plaquettes avec formation de filopodes et activation de l'intégrine α IIb β 3 (Mangin et al., 2003).

Un domaine mécano-sensible a été identifié sur la GPIb α (Zhang et al., 2015). En condition de cisaillement, il est exposé suite à la liaison d'un ligand et mène à la clairance des plaquettes (Deng et al., 2016). Il a été montré que ce domaine mécano-sensible serait impliqué dans les thrombopénies immunes par liaison d'auto-anticorps anti-GPIb α entraînant l'exposition du domaine en question (Quach et al., 2018) et dans les thrombopénies induites par les neuraminidases lors d'une infection (Wang et al., 2020). L'absence d'expression ou une anomalie de fonction d'une des sous-unités du complexe GPIb-IX, mène à une pathologie hémorragique appelée syndrome de Bernard-Soulier dont la prévalence est de 1/1 000 000. Ce syndrome est caractérisé par une macrothrombopénie ainsi qu'une augmentation du temps de saignement (Lanza, 2006). La pathologie est reproduite chez les souris déficientes pour GPIb α ou GPIb β (Kato et al., 2004; Strassel et al., 2007; Ware et al., 2000).

Le complexe GPIb-IX-V joue un rôle important en thrombose artérielle. Il a été montré que l'absence ou le blocage de ce complexe réduit la thrombose artérielle dans des modèles animaux (Bergmeier et al., 2006; Lei et al., 2014; Maurer et al., 2013; Strassel et al., 2007).

2.1.2. Les récepteurs entraînant une signalisation à partir d'un domaine ITAM

Un ITAM (*immunoreceptors tyrosine-based activation motif*) est un motif se situant sur la partie intra-cytoplasmique de certains récepteurs et qui est impliqué dans la transduction de signal menant à l'activation cellulaire. Il est composé de deux séquences d'acides aminés identiques séparées par 6 à 8 acides aminés. Cette séquence répétée comprend un résidu tyrosine suivi de deux acides aminés et d'un résidu leucine ou isoleucine (YxxL/I). Le résidu tyrosine de ce motif est phosphorylé par des tyrosine kinases, suite à l'interaction du récepteur avec son ligand, permettant ainsi de déclencher une cascade de signalisation. A la surface des plaquettes humaines, trois récepteurs contenant des domaines ITAM sont exprimés : le complexe GPVI/chaine γ des récepteurs Fc (FcR γ), *C-type lectin-like receptor-2* (CLEC-2) et Fc γ RIIA (Stegner et al., 2014).

2.1.2.1. La GPVI

La GPVI est une glycoprotéine transmembranaire de 62 kDa, composée de 339 acides aminés et dont le gène est codé par le chromosome 19 au niveau du locus q13.4 chez l'Homme (Clemetson et al., 1999; Jandrot-Perrus et al., 2000). La GPVI est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines (Ig) exprimé spécifiquement dans les plaquettes et les mégacaryocytes, où elle est co-exprimée avec la FcR γ (Jandrot-Perrus et al., 2000). On trouve 3 000 à 5 000 copies de ce complexe par plaquette (Best et al., 2003).

La structure de la GPVI

La GPVI comporte deux domaines extracellulaires de type Ig du côté N-terminal : les domaines D1 et D2 qui permettent l'interaction avec les ligands, D1 étant le site majoritaire, suivi d'un domaine mucine-like riche en sérine et thréonine liant les domaines extracellulaires à la partie transmembranaire de la GPVI. Dans la région transmembranaire se trouve un résidu arginine chargé positivement, qui permet de lier de manière non covalente la GPVI au domaine transmembranaire de FcR γ (Morton et al., 1995). L'association de FcR γ à la GPVI est nécessaire à son expression de surface et initie sa signalisation (Nieswandt et al., 2000). La région cytoplasmique de la GPVI, composée de 51 acides aminés chez l'Homme et de 27 acides aminés chez la souris (Jandrot-Perrus et al., 2000), est divisée en quatre régions : i) la partie juxtamembranaire qui est également impliquée dans l'interaction avec FcR γ (Bori-Sanz et al., 2003) ; ii) la région riche en acide aminés basiques qui interagit avec FcR γ et lie la calmoduline (Andrews et al., 2002; Bori-Sanz et al., 2003) impliquée dans la signalisation calcique et régulant la perte de l'ectodomaine de GPVI (Gardiner et al., 2004) ; iii) la partie centrale de la région cytoplasmique comprend un domaine riche en proline qui interagit avec les tyrosine kinases de la famille Src, Fyn et Lyn, associées de manière constitutive à la GPVI et impliquées dans l'initiation de la signalisation de la GPVI (Suzuki-Inoue et al., 2002) ; et iv) la région C terminale, dont le rôle n'est pas connu (**Figure 9**).

Sur les plaquettes au repos, la GPVI est majoritairement exprimée sous une forme monomérique, la forme dimérique ne représentant que 20 à 30% de la GPVI (Jung et al., 2012). Suite à l'activation plaquettaire, même faible, la proportion de GPVI dimérique augmente de manière significative jusqu'à 40 à 50%. Cette dernière présente une affinité augmentée pour le collagène (Jung et al., 2012; Loyau et al., 2012).

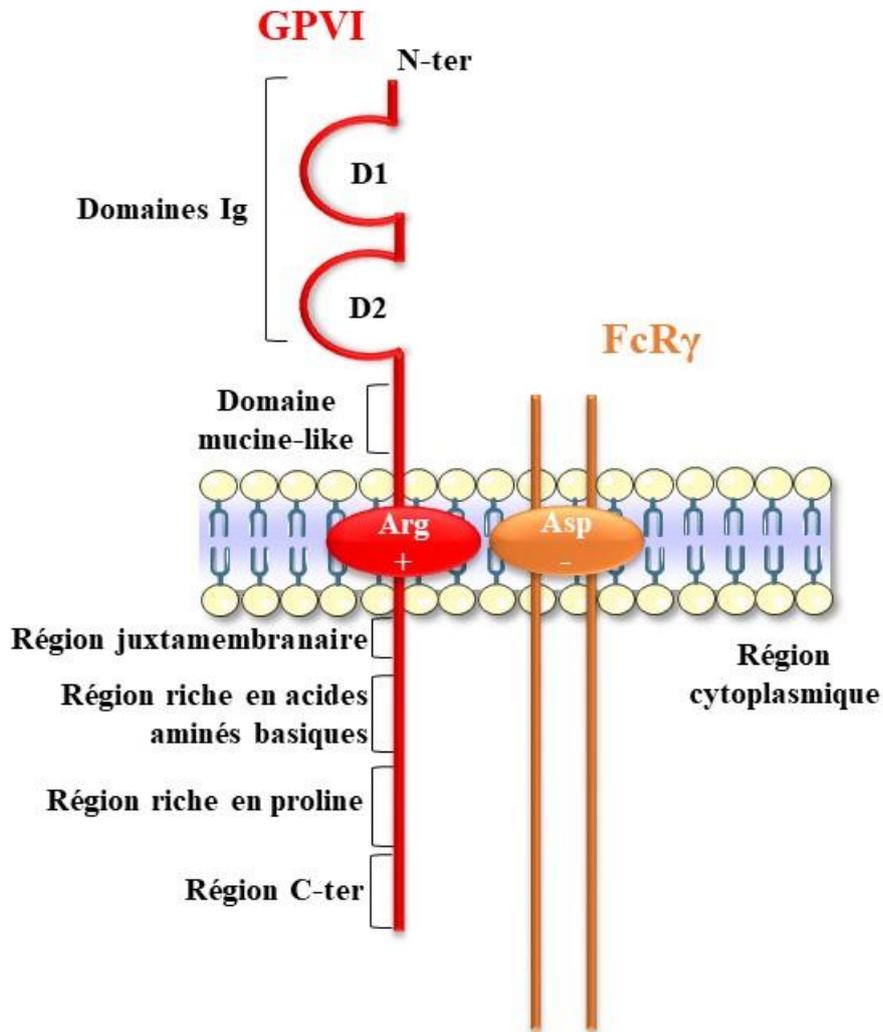


Figure 9 : La structure du complexe GPVI/FcR γ . Arg, arginine; Asp, aspartate; D1, domaine 1; D2, domaine 2; FcR γ , chaîne γ des récepteurs Fc; GP, glycoprotéine.

Les ligands de la GPVI

La GPVI est connue pour être le principal récepteur d'activation plaquettaire au collagène fibrillaire (Nieswandt and Watson, 2003; Nieswandt et al., 2001a). Elle a également été décrite comme étant un récepteur d'autres protéines adhésives dont le fibrinogène (Induruwa et al., 2018; Mangin et al., 2018), la fibrine (Alshehri et al., 2015; Induruwa et al., 2018; Mammadova-Bach et al., 2015; Onselaer et al., 2017) et les laminines (Inoue et al., 2006; Schaff et al., 2013). Une controverse existe quant à l'interaction entre la GPVI et la fibronectine. En effet, Bültmann *et al* ont proposé que la fibronectine serait un ligand de la GPVI (Bültmann et al., 2010), mais quelques années plus tard il a été démontré au laboratoire que la GPVI ne

jouerait pas de rôle majeur dans l'adhérence et l'activation des plaquettes sur fibronectine plasmatique ou tissulaire, qu'elle soit sous forme soluble ou fibrillaire (Maurer et al., 2015a). Enfin, d'autres ligands endogènes ont été proposés dans la littérature : la vitronectine (Schönberger et al., 2012), l'adiponectine (Riba et al., 2008) et l'*extracellular matrix metalloproteinase inducer* (EMMPRIN) (Seizer et al., 2009), mais ces résultats n'ont pas encore été confirmés.

La signalisation et la fonction de la GPVI

La signalisation de la GPVI a été particulièrement bien étudiée. Ce travail s'est notamment appuyé sur des ligands spécifiques de la GPVI, comme le *collagen-related peptide* (CRP), un peptide mimant la structure en triple hélice du collagène et contenant une séquence Glycine-Proline-Hydroxyproline (Gly-Pro-Hyp) répétée dix fois (Asselin et al., 1999; Knight et al., 1999) ainsi que des venins de serpent comme la convulxine (Jandrot-Perrus et al., 1997; Polgár et al., 1997), l'ophioluxine (Du et al., 2002) et l'alborhagine (Andrews et al., 2001).

La liaison du collagène avec le domaine D1 extracellulaire de la GPVI entraîne la multimérisation du récepteur permettant de rapprocher les tyrosine kinases Fyn et Lyn, interagissant avec le domaine intracellulaire de la GPVI, des domaines ITAM de FcR γ . Ceci entraîne la phosphorylation des tyrosines du domaine ITAM et mène à son activation (Ezumi et al., 1998; Quek et al., 2000) permettant le recrutement de la *spleen tyrosine kinase* (Syk) via les domaines *Src Homology 2* (SH2). Syk s'autophosphoryle et à son tour phosphoryle la *src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa* (SLP-76) (Gross et al., 1999) et *linker for activation of T cells* (LAT) (Pasquet et al., 1999). LAT phosphorylé lie la PLC γ 2, la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), la protéine adaptatrice *Grb2-related adapter downstream of Shc* (Gads), la protéine kinase de Bruton (Btk) et les Vav1 et 3 formant ainsi le complexe de signalisation LAT (Watson et al., 2005). Ce complexe conduit à l'activation de PLC γ 2 qui génère de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) conduisant respectivement à la mobilisation de calcium et à l'activation de la protéine kinase C (PKC). L'ensemble de ces événements conduit à la dégranulation des plaquettes, à l'activation des intégrines et donc à l'agrégation plaquettaire (Watson et al., 2005). On retrouve un défaut d'agrégation en réponse au collagène chez les patients, mais aussi chez les souris, déficients en GPVI (Jandrot-Perrus et al., 2019; Nieswandt et al., 2001b). De plus, la signalisation de la GPVI entraîne l'exposition de phosphatidylsérine anionique à la surface des plaquettes et participe donc à leur activité procoagulante (Heemskerk et al., 2005) (**Figure 10**).

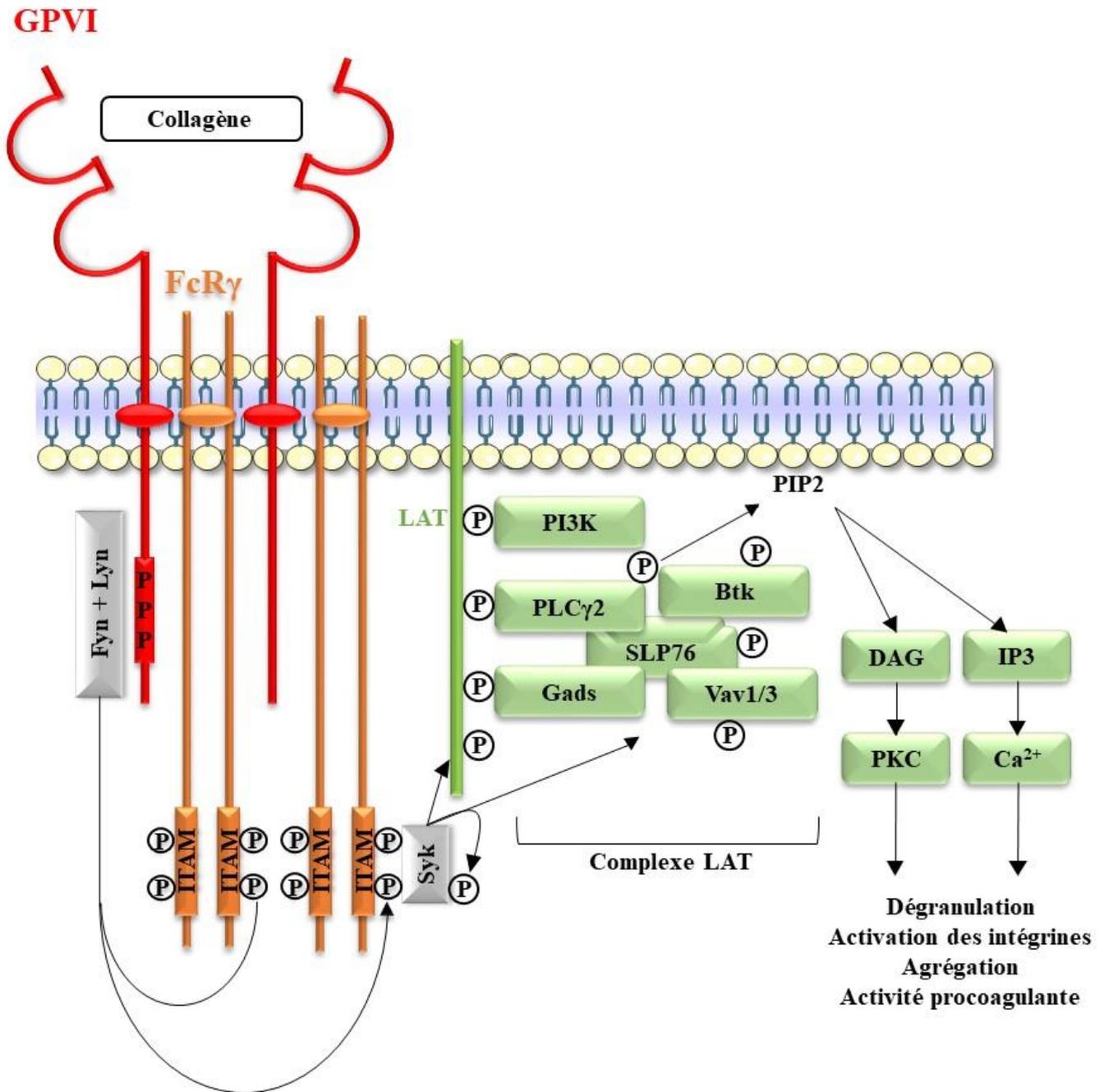


Figure 10 : La voie de signalisation déclenchée par le complexe GPVI/FcR γ . DAG, diacylglycérol; Fyn, tyrosine-protein kinase Fyn; Gads, Grb2-related adapter downstream of Shc; GPVI, glycoprotéine VI; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; ITAM immunoreceptor tyrosine-based activation motif; LAT, linker for activation of T cells; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PIP2, phosphatidylinositol 4',5'-bisphosphate; PKC, protéine kinase C; PLC γ 2, phospholipase C γ 2; SLP76, protéine adaptatrice *scr* homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa; Syk, spleen tyrosine kinase (Adapté de Rayes *et al.*, 2019).

Le rôle de la GPVI dans la formation d'un agrégat ne se limite pas à sa capacité à activer les plaquettes après interaction avec le collagène exposé dans une paroi vasculaire lésée. En effet, il a été proposé que son interaction avec la fibrine qui est générée au cours de la formation d'un caillot, renforce l'adhérence, l'activation et les fonctions procoagulantes des plaquettes (Alshehri et al., 2015; Mammadova-Bach et al., 2015). Enfin, la GPVI est également impliquée dans la croissance du thrombus par sa capacité à lier le fibrinogène présent dans toutes les couches d'un agrégat. En effet, un travail du laboratoire a montré que la perfusion de sang traité avec un anticorps bloquant anti-GPVI inhibe fortement la croissance du thrombus (Mangin et al., 2018).

Le rôle de la GPVI en hémostasie

Les informations concernant le rôle de la GPVI en hémostasie ont été recueillies en grande partie grâce aux patients présentant un défaut de ce récepteur. Chez l'Homme, la déficience en GPVI peut être acquise ou congénitale. Dans la majorité des cas, les patients présentent des défauts acquis dus à la présence d'autoanticorps anti-GPVI (Bellucci et al., 2005; Boylan et al., 2004; Sugiyama et al., 1987; Takahashi and Moroi, 2001). A ce jour, uniquement quelques patients présentant des mutations de la GPVI ont été identifiés (Dumont et al., 2009; Hermans et al., 2009; Matus et al., 2013). Ces patients sont généralement identifiés suite à la présence de saignements mineurs de type purpura ou épistaxis (Jandrot-Perrus et al., 2019). On peut reproduire cette déficience génétique chez une souris *knock-out* (KO) pour la GPVI mais également chez des souris traitées avec anticorps anti-GPVI, JAQ1, induisant une immunodéplétion de la GPVI à la surface des plaquettes (Kato et al., 2003; Nieswandt et al., 2001b). Il a été montré que ces souris ne présentent pas de prolongement du temps de saignement après une section de l'extrémité de leur queue. L'ensemble de ces observations indique que la GPVI ne serait pas indispensable à l'hémostasie.

Le rôle de la GPVI en thrombose artérielle

De nombreuses études qui se basent sur des modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* ont identifié un rôle important de la GPVI en thrombose artérielle (Bender et al., 2011; Dubois et al., 2006; Hechler et al., 2010; Konstantinides et al., 2006; Massberg et al., 2003). La majorité des études *in vivo* se sont appuyées sur des modèles expérimentaux réalisés sur des vaisseaux sains qui ne représentent que peu les conditions retrouvées chez les patients. Des études de deux

groupes différents ont confirmé le rôle central de la GPVI en thrombose artérielle en se basant sur des modèles de thrombose expérimentale après rupture d'une plaque d'athérosclérose chez des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE), se rapprochant d'avantage des conditions retrouvées en clinique (Hechler and Gachet, 2011a; Kuijpers et al., 2009).

2.1.2.2. CLEC-2

CLEC-2 est un récepteur transmembranaire de la famille des *C-type lectin*. C'est un *hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (hemITAM) puisque sa partie cytoplasmique comporte une seule séquence YxxL, contrairement aux récepteurs ITAM classiques qui présentent une répétition (Raves et al., 2019). Il est codé par le gène *CLEC1B* du chromosome 12 au niveau du locus p13.31 du génome humain. CLEC-2, d'un poids moléculaire entre 32 et 40 kDa, est exprimé sur les plaquettes humaines à raison de 2 000 à 4 000 copies par plaquette (Gitz et al., 2014). On le retrouve également sur les monocytes, les cellules dendritiques, les granulocytes, les cellules *natural killer* (NK) et les cellules Kupffer du foie chez l'Homme (Colonna et al., 2000). A ce jour, aucun cas de patients déficients en CLEC-2 n'a été décrit.

CLEC-2 a été identifié par chromatographie d'affinité comme étant un récepteur à la rhodocytine, un venin de serpent (Suzuki-Inoue et al., 2006). La podoplanine, une glycoprotéine transmembranaire, a par la suite été identifiée comme ligand endogène de CLEC-2 (Suzuki-Inoue et al., 2007) et c'est le seul connu à ce jour. La podoplanine est exprimée par les cellules endothéliales lymphatiques, les podocytes rénaux, les cellules alvéolaires type I et le plexus choroïde (Breiteneder-Geleff et al., 1997; Rishi et al., 1995; Tomooka et al., 2013). On la retrouve également au niveau des cellules endothéliales des capillaires cutanés chez des patients présentant des maladies inflammatoires de type eczéma ou psoriasis (Gröger et al., 2007). Elle est cependant absente du réseau vasculaire en condition normale, ce qui soulève des questions sur le rôle physiologique de l'interaction entre CLEC-2 et la podoplanine. Il a été proposé que l'interaction entre CLEC-2 plaquettaire et la podoplanine est impliquée dans la séparation des vaisseaux sanguins et lymphatiques lors du développement embryonnaire (Bertozzi et al., 2010; Suzuki-Inoue et al., 2010). Ce récepteur est également impliqué dans la régénération tissulaire. En effet, il a été mis en évidence qu'au niveau de lésions cutanées les kératinocytes expriment la podoplanine et que les plaquettes, *via* l'expression de CLEC-2, régulent la fonction de la

podoplanine, diminuant ainsi la migration des kératinocytes lors de la réépithélialisation de l'épiderme (Asai et al., 2016).

La liaison d'un ligand à CLEC-2 induit le regroupement des récepteurs, la phosphorylation du résidu tyrosine de l'hémITAM, ce qui entraîne l'activation de Syk ainsi que la phosphorylation et l'activation de LAT, SLP-76, Btk et PLC γ 2 (Fuller et al., 2007; Spalton et al., 2009; Suzuki-Inoue et al., 2006). Cette voie de signalisation conduit alors à l'activation et l'agrégation plaquettaire, notamment *via* la sécrétion du contenu des granules plaquettaires et la formation de TxA2 (Lombard et al., 2018) (**Figure 11**). CLEC-2 ne semble pas jouer de rôle clé en hémostase puisque chez des souris n'exprimant pas CLEC-2 sur les cellules hématopoïétiques ou dont la voie de signalisation de CLEC-2 n'est pas fonctionnelle, le temps de saignement n'est pas altéré (Haining et al., 2017; Hughes et al., 2010; Suzuki-Inoue et al., 2010).

Un rôle de CLEC-2 en thrombose expérimentale a été mis en évidence. Le KO de CLEC-2 étant létal, deux approches ont été utilisées : la première repose sur la transplantation de cellules de foie fœtal de souris CLEC-2^{-/-} dans des souris irradiées, permettant ainsi d'obtenir des souris n'exprimant pas CLEC-2 au niveau des cellules sanguines, en particulier au niveau des plaquettes (Inoue et al., 2015; Suzuki-Inoue et al., 2010) ; la seconde approche est basée sur l'administration d'un anticorps anti-CLEC-2, INU1, qui entraîne une immunodéplétion de CLEC-2 à la surface des plaquettes (Bender et al., 2013; May et al., 2009). L'utilisation de ces souris a permis de montrer une réduction de la thrombose expérimentale dans des modèles de lésion des artérioles mésentériques ou de l'artère fémorale induite par une application de chlorure de fer ou l'utilisation d'un laser. A ce jour, le ligand de CLEC-2 induisant son activation lors d'une thrombose artérielle n'a probablement pas encore été identifié. Il semble peu probable que la podoplanine soit impliquée dans la thrombose expérimentale dans la souris puisqu'elle ne se trouve ni sur les cellules endothéliales vasculaires ni sur les cellules sanguines. En revanche, la podoplanine est exprimée dans les plaques d'athérosclérose mais uniquement en son centre, pas en surface (Inoue et al., 2015), suggérant un potentiel rôle de l'interaction podoplanine-CLEC-2 en thrombose artérielle après rupture de plaque. Il a également été mis en évidence que CLEC-2 serait impliqué en thrombose artérielle indépendamment de la signalisation hémITAM. Des souris présentant le récepteur CLEC-2 mais sans voie de signalisation fonctionnelle n'ont pas mis en évidence de protection contre la thrombose dans le modèle au chlorure de fer sur les artères mésentériques, cependant le traitement de ces mêmes souris par un fragment Fab bloquant la fonction de CLEC-2 les protège contre la thrombose,

mettant en évidence un rôle de CLEC-2 en thrombose artérielle indépendamment de sa voie de signalisation (Haining et al., 2017).

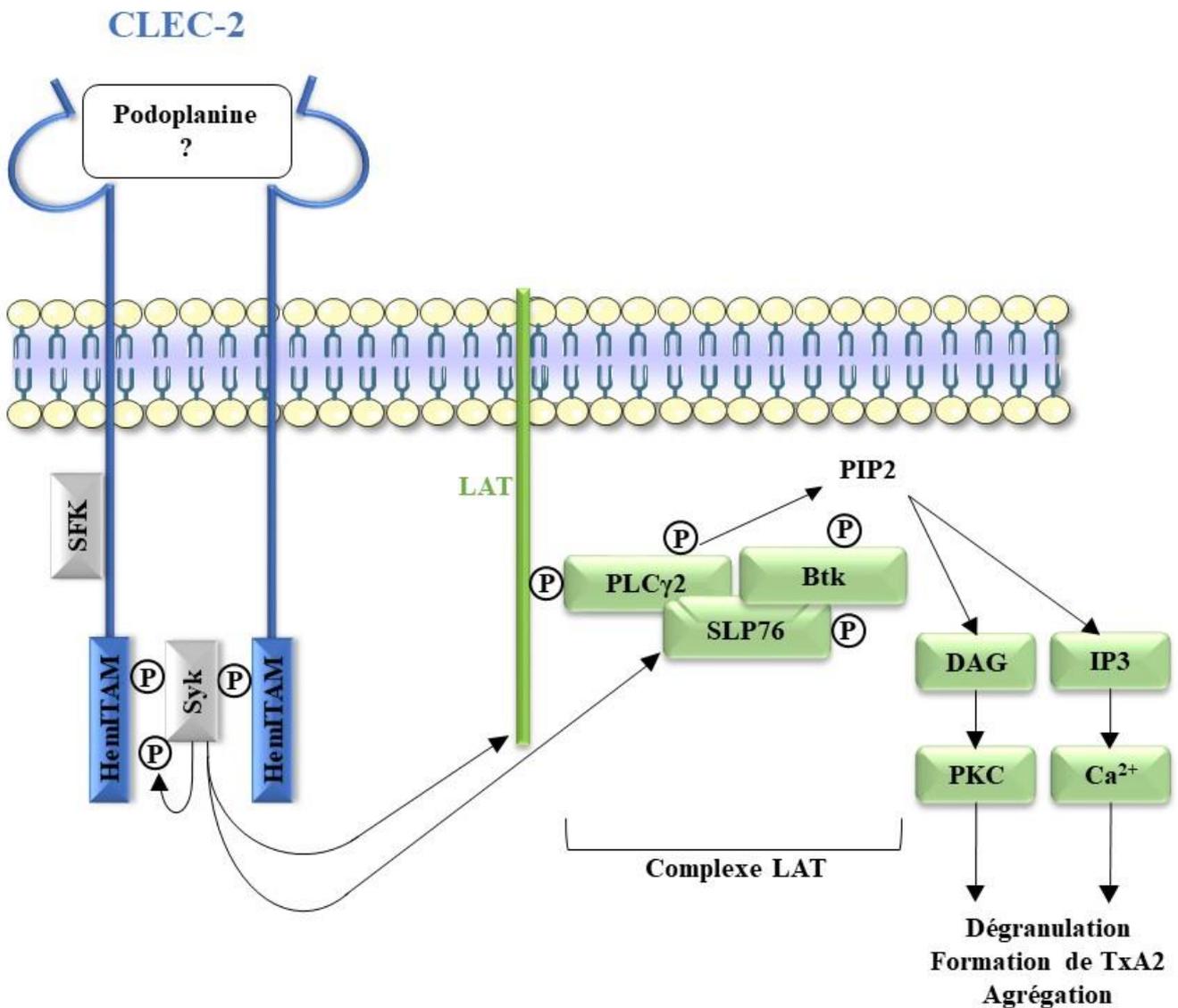


Figure 11 : La voie de signalisation déclenchée par le récepteur CLEC-2. Btk, *Bruton tyrosine kinase*; CLEC-2, *C-type lectin-like receptor-2*; DAG, diacylglycérol; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; ITAM *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*; LAT, *linker for activation of T cells*; PIP2, phosphatidylinositol 4',5'-bisphosphate; PKC, protéine kinase C; PLCγ2, phospholipase Cγ2; SFK, kinase de la famille des Src; SLP76, protéine adaptatrice *scr homology 2 domain-countaining leukocyte phosphoprotein of 76 kDa*; Syk, *spleen tyrosine kinase*; TxA2, thromboxane A2 (Adapté de Rayes et al., 2019).

2.1.2.3. FcγRIIA

Le récepteur FcγRIIA, aussi appelé CD32a, est un récepteur transmembranaire de la famille des récepteurs à la partie constante (Fc) des Ig, appartenant au sous-groupe FcRγ (Daëron, 1997). Il est codé par le gène *FCGR2* situé sur le chromosome 1 au niveau du locus q23. FcγRIIA est principalement exprimé sur les cellules du système immunitaire dont les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (Bruhns, 2012). Il a été identifié sur les plaquettes humaines (Rosenfeld et al., 1985), où l'on en trouve 1 000 à 4 000 copies par plaquette (Tomiyama et al., 1992). C'est le seul récepteur aux IgG exprimé sur les plaquettes. L'expression de FcγRIIA est limitée aux primates et n'est pas retrouvée chez la souris (Bruhns, 2012).

Le récepteur FcγRIIA est composé de deux domaines extracellulaires Ig-like D1 et D2, dont le deuxième est responsable de la liaison au ligand (Maxwell et al., 1999). On trouve également un domaine transmembranaire suivi d'une queue cytoplasmique contenant un domaine ITAM avec deux séquences consensus YxxL. Le motif ITAM de FcγRIIA est atypique puisqu'il comporte 12 acides aminés entre les deux séquences YxxL, plutôt que les 6 à 8 acides aminés retrouvés classiquement (Arman and Krauel, 2015).

Le FcγRIIA est un récepteur de faible affinité pour les IgG monomériques mais présente une affinité plus importante pour les complexes immuns (Karas et al., 1982). Il est activé par des auto-anticorps anti-complexe héparine-facteur plaquettaire 4 (PF4) lors des thrombopénies induites par l'héparine, mais aussi par les IgGs agrégées et les IgGs opsonisées sur des pathogènes (Arman and Krauel, 2015). La liaison de la partie Fc d'un IgG à FcγRIIA entraîne la dimérisation du récepteur (Ramsland et al., 2011) puis la phosphorylation et l'activation des tyrosines du domaine ITAM de la queue cytoplasmique par la famille des Src kinases (Fyn et Lyn). Les ITAM phosphorylés deviennent le site d'ancrage du domaine SH2 de la protéine Syk (Yanaga et al., 1995). Syk active alors PLCγ2 et la voie PI3K (Gratacap et al., 1998). L'activation de FcγRIIA conduit à l'étalement des plaquettes, à la mobilisation calcique, à la libération du contenu des granules et à l'agrégation des plaquettes *via* les intégrines (Arman and Krauel, 2015). Le FcγRIIA ne semble pas avoir de rôle direct en hémostase, mais il pourrait contribuer à l'activation des plaquettes dans un contexte immunitaire ou inflammatoire.

Il existe une coopération entre le FcγRIIA et d'autres récepteurs plaquettaires permettant l'activation de la voie de signalisation sans ligand spécifique de FcγRIIA. En effet, il a été proposé que la liaison d'un ligand à l'intégrine αIIbβ3 entrainerait la phosphorylation du

domaine ITAM de Fc γ RIIA recrutant alors Syk qui amplifierait les signaux intraplaquettaires (Boylan et al., 2008). La coopération entre le Fc γ RIIA et l'intégrine α IIb β 3 indépendamment de la présence d'IgG a d'ailleurs été confirmée chez des souris transgéniques exprimant le récepteur Fc γ RIIA humain (Zhi et al., 2013). Enfin, il a été proposé que la liaison d'un ligand à la GPIIb α entraînerait l'activation des composants de la cascade de signalisation de Fc γ RIIA, mais cette observation n'a pas été confirmée (Canobbio et al., 2001; Sullam et al., 1998).

Un polymorphisme de Fc γ RIIA dû au remplacement d'une arginine par une histidine en position 131 a été mis en évidence dans la population générale ce qui augmente l'affinité pour les IgG (Warmerdam et al., 1991). Ce polymorphisme est associé à des maladies immunitaires, inflammatoires et cardiaques (Kroupis et al., 2010). De plus, une augmentation de l'expression de Fc γ RIIA à la surface des plaquettes aurait été mise en évidence chez des patients présentant une thrombose artérielle sur plaque d'athérosclérose, un diabète, une maladie rénale ou un AVC ischémique (Calverley et al., 2002; Serrano et al., 2007). Enfin, les patients présentant des maladies liées à la présence de complexes immuns développent souvent une hypercoagulabilité et sont à risque thrombotique (Zhi et al., 2015).

2.1.3. Les intégrines

Les intégrines représentent une superfamille de récepteurs transmembranaires. Elles sont nommées ainsi du fait de leur complexe transmembranaire responsable de l'intégration des signaux venant du domaine extracellulaire vers le cytosquelette (Tamkun et al., 1986). Les intégrines sont des hétérodimères résultant de l'association non covalente de deux chaînes glycoprotéiques α et β . Chaque sous-unité comprend un domaine extracellulaire N-terminal, une hélice transmembranaire et un court domaine cytoplasmique C-terminal (Campbell and Humphries, 2011). Chez l'Homme, on trouve 24 intégrines dues à diverses combinaisons de 18 sous-unités α et de 8 sous-unités β (Barczyk et al., 2010).

Les intégrines sont des récepteurs qui régulent l'adhérence, la migration, la prolifération, l'étalement et l'apoptose des cellules, et participent à de très nombreux processus physiopathologiques dont l'hémostase, la thrombose, le cancer et les réponses immunitaires (Hynes, 2002). Elles répondent à la liaison de ligands solubles, de ligands présents à la surface cellulaire, de la matrice extracellulaire ou de contre-récepteurs comme la GPIIb par exemple.

L'activation des intégrines

La stimulation d'une cellule par un signal intracellulaire appelé signalisation *inside-out* entraîne l'activation de l'intégrine marquée par un changement de conformation ainsi qu'un regroupement à la surface membranaire. Le changement de conformation du domaine extracellulaire augmente l'affinité de l'intégrine pour les ligands (Luo et al., 2007). Des études de microscopie électronique ont permis de montrer que les intégrines se présentent sous trois conformations différentes (Takagi et al., 2002) :

- L'état de repos : l'ectodomaine de l'intégrine se trouve dans une conformation fermée et repliée sur elle-même formant un V inversé. Elle possède alors une faible affinité pour les ligands extracellulaires puisque leur site de liaison se trouve proche de la surface membranaire
- L'état intermédiaire : l'intégrine s'étend mais la tête globulaire reste fermée. Elle présente une affinité intermédiaire pour ses ligands
- Et l'état de forte affinité : l'intégrine est étirée et la tête présente une configuration ouverte exposant le site de liaison des ligands (**Figure 12**).

Les intégrines subissent également un regroupement en oligomères ce qui permet d'augmenter l'avidité pour leurs ligands (Carman and Springer, 2003). Le changement de conformation et le regroupement des intégrines vont, *via* la reconnaissance des ligands extracellulaires, initier une cascade de signalisation intracellulaire *outside-in* (Luo et al., 2007). Les intégrines sont donc des récepteurs membranaires capables de transmettre une signalisation bidirectionnelle entre les milieux intra et extracellulaires.

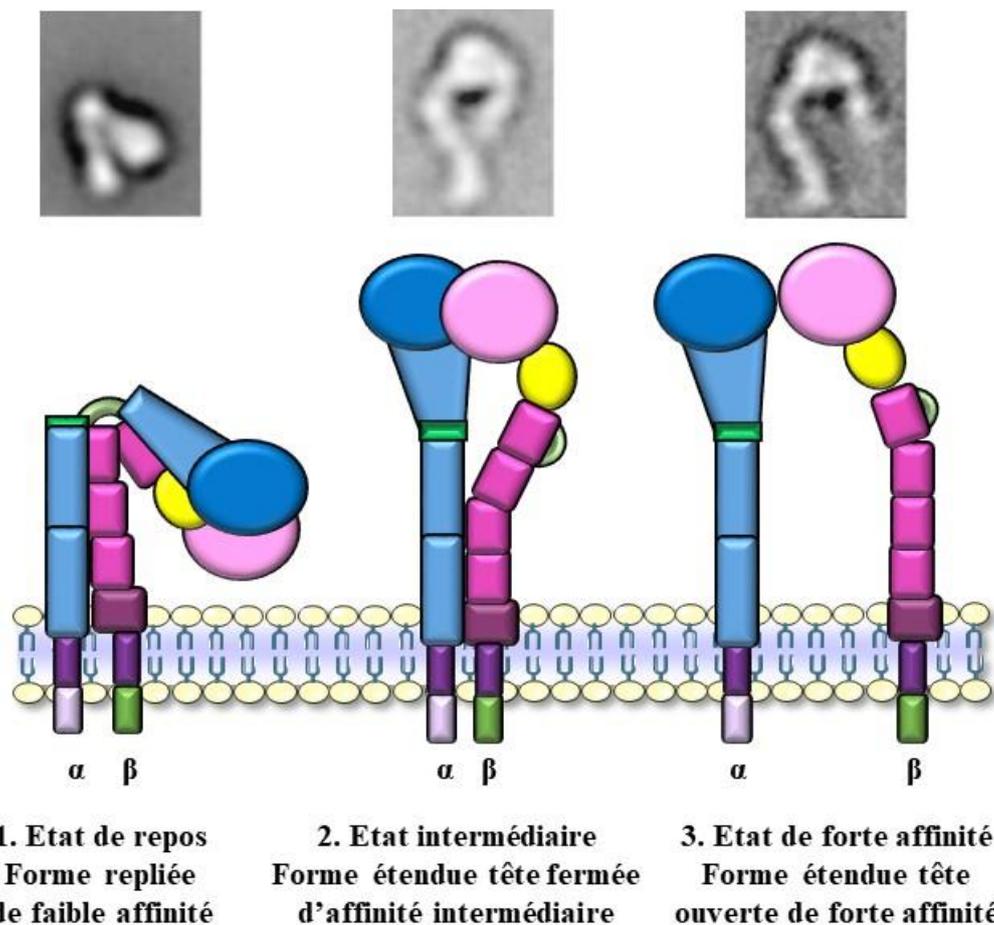


Figure 12 : Les différentes conformations des intégrines (Adapté de Carman *et al.*, 2003 et Luo *et al.*, 2007).

La structure des intégrines

Au niveau structurel, la partie extracellulaire des intégrines est composée en N-terminal d'un domaine à hélices β pour la sous-unité α et d'un domaine *A-like* pour la sous-unité β , les deux s'assemblant pour former une tête globulaire qui constitue le site de liaison des ligands (Zhu *et al.*, 2008). Le segment transmembranaire est composé de deux hélices parallèles, une pour chaque sous-unité, dont la séparation serait nécessaire à la signalisation de l'intégrine (Hu and Luo, 2015). Enfin, les courts segments intra-cytoplasmiques des sous-unités interagiraient de façon non covalente, interaction qui est modifiée lors de la signalisation *inside-out* induisant le changement de conformation de l'intégrine (Vinogradova *et al.*, 2004).

Les intégrines plaquettaires

Au niveau plaquettaire, deux familles d'intégrines sont exprimées. D'une part les intégrines $\beta 1$ qui assurent l'adhérence aux protéines de la matrice extracellulaire avec l' $\alpha 2\beta 1$, l' $\alpha 5\beta 1$ et l' $\alpha 6\beta 1$ liant respectivement le collagène (Staatz et al., 1989), la fibronectine (Piotrowicz et al., 1988) et les laminines (Sonnenberg et al., 1988). Et d'autre part, les intégrines $\beta 3$, avec l' $\alpha IIb\beta 3$ impliquée dans l'agrégation des plaquettes et l' $\alpha v\beta 3$ dont aucun rôle en hémostase n'a été identifié à ce jour.

Le mécanisme moléculaire de l'activation des intégrines plaquettaires

Au niveau moléculaire, la liaison d'agonistes comme le FW, le collagène, l'ADP, le TxA2 ou la thrombine à leurs récepteurs plaquettaires respectifs initie la signalisation *inside-out* des intégrines, un processus bien décrit pour l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$, avec notamment l'activation des voies PLC β ou PLC γ . La PLC génère du DAG et de l'IP3, activant respectivement la PKC et mobilisant le calcium intracellulaire, ce qui conduit à l'activation de *Ras-related protein* (Rap) 1b via la protéine *Calcium and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor I* (CalDAG-GEFI) ou PI3K (Woulfe et al., 2002). Rap1b activé interagit avec la taline qui interagit elle-même avec la queue cytoplasmique des sous-unités $\beta 3$ et permet la signalisation *inside-out* des intégrines (Bromberger et al., 2018). L'importance de Rap1b a été démontré dans une souris KO qui présente une augmentation du temps de saignement et qui est protégée dans un modèle de thrombose expérimentale (Chrzanowska-Wodnicka et al., 2005). D'autre part, les souris dont la sous-unité $\beta 3$ n'interagit pas avec la taline ou présentant une déficience en taline-1 présentent une diminution de la signalisation *inside-out* d' $\alpha IIb\beta 3$ ayant pour conséquence un défaut d'agrégation plaquettaire et une augmentation du temps de saignement (Nieswandt et al., 2007; Petrich et al., 2007). De plus, il a été montré que la signalisation *inside-out* des intégrines $\beta 3$ plaquettaires nécessite la présence de kindline-3 qui coopère avec la taline : la kindline-3 augmenterait l'interaction de la taline avec la sous unité β (Haydari et al., 2020). Une perte de fonction de la kindline-3 induit un défaut d'agrégation des plaquettes à la fois chez la souris (Moser et al., 2008) et chez l'Homme (Malinin et al., 2009) ainsi que des saignements importants (**Figure 13**). Outre Rap1b, taline et kindline, d'autres protéines seraient impliquées dans l'activation de la signalisation *inside-out* des intégrines $\beta 3$ comme la *integrin-linked kinase* (ILK) (Tucker et al., 2008). On retrouve également l'*adhesion and degranulation promoting adapter protein* (ADAP) (Kasirer-Friede et al., 2014), la $\beta 3$ -endonexine (Kashiwagi et al., 1997), la vinculine (Ohmori et al., 2010) et la famille des *kindlin*

binding proteins (KBPs) avec les protéines paxilline et Hic-5 (Gao et al., 2017; Kim-Kaneyama et al., 2012).

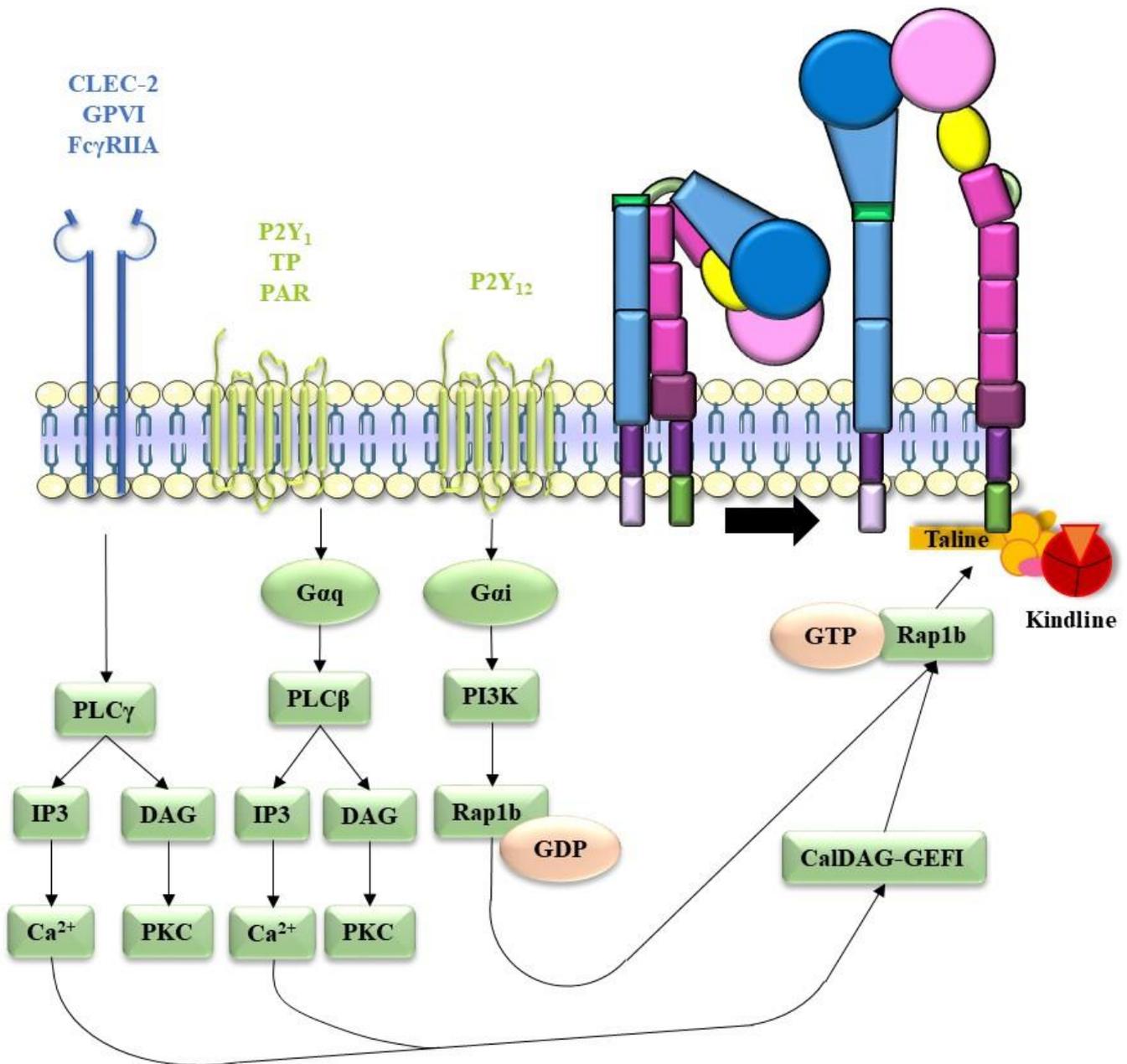


Figure 13 : Les mécanismes moléculaires de l'activation des intégrines β_3 plaquettaires (signalisation *inside-out*). CalDAG-GEFI, *calcium and DAG-regulated guanine-nucleotide-exchange factor*; CLEC-2, *C-type lectin-like receptor-2*; DAG, diacylglycérol; GDP, guanosine diphosphate; GPVI, glycoprotéine VI; GTP, guanosine triphosphate; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; PAR, *protease-activated receptor*; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protéine kinase C; PLC β , phospholipase C β ; PLC γ , phospholipase C γ ; Rap1b, *Ras-related protein 1b*; TP, récepteur au thromboxane et aux prostaglandines (Adapté de Stefanini *et al.*, 2015).

Il existe aussi des régulateurs négatifs de la signalisation *inside-out* des intégrines $\beta 3$ plaquettaires. La *Ras GTPase-activating protein 3* (Rasa3) est un inhibiteur de l'activation plaquettaire agissant sur la signalisation *inside-out* des intégrines puisqu'elle est impliquée dans l'inactivation de Rap1b, lui-même responsable de l'activation des intégrines (Stefanini et al., 2015). D'autres protéines seraient également impliquées dans la régulation négative des intégrines comme l' α -actinine (Tadokoro et al., 2011), la *calcium and integrin-binding protein 1* (CIB1) (Yuan et al., 2006), la *docking protein 1* (Dok1) (Wegener et al., 2007), la filamine (Berrou et al., 2017) et la tensine 1 (McCleverty et al., 2007).

En ce qui concerne les intégrines $\beta 1$, les voies initiant le signal *inside-out* sont nettement moins bien connues. Cependant, pour l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, il a été montré que l'activation de l'intégrine $\alpha I\text{Ib}\beta 3$ serait nécessaire et suffisante à son signal *inside-out* (Van de Walle et al., 2007). En effet, une stimulation des plaquettes lavées induit une activation faible d' $\alpha 2\beta 1$, activation qui est largement augmentée lors de l'ajout de fibrinogène. De même, l'utilisation d'un antagoniste d' $\alpha I\text{Ib}\beta 3$ ou de plaquettes de patients présentant une thrombasthénie de Glanzmann et donc n'exprimant pas d'intégrines $\alpha I\text{Ib}\beta 3$, inhibe l'activation de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, que ce soit en conditions statique ou de flux (Van de Walle et al., 2007). Enfin, contrairement à ce qui se passe pour l' $\alpha I\text{Ib}\beta 3$, les kindlines (1 et 2 dans ce cas) n'exerceraient pas un effet de synergie avec la taline pour activer l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, mais au contraire inhiberaient l'activation induite par la taline (Harburger et al., 2009).

2.1.3.1. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$

Au niveau plaquettaire, l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ varie de 3 000 à 5 000 copies par plaquette (Burkhart et al., 2012). Il existe chez l'Homme un polymorphisme de la chaîne $\alpha 2$ responsable d'une variation de son niveau d'expression (Di Paola et al., 2005). Outre la lignée mégacaryocytaire (Santoro et al., 1988), l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est aussi exprimée entre autres par les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Hemler et al., 1987; Languino et al., 1989).

L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est le premier récepteur au collagène à avoir été identifié sur les plaquettes (Santoro et al., 1988). Elle reconnaît la séquence glycine – phénylalanine – hydroxyproline – glycine – glutamate – arginine (GFOGER) du collagène de type I avec une

forte affinité (Knight et al., 2000). Le domaine de liaison du collagène, appelé domaine I, se trouve sur la sous-unité $\alpha 2$ et est un homologue du domaine A3 du FW qui permet sa liaison au collagène sous-endothélial. La liaison du collagène à l' $\alpha 2\beta 1$ déclenche une signalisation *outside-in* proche de celle de la GPVI en terme de molécules de signalisation impliquées, mais d'intensité plus faible, conduisant à la libération de calcium intracellulaire et renforçant l'activation des intégrines. Cela engendre donc le changement de forme, la formation de filopodes, de lamellipodes et permet l'étalement des plaquettes (Inoue et al., 2003) (**Figure 14**). Il a également été proposé que l' $\alpha 2\beta 1$ stimulerait Rap1b *via* la PI3K (Consonni et al., 2012).

Au-delà du collagène, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ aurait également d'autres ligands comme le complexe protéique C1q du complément (Edelson et al., 2006), les laminines (Elices and Hemler, 1989), la nétrine-4 (Yebra et al., 2011) et le perlecan (Bix et al., 2004).

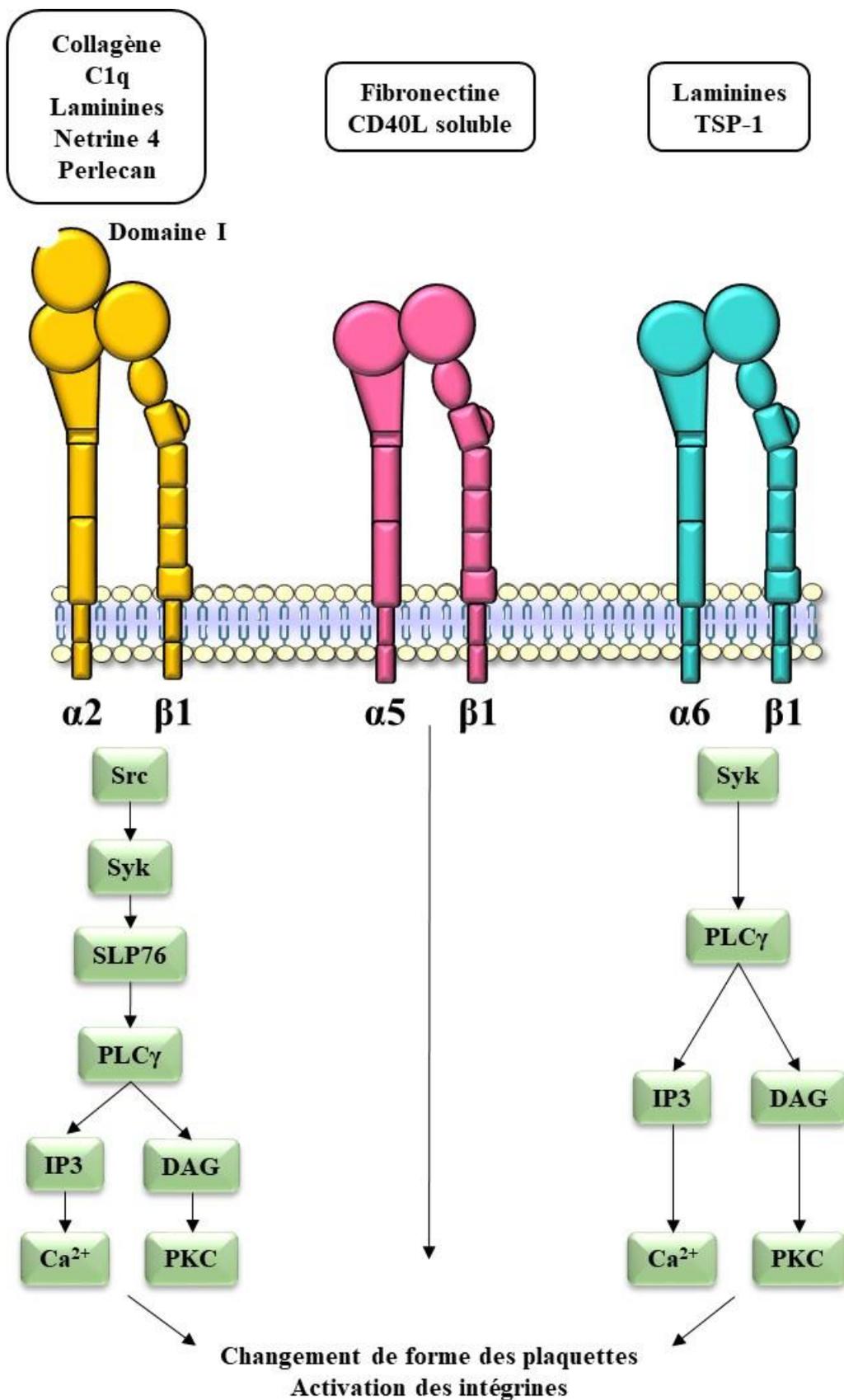


Figure 14 : La signalisation *outside-in* des intégrines $\beta 1$ plaquettaires. C1q, facteur du complément 1q; DAG, diacylglycérol; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; PKC, protéine kinase C; PLC γ , phospholipase C γ ; SLP76, protéine adaptatrice *scr homology 2 domain-countaining leukocyte phosphoprotein of 76 kDa*; Src, tyrosine kinase de la famille des Src; Syk, *spleen tyrosine kinase*; TSP-1, thrombospondine-1.

Au niveau fonctionnel, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ a été identifiée comme le récepteur responsable de l'adhérence des plaquettes au collagène en condition statique (Saelman et al., 1994). En effet, les plaquettes des souris déficientes pour la chaîne $\alpha 2$ n'adhèrent pas au collagène (Chen et al., 2002). En condition de flux, l'absence ou l'inhibition d' $\alpha 2\beta 1$ réduit l'adhérence stable des plaquettes et la formation d'agrégats lorsque du sang est perfusé sur collagène (Moroi et al., 2000; Sarratt et al., 2005). L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ n'a pas un rôle majeur dans l'activation des plaquettes au collagène (Nieswandt et al., 2001a) mais jouerait un rôle dans la stabilité du thrombus (Kuijpers et al., 2007).

L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ ne semble pas jouer un rôle clé en hémostase. En effet, un patient présentant un défaut d' $\alpha 2\beta 1$ a été décrit comme développant des hémorragies modérées pendant l'enfance puis le risque hémorragique semble avoir régressé (Nieuwenhuis et al., 1986), de même que chez la souris pour laquelle une déficience pour la chaîne $\alpha 2$ ou la chaîne $\beta 1$ ne modifie pas le temps de saignement (Chen et al., 2002; Habart et al., 2013; Holtkötter et al., 2002; Nieswandt et al., 2001a). Le rôle de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ en thrombose a été mis en évidence dans des modèles de thrombose artérielle *in vivo* induite par le rose Bengal ou par le chlorure de fer (He et al., 2003a; Kuijpers et al., 2007). De plus, il a été montré chez l'Homme que la présence d'un allèle induisant une augmentation de l'expression d' $\alpha 2\beta 1$ serait associé à un risque augmenté d'infarctus du myocarde, de rétinopathies diabétiques et d'accident vasculaire cérébral (Matsubara et al., 2000; Santoso et al., 1999). On peut penser que l'augmentation de l'expression d' $\alpha 2\beta 1$ pourrait augmenter l'adhérence des plaquettes au collagène et donc augmenter le risque de thrombose.

2.1.3.2. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est exprimée notamment sur les cellules endothéliales, les fibroblastes, les lymphocytes, les monocytes et les cellules cancéreuses (Kita et al., 2001; Wayner et al., 1988). On la retrouve également au niveau plaquettaire à raison d'environ 2 000 à 4 000 copies par plaquette. De manière générale, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est impliquée dans la migration et la différenciation cellulaire, surtout lors de l'embryogenèse. En effet, l'absence de la sous-unité $\alpha 5$ chez la souris entraîne la mort embryonnaire par défaut de développement des vaisseaux sanguins (Francis et al., 2002; Yang et al., 1993).

Le principal ligand de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est la fibronectine, un composant de la matrice extracellulaire. Cette intégrine se lie au niveau de la séquence RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) ainsi qu'au niveau d'autres séquences, comme le motif proline-histidine-sérine-arginine-asparagine (PHSRN) (Altroff et al., 2001; Mardon and Grant, 1994). L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ permet l'adhérence initiale des plaquettes à la fibronectine en conditions statique et de flux (Beumer et al., 1994; Maurer et al., 2015a; McCarty et al., 2004). L'interaction $\alpha 5\beta 1$ – fibronectine entraîne l'activation des plaquettes, qui reste relativement faible, menant à une augmentation intracellulaire de calcium, au changement de forme et à l'émission de filopodes (Maurer et al., 2015a), sans formation de lamellipodes qui elle nécessite l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (McCarty et al., 2004) (**Figure 14**). L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est également impliquée dans la formation du thrombus *in vitro* sur fibronectine (Maurer et al., 2015a).

L'importance de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en hémostase n'était pas connue avant ce travail de thèse. Son évaluation a nécessité le développement d'une souris déficiente pour ce récepteur spécifiquement au niveau mégacaryocytaire. De plus, aucun cas de patients présentant un défaut de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ n'a été décrit.

2.1.3.3. L'intégrine $\alpha 6\beta 1$

L'intégrine $\alpha 6\beta 1$ est exprimée à hauteur d'environ 2 000 à 4 000 copies par plaquette. En dehors de la lignée mégacaryocytaire (Hemler et al., 1988), l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ est exprimée sur les cellules endothéliales, les péricytes, les éosinophiles, les neutrophiles et les cellules cancéreuses (Bohnsack, 1992; Georas et al., 1993; Larrieu-Lahargue et al., 2011; Wewer et al., 1997).

Les principaux ligands de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ sont les laminines (Sonnenberg et al., 1988), des glycoprotéines hétérotrimériques qui composent les membranes basales et la matrice extracellulaire (Yurchenco, 2011). L'intégrine $\alpha 6\beta 1$ pourrait également interagir avec la TSP-1. En effet, une interaction directe entre l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ et TSP-1 a été montrée entre les cellules endothéliales microvasculaires et les cellules de fibrosarcome (Calzada et al., 2003) ainsi qu'une réduction d'adhérence sur la TSP-1 des plaquettes déficientes pour $\alpha 6$ (Schaff et al., 2013).

L'intégrine $\alpha 6\beta 1$ est le récepteur responsable de l'adhérence des plaquettes aux laminines (Hindriks et al., 1992), notamment aux laminines 411, 511 et 521. L'association de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ avec la tétraspanine CD151 renforcerait l'adhérence aux laminines dans les cellules hématopoïétiques (Lammerding et al., 2003). La voie de signalisation de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ n'est pas bien définie mais l'adhérence des plaquettes *via* $\alpha 6\beta 1$ activerait la tyrosine kinase Syk ainsi que PLC γ 2, responsables de l'étalement des plaquettes sur laminines (Inoue et al., 2006). En effet, l'adhérence des plaquettes sur laminines induit leur activation avec une augmentation du calcium intracellulaire, un changement de forme et la formation de filopodes (Inoue et al., 2006; Schaff et al., 2013), mettant en évidence un rôle des laminines qui dépasse leur capacité à recruter les plaquettes (**Figure 14**). Il a également été montré que l'activation est favorisée par la GPVI, comme mis en évidence par l'étalement réduit des plaquettes de souris déficientes en GPVI sur laminines (Inoue et al., 2006; Schaff et al., 2013). Le rôle de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ plaquettaire dans le processus hémostatique ne semble pas être clé puisque les souris déficientes pour la sous-unité $\alpha 6$ spécifiquement au niveau de la lignée mégacaryocytaire présentent un temps de saignement à la queue normal (Schaff et al., 2013). En revanche, l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ participe à la formation du thrombus. Les souris déficientes pour la sous-unité $\alpha 6$ spécifiquement sur la lignée mégacaryocytaire sont protégées contre la thrombose, notamment dans les modèles *in vivo* de lésion mécanique et lésion au laser et ce de manière similaire aux souris déficientes pour les intégrines $\beta 1$ plaquettaires (Schaff et al., 2013). Enfin, l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ a également un rôle dans la dissémination métastatique par interaction avec la *A desintegrin and metalloproteinase* (ADAM) 9 des cellules cancéreuses (Mammadova-Bach et al., 2016).

2.1.3.4. L'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$

L'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$, aussi appelée GPIIb-IIIa ou CD41/CD61, est un hétérodimère composé d'une sous unité αIIb et d'une sous unité $\beta 3$ (Jennings and Phillips, 1982), formant un complexe de 230 kDa. Elle est codée par les gènes *ITGA2B* et *ITGB3*, respectivement pour l' αIIb et la $\beta 3$, localisés sur le chromosome 17. C'est un récepteur fortement exprimé avec 80 000 copies à la surface d'une plaquette au repos et 30 000 copies se trouvant sur la membrane du SCO et des granules α (Wagner et al., 1996). Ces dernières sont exposées à la surface après l'activation plaquettaire, lors du changement de forme et de la sécrétion du contenu des granules. L'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ est spécifique de la lignée mégacaryocytaire (Uzan et al., 1991).

Les ligands de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

Le principal ligand de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est le fibrinogène. L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ lie à la fois le motif RGD de la chaîne α du fibrinogène ainsi que la séquence KQAGDV présente sur la chaîne γ (Springer et al., 2008). Elle reconnaît également, au niveau de sa tête globulaire, d'autres protéines possédant un motif RGD dont le FW, la fibronectine, la vitronectine, la fibrine, la TSP-1 et le CD40 ligand (CD40L) (André et al., 2002; Plow et al., 2000; Podolnikova et al., 2014).

La fonction de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

La fonction principale de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est d'assurer l'agrégation plaquettaire par son interaction avec le fibrinogène plasmatique, qui permet les interactions plaquettes-plaquettes (Marguerie et al., 1979). Il a également été montré que la liaison de l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ avec le FW est impliquée dans la formation d'agrégats (Moake et al., 1986, 1988). De plus, l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est impliquée dans l'adhérence stable des plaquettes par interaction avec le FW lié au collagène et avec la fibronectine, tous deux situés dans le sous-endothélium (Giuliano et al., 2003; Maurer et al., 2015a). L'importance des autres ligands de l'intégrine comme la vitronectine ou la TSP-1 reste à ce jour peu connue, même si on peut penser qu'ils contribuent à l'adhérence des plaquettes.

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ participe également au rôle non hémostatique des plaquettes puisqu'elle est impliquée dans certains processus inflammatoires comme la formation des *neutrophil-extracellular traps* (NETs) (Yan et al., 2019) ainsi que dans la progression de certains cancers, notamment par son interaction avec l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ exprimée à la surface des cellules tumorales par l'intermédiaire du fibrinogène (Lonsdorf et al., 2012).

La signalisation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

L'interaction de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ avec du fibrinogène soluble déclenche le regroupement des intégrines (Buensuceso et al., 2003). S'en suit la signalisation *outside-in*, séparée en deux voies initiées par des tyrosine kinases c-Src et Fyn de la famille Src qui sont liées à la queue cytoplasmique de β3 (Oberfell et al., 2002). La première voie est induite par la phosphorylation et l'activation de c-Src conduisant à une cascade de signalisation en aval

identique à celle décrite pour la GPVI et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Oberfell et al., 2001, 2002; Wonerow et al., 2003). Il a également été proposé qu'en réponse à l'activation d' $\alpha \text{IIb}\beta 3$, on observe un regroupement de G $\alpha 13$ et de c-Src au niveau de la queue cytoplasmique de $\beta 3$ qui activerait la *Rho GTPase-activating protein* (RhoGAP), inhibant ainsi une petite GTPase de la famille Rho appelée *Ras homolog family member A* (RhoA), pour permettre l'étalement des plaquettes. Puis, un clivage de la liaison entre Src et la queue cytoplasmique de $\beta 3$ par la calpaïne, permettrait l'activation de RhoA et l'induction de la rétraction du caillot (Gong et al., 2010; Li et al., 2010). La deuxième voie de signalisation est induite par l'autophosphorylation de Fyn. Fyn phosphoryle alors deux tyrosines de la queue cytoplasmique de $\beta 3$, Tyr747 et Tyr759, ce qui entraîne i) l'activation de la *focal adhesion kinase* (FAK) qui stimule la PI3K β et active la voie Akt (Gratacap et al., 2011) ; ii) la phosphorylation de protéines adaptatrices comme Dok2, Grb2 et Shc associées à $\beta 3$ (Hughan and Watson, 2007; Law et al., 1996), aboutissant à l'activation de la voie des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) ; et iii) le recrutement de la myosine liée à la queue cytoplasmique de $\beta 3$ (Jenkins et al., 1998; Zhang et al., 2004) et interagissant avec le cytosquelette d'actine. Ces voies de signalisation conduisent au renforcement de l'activation de l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$, au changement de forme des plaquettes et entraîneraient la sécrétion du contenu des granules, la synthèse de TxA2 et la rétraction du caillot de fibrine (Huang et al., 2019) (**Figure 15**). Il a été proposé par le groupe de Peter Newman que l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ utilise le Fc γ RIIA comme un partenaire de signalisation. L'interaction ligand-intégrine induirait la phosphorylation intracellulaire de Fc γ RIIA et donc l'amplification du signal d'activation plaquettaire (Boylan Blood 2008 ; Zhi Blood 2013). Plus récemment, notre équipe a identifié un rôle de la GPVI dans l'activation des plaquettes sur fibrinogène (Mangin et al., 2018). Puisque cette interaction GPVI – fibrinogène participe à l'activation plaquettaire, cela suggère que la signalisation *outside-in* de l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ pourrait avoir été surévaluée et que certains acteurs identifiés pourraient appartenir à la signalisation de la GPVI.

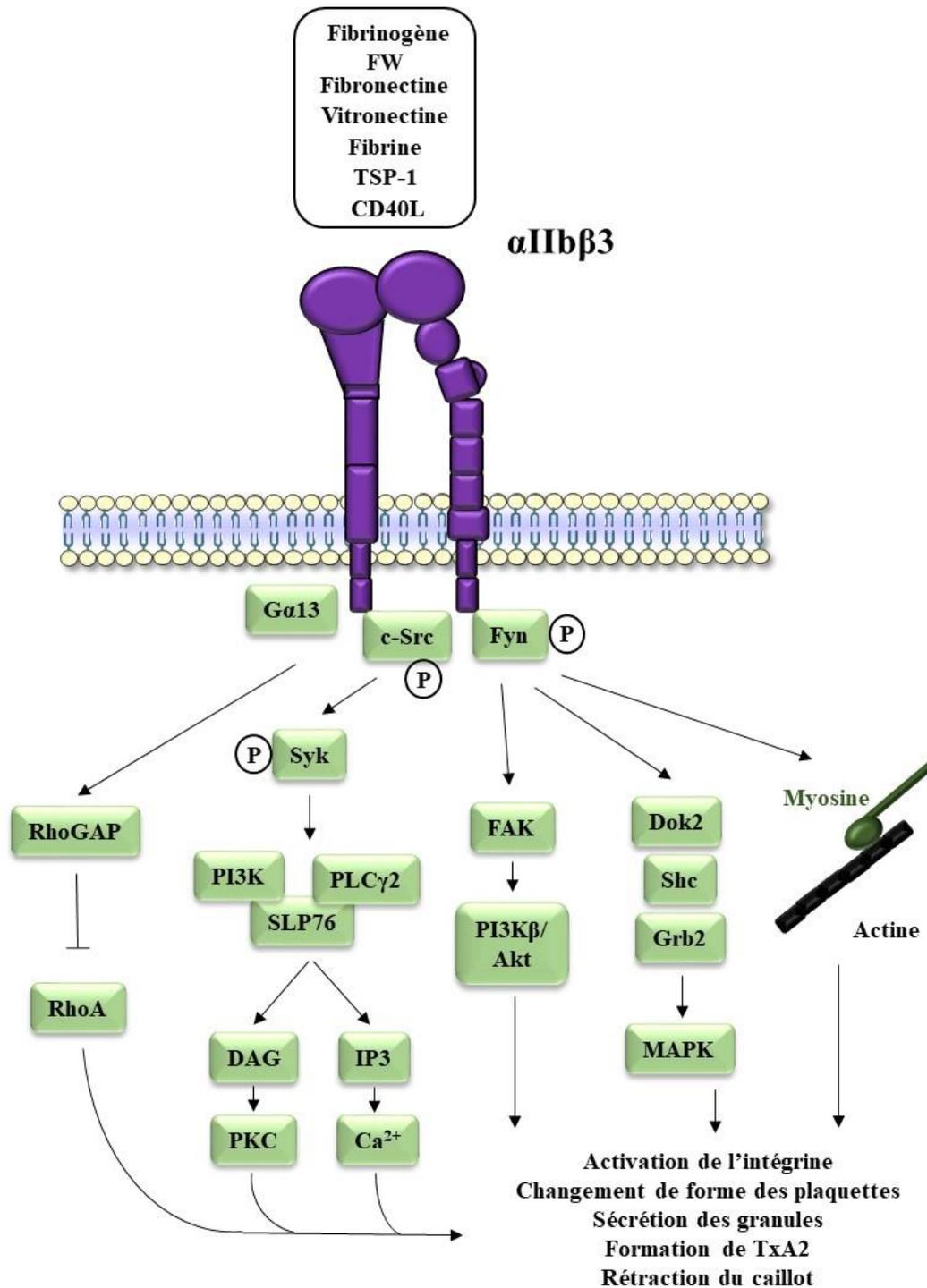


Figure 15 : La signalisation *outside-in* de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$. DAG, diacylglycérol; Dok2, downstream of tyrosine kinase 2; FAK, focal adhesion kinase; FW, facteur Willebrand; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2; IP_3 , inositol 1,4,5-triphosphate; MAPK, mitogen-activated protein kinases; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protéine kinase C; $\text{PLC}\gamma_2$, phospholipase $\text{C}\gamma_2$; RhoA, Ras homolog family member A; RhoGAP, Rho GTPase-activating protein; Shc, SH2-containing protein; SLP76, protéine adaptatrice scr homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa; Syk, spleen tyrosine kinase; TSP-1, thrombospondine-1; TxA_2 , thromboxane A2 (Adapté de Gratacap *et al.*, 2011; Jamasbi *et al.*, 2017).

Le rôle de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ en hémostasie

Le rôle de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ en hémostasie est illustré chez l'Homme par une maladie hémorragique rare et grave, appelée thrombasthénie de Glanzmann qui survient lorsque l'une des sous-unités de cette intégrine est absente ou non fonctionnelle. Cette maladie autosomale récessive est caractérisée par une diminution de la capacité des plaquettes à adhérer, s'étaler et agréger (Nurden, 2006; Solh et al., 2015). Les patients présentent généralement un phénotype hémorragique important souvent manifesté par des saignements cutanéomuqueux. Cette pathologie peut être reproduite chez la souris lorsque le gène de l' αIIb ou de la β3 est inactivé. Ces souris présentent un phénotype de thrombasthénie de Glanzmann avec des saignements, un temps de saignement à la queue très prolongé, une absence d'agrégation plaquettaire et de formation de thrombi en flux (Hodivala-Dilke et al., 1999; Tronik-Le Roux et al., 2000).

Le rôle de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ en thrombose

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ joue un rôle crucial en thrombose artérielle par sa capacité à assurer l'agrégation plaquettaire et donc la croissance et la stabilité du thrombus (Akuta et al., 2020; Goschnick et al., 2006; Hodivala-Dilke et al., 1999; Tronik-Le Roux et al., 2000). Son importance en thrombose artérielle est attestée par l'utilisation en clinique d'antiagrégants plaquettaires ciblant cette intégrine : l'abciximab, l'eptifibatide et le tirofiban. Ces agents sont administrés par voie intraveineuse lors de situations d'urgence comme l'infarctus du myocarde ou des interventions coronariennes percutanées, mais leur utilisation s'accompagne d'un risque hémorragique important (voir **paragraphe II.D.2.4**).

2.1.3.5. L'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$

L'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ est un hétérodimère. Le gène codant pour αv (*ITGAV*) se trouve sur le chromosome 2 et le gène codant pour β3 (*ITGB3*) sur le chromosome 17. L'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ est exprimée de manière ubiquitaire. On la retrouve très faiblement exprimée sur les plaquettes et les mégacaryocytes (Poujol et al., 1997) à hauteur d'une centaine de copies par plaquette. On trouve aussi l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ sur les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les neutrophiles et les ostéoclastes (Kappert et al., 2001; Nesbitt et al., 1993; Rainger et al., 1999). Elle est

exprimée au niveau de la face luminale des cellules endothéliales lors de leur activation (Rix et al., 2016; Srivatsa et al., 1997). Enfin, certaines cellules tumorales expriment l'intégrine $\alpha\beta3$ (Felding-Habermann, 2001).

Le ligand principal de l'intégrine $\alpha\beta3$ est la vitronectine (Felding-Habermann and Cheresh, 1993) mais elle lie d'autres molécules de la matrice extracellulaire exprimant une séquence RGD comme la fibronectine, le FW, le fibrinogène et également l'ostéopontine (Adair et al., 2005; Bennett et al., 1997), cette dernière étant présente dans les plaques d'athérosclérose et la paroi des vaisseaux lésés. Tout comme pour l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta3$, la tête globulaire de l'intégrine $\alpha\beta3$ est formée par l'interaction entre le domaine à hélices β et le domaine A qui permettent l'interaction des ligands.

Au niveau fonctionnel, il a été montré que l'intégrine $\alpha\beta3$ est impliquée dans l'adhérence des plaquettes à la vitronectine (Paul et al., 2003) et à la fibronectine (McCarty et al., 2004). A ce jour, son importance en hémostase et en thrombose reste mal définie, même si elle semble avoir un rôle mineur puisque des souris déficientes pour αv spécifiquement au niveau plaquettaire présentent un temps de saignement normal et une réponse non altérée dans des modèles de thrombose expérimentale (non publié, Mangin P. et Léon C. 2016). Chez l'Homme, aucune mutation de l'intégrine αv n'a été rapportée comme induisant une maladie hémorragique. Cependant, des anticorps dirigés contre cette intégrine ont été identifiés chez certains patients atteints de purpura thrombopénique immunologique chronique, qui pourraient aggraver la thrombopénie en inhibant la migration des mégacaryocytes (Zeng et al., 2018).

2.2. Les récepteurs aux agonistes solubles

Les récepteurs plaquettaires aux agonistes solubles appartiennent soit à une famille de récepteur canal ionique, soit à une famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG), ces dernières étant composées des sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. Ils sont activés par des agonistes solubles comme l'ADP, l'ATP et le TxA2, libérés par les plaquettes activées, ou par la thrombine, le produit final de la cascade enzymatique de la coagulation. Ces récepteurs amplifient l'activation plaquettaire permettant ainsi de contribuer de manière importante à l'hémostase et à la thrombose.

2.2.1. Le récepteur P2X₁

Le P2X₁ est un récepteur à l'ATP appartenant à la famille des canaux ioniques. Il est exprimé sur les cellules musculaires lisses, les neutrophiles, les macrophages (Hinze et al., 2013; Lecut et al., 2009; Sim et al., 2007) et les plaquettes à hauteur de 100 à 150 copies par plaquette (MacKenzie et al., 1996; Vial et al., 1997).

L'activation du récepteur P2X₁ par l'ATP induit un influx intracellulaire rapide de calcium conduisant à une dépolarisation de la membrane cellulaire (MacKenzie et al., 1996) et à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) responsable du changement de conformation et de la dégranulation des plaquettes (**Figure 16**). P2X₁ seul n'engendre pas d'agrégation, mais son activation potentialise l'agrégation des plaquettes en réponse au collagène, à l'ADP par l'intermédiaire des récepteurs P2Y, à la thrombine, au TxA₂ et dans des conditions de flux important (Erhardt et al., 2006; Fung et al., 2007; Gachet, 2006; Oury et al., 2001, 2004; Vial et al., 2002). Récemment, il a aussi été montré que P2X₁ favoriserait l'agrégation des plaquettes en réponse à l'activation du récepteur FcγRIIA (Ilkan et al., 2018). Le récepteur P2X₁ se désensibilise rapidement suite à l'interaction avec l'ATP, ce qui a compliqué l'étude *in vitro* de son rôle dans la fonction des plaquettes (Gachet, 2006). L'utilisation d'un antagoniste, le NF449, a néanmoins permis de mettre en évidence le rôle de P2X₁ dans l'activation des plaquettes au collagène (Hechler et al., 2005). De plus, l'importance de P2X₁ en hémostase et en thrombose artérielle a été étudiée *in vivo* grâce au développement de souris déficientes pour ce récepteur. La délétion ou l'inhibition de P2X₁ chez la souris n'induit pas de modification du temps de saignement, ce qui suggère un rôle modeste en hémostase (Hechler et al., 2003, 2005). Cependant, le rôle important joué par le récepteur P2X₁ en thrombose expérimentale a notamment été mis en évidence dans un modèle de thrombose laser par l'utilisation de souris KO ou d'inhibiteurs de P2X₁ (Erhardt et al., 2006; Hechler et al., 2003, 2005). De plus, ce rôle est confirmé par un phénotype prothrombotique des souris présentant une surexpression de P2X₁ (Oury et al., 2003). Au vu de ces observations, P2X₁ pourrait être une cible antithrombotique potentielle même si aucun agent thérapeutique n'est utilisé en clinique à ce jour.

2.2.2. Le récepteur P2Y₁

Le récepteur P2Y₁ à l'ADP appartient à la famille des RCPGs couplés à la sous-unité Gαq. Il est exprimé de manière ubiquitaire chez l'Homme et on le retrouve en particulier sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules immunitaires dont les macrophages, les éosinophiles et les lymphocytes, au niveau pulmonaire et au niveau cérébral (Abbracchio et al., 2006). Il est impliqué dans la neurogenèse, la prolifération cellulaire et l'inflammation vasculaire (Castaing-Berthou et al., 2017; Mishra et al., 2006; Zerr et al., 2011). Il est aussi exprimé sur les plaquettes avec environ 150 copies par plaquette (Léon et al., 1997; Ohlmann et al., 2010).

La liaison de l'ADP au récepteur P2Y₁ entraîne la dissociation de la protéine G du récepteur. Gαq va alors se lier à PLCβ et l'activer, permettant l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) en IP3 et DAG, entraînant la mobilisation calcique et l'activation de la PKC (Offermanns, 2006). Cette voie de signalisation induit le changement de forme des plaquettes et initie l'agrégation plaquettaire (Fabre et al., 1999; Gachet, 2008; Hechler et al., 1998; Léon et al., 1999). P2Y₁ participe également à la fonction procoagulante des plaquettes (Leon et al., 2003, 2004) (**Figure 16**). Le récepteur P2Y₁ joue un rôle important en thrombose artérielle, ce qui a été démontré dans un modèle murin de thromboembolie pulmonaire induit par injection intraveineuse de collagène-adrénaline ou de FT et dans des modèles de thrombose localisée, notamment après une lésion induite par laser des artérioles mésentériques ou par administration topique de chlorure de fer au niveau de la carotide (Fabre et al., 1999; Gachet et al., 2006; Hechler et al., 2006; Lenain et al., 2003; Léon et al., 1999, 2001). De même dans un modèle simien de thrombose au niveau de l'artère carotide, le traitement par un antagoniste de P2Y₁, le MRS2500, réduit la thrombose artérielle (Wong et al., 2016). Enfin, le temps de saignement des animaux déficients en P2Y₁ ou traités par un inhibiteur de ce récepteur n'est que légèrement augmenté, mettant en évidence un rôle mineur en hémostase (Fabre et al., 1999; Hechler et al., 2006; Léon et al., 1999; Wong et al., 2016). Ces résultats font de P2Y₁ une cible antithrombotique intéressante, même si à ce jour aucun agent ciblant ce récepteur n'est utilisé en clinique.

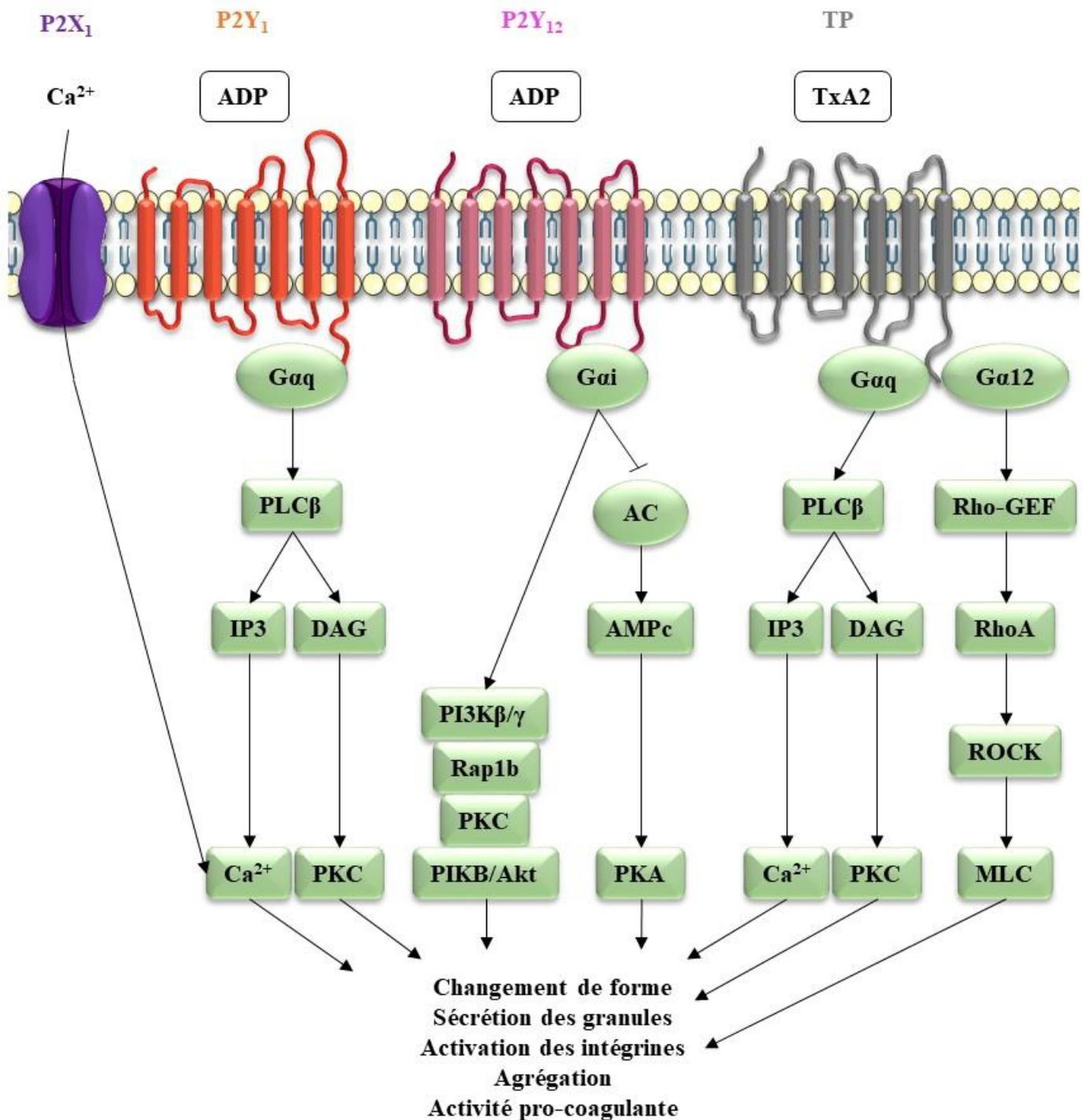


Figure 16 : Les voies de signalisation déclenchées par les récepteurs aux agonistes solubles P2Y₁, P2Y₁₂, P2X₁ et TP. AC, adénylate cyclase; ADP, adénosine diphosphate; AMPc, adénosine monophosphate cyclique; ATP, adénosine triphosphate; DAG, diacylglycérol; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; MLC, chaîne légère de la myosine; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PK, protéine kinase; PLCβ, phospholipase β; Rap1b, *Ras-related protein 1b*; Rho-GEF, *Guanine nucleotide exchange factor for Rho*; ROCK, *Rho-associated protein kinase*; TP, récepteur au thromboxane et aux prostaglandines; TxA2, thromboxane A2.

2.2.3. Le récepteur P2Y₁₂

P2Y₁₂ est un récepteur à l'ADP de la famille des RCPG couplé à la protéine G α i. Il est exprimé à hauteur de 425 copies par plaquette (Ohlmann et al., 2013), et on le retrouve aussi dans le tissu cérébral, les cellules musculaires lisses, les cellules dendritiques et certains leucocytes (Ben Addi et al., 2010; Wang et al., 2004; Wihlborg et al., 2004).

La liaison de l'ADP au récepteur P2Y₁₂ couplé à la protéine G α i induit l'inhibition de l'AC, ce qui empêche l'augmentation de l'AMPc et l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Ohlmann et al., 1995). L'activation de P2Y₁₂ conduit également à l'activation de PI3K γ et β , de Rap1b, de PKC et de protéine kinase B (PKB)/Akt (Cosemans et al., 2006; Guidetti et al., 2008; Kim et al., 2004; Schoenwaelder et al., 2007; Woulfe et al., 2002). Ces voies de signalisation jouent un rôle important dans l'activation des intégrines induisant l'amplification de l'agrégation plaquettaire (Gachet, 2008; Hechler and Gachet, 2011b) ainsi que dans l'exposition de la phosphatidylsérine procoagulante à la surface des plaquettes (Leon et al., 2003) (**Figure 16**). La stimulation de P2Y₁₂ potentialise l'agrégation induite par d'autres agonistes plaquettaires, comme la thrombine, le collagène, le TxA₂ ou encore l'ADP *via* le récepteur P2Y₁ (Dangelmaier et al., 2001; Nieswandt et al., 2001c, 2002). L'importance de ce récepteur en hémostase est confirmée par l'augmentation du temps de saignement et les hémorragies cutanéomuqueuses ainsi qu'après un traumatisme ou une chirurgie observés chez les patients présentant une mutation de P2Y₁₂ (Cattaneo et al., 2003; Lecchi et al., 2015; Nurden et al., 1995; Remijn et al., 2007; Shiraga et al., 2005). De même, on observe une augmentation du temps de saignement chez les souris présentant une déficience en P2Y₁₂ (Andre et al., 2003).

Le récepteur P2Y₁₂ joue un rôle clé en thrombose artérielle ce qui est attesté par l'existence d'une classe de médicaments antithrombotiques ciblant ce récepteur. Elle est composée des thiénoxyridines d'un côté avec le clopidogrel, le prasugrel et la ticlopidine, des antagonistes irréversibles de P2Y₁₂, et des non thiénoxyridines de l'autre côté avec le ticagrelor et le cangrelor, des antagonistes réversibles (voir **paragraphe II.D.2.2**). L'importance de P2Y₁₂ en thrombose artérielle a été confirmée au niveau expérimental par l'utilisation d'antagonistes de P2Y₁₂ ou de souris déficientes pour ce récepteur qui ont permis de mettre en évidence une diminution de la thrombose dans plusieurs modèles expérimentaux (Andre et al., 2003; Gachet et al., 2006; van Gestel et al., 2003).

2.2.4. Le récepteur TP

Le récepteur TP, appartenant lui aussi à la famille des RCPG, est couplé aux protéines Gαq et à Gα12/13. Il est exprimé par les plaquettes, avec 1 500 copies par plaquette (Halushka et al., 1986). On le retrouve également sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les monocytes et macrophages (Davì et al., 2012). Il est principalement activé par le TxA2, qui est synthétisé lors de l'activation plaquettaire. L'activation des plaquettes au collagène ou à la thrombine induit une augmentation de Ca²⁺ activant la PLA2, qui génère de l'acide arachidonique (AA) par hydrolyse des phospholipides membranaires. La cyclooxygénase (COX)-1 métabolise alors l'AA en PGH2 instable, puis en TxA2 par la TxA2 synthase (O'Donnell et al., 2014). Le TxA2 a une demi-vie très courte d'environ 30 secondes (Hamberg et al., 1975), il agit donc par une action autocrine ou paracrine suite à sa diffusion à travers la membrane plaquettaire du fait de ses propriétés liposolubles.

L'action du TxA2 sur le récepteur TP induit une voie de signalisation *via* Gαq menant, par l'intermédiaire de la même voie de signalisation que pour le récepteur P2Y₁, à l'augmentation du calcium intraplaquettaire et à l'activation de PKC. Le récepteur induit également une signalisation *via* Gα12 qui active Rho-GEF et la voie *Rho-associated protein kinase* (ROCK) entraînant la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Klages et al., 1999). Les voies de signalisation aboutissent au changement de forme, à la sécrétion du contenu des granules et à l'agrégation plaquettaire (**Figure 16**) (Bauer et al., 1999; Getz et al., 2010). Les patients présentant une mutation de TP ou un défaut de la voie du TxA2 présentent des saignements modestes (Defreyn et al., 1981; Lages et al., 1981; Samama et al., 1981; Wu et al., 1981) et les souris ont un temps de saignement augmenté (Cathcart et al., 2008; Thomas et al., 1998; Yu et al., 2004), confirmant le rôle de ce récepteur dans l'hémostase.

La voie TxA2 – TP est la cible d'un médicament antiagrégant plaquettaire largement utilisé en clinique : l'aspirine (voir **paragraphe II.D.2.1**), indiquant le rôle de TP en thrombose artérielle.

2.2.5. Les récepteurs PAR

Les *protease-activated receptors* (PAR) sont des RCPG couplés aux protéines Gαq, Gα12/13 et peut être Gαi dont il existe plusieurs sous-types. On retrouve PAR-1 et PAR-4 sur les plaquettes humaines à hauteur de 1 500 à 2 000 copies par plaquette, ainsi que PAR-3 et

PAR-4 sur les plaquettes de souris (Kahn et al., 1998, 1999). Les récepteurs PARs sont également exprimés dans d'autres types cellulaires dont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les monocytes et les astrocytes (Ossovskaya and Bunnett, 2004).

La thrombine, une sérine protéase considérée comme l'agoniste plaquettaire le plus puissant, est le principal agoniste des récepteurs PAR (Coughlin, 2005). Le mécanisme d'activation des récepteurs PAR par la thrombine est particulier puisque cette enzyme induit le clivage de l'extrémité N-terminale extracellulaire du récepteur entre les résidus Arg41 et Ser42, afin de libérer une nouvelle extrémité N-terminale qui pourra alors lier et activer le récepteur PAR (Vu et al., 1991). PAR-1 et PAR-3 sont activés par une faible concentration de thrombine (de l'ordre de 1 μ M), du fait de la présence d'une séquence *hirudine-like* facilitant la liaison de la thrombine (Hung et al., 1992; Ishihara et al., 1997), alors que l'activation de PAR-4 nécessite une concentration plus importante (de l'ordre d'une dizaine de μ M) (Kahn et al., 1999). PAR-1 et PAR-4 sont couplés, d'une part à la protéine G α q et d'autre part à la protéine G α 12/13, induisant une voie de signalisation similaire à celle décrite pour le récepteur TP (Klages et al., 1999; Offermanns et al., 1994). Enfin, PAR-1 pourrait également être couplé à la protéine G α i, entraînant l'inhibition d'AC et diminuant la concentration d'AMPc, de la même manière que pour le récepteur P2Y₁₂ (Kim et al., 2002). Ces voies de signalisation conduisent au changement de forme, à la sécrétion du contenu des granules, à la libération de TxA₂, à l'activation des intégrines et à l'agrégation plaquettaire (Bauer et al., 1999; Henriksen and Hanks, 2002; Kahn et al., 1999). De plus, ces récepteurs sont aussi impliqués dans l'activité procoagulante des plaquettes (**Figure 17**) (Andersen et al., 1999).

Les récepteurs PAR jouent un rôle en thrombose chez la souris puisque les souris déficientes pour PAR-3 et PAR-4 sont protégées dans des modèles de thrombose artérielle au chlorure de fer, au laser et de thromboembolisme pulmonaire (Cornelissen et al., 2010; Hamilton et al., 2004; Sambrano et al., 2001; Vandendries et al., 2007; Weiss et al., 2002). Il a également été montré chez les primates que l'inhibition de PAR-1 réduit la thrombose artérielle, confirmant ce rôle (Chintala et al., 2010; Derian et al., 2003). De plus, un antagoniste de PAR-1, le vorapaxar, a été approuvé aux Etats-Unis et en Europe dans le cadre de la prévention secondaire des événements ischémiques et des inhibiteurs de PAR-4 sont en cours de développement (voir **paragraphe II.D.2.5.3**).

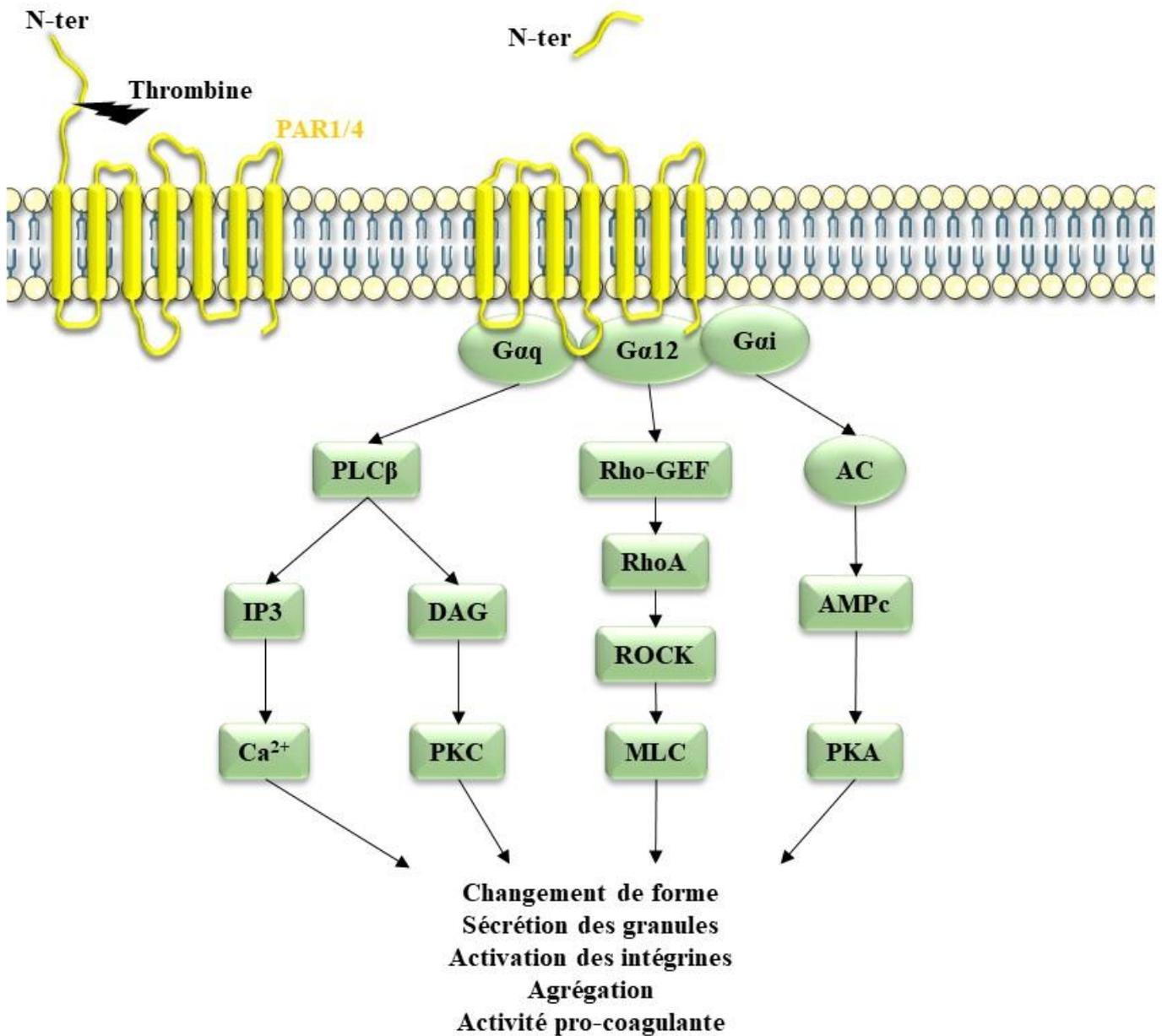


Figure 17 : La voie de signalisation déclenchée par les récepteurs PAR. AC, adénylate cyclase; AMPc, adénosine monophosphate cyclique; DAG, diacylglycérol; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; MLC, chaîne légère de la myosine; PAR, *protease-activated receptor*; PKA, protéine kinase A; PLCβ, phospholipase β; Rho-GEF, *Guanine nucleotide exchange factor for Rho*; ROCK, *Rho-associated protein kinase*.

C. Le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire

Au-delà de leur rôle dans l'arrêt du saignement suite à une lésion vasculaire, les plaquettes assureraient également le maintien de l'intégrité vasculaire, c'est-à-dire la prévention d'altération des vaisseaux sanguins et de leurs composants, que ce soit au niveau de la structure ou de la fonction, qui permet d'éviter la fuite de plasma et/ou de cellules sanguines. On sait qu'un risque de saignement spontané, c'est-à-dire en absence de traumatisme évident, apparaît chez les patients qui présentent une thrombopénie de moins de 100 000 plaquettes/ μL , et on sait également que les patients avec une thrombopénie très sévère, moins de 10 000 plaquettes/ μL , doivent être transfusés afin de prévenir l'apparition de ces saignements (Piel-Julian et al., 2018; Slichter, 2004), indiquant probablement un rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire, puisque ces saignements apparaissent en absence de lésion.

Par définition, le maintien de l'intégrité vasculaire fait intervenir la conservation de la barrière semi-perméable, c'est-à-dire la perméabilité sélective de l'endothélium et donc le maintien des jonctions inter-endothéliales. Trois études assez anciennes réalisées à l'aide de modèles *ex vivo* suggèrent un rôle des plaquettes dans le support de la fonction barrière de l'endothélium et donc dans le maintien de l'intégrité vasculaire. La première, publiée par Danielli en 1940, a mis en évidence la formation d'œdèmes lors de la perfusion de pattes de grenouille avec du liquide de Ringer, ce qui n'est pas le cas lorsque des plaquettes sont perfusées (Danielli, 1940). La deuxième, réalisée près de 30 ans plus tard par Gimbrone, a montré que la perfusion de thyroïde de chien avec du plasma pauvre en plaquettes (PPP) induit un œdème, œdème qui n'est pas retrouvé lors de la perfusion de plasma riche en plaquettes (PRP) (Gimbrone et al., 1969). Une troisième étude met également en avant ce rôle des plaquettes au niveau des microvaisseaux du cœur chez le rat puisque l'extravasation d'albumine, représentant l'œdème, est réduite lors de la perfusion de PRP par rapport à la perfusion de PPP (McDonagh, 1986). Enfin, une étude récente par microscopie intravitale a également confirmé la fuite de fluide sanguin lorsqu'une thrombopénie sévère est maintenue pendant 24h chez la souris, ce qui a été démontré par la présence de dextran injecté par voie intraveineuse, hors des vaisseaux (Gupta et al., 2020). Il est à noter que ces travaux expérimentaux ont étudié la fuite de plasma et donc la formation d'un œdème, et pas le saignement en soi, c'est-à-dire la perte de cellules sanguines.

En plus de cet effet sur l'œdème, les plaquettes semblent également intervenir dans le maintien de la structure endothéliale. L'observation de la nécrose des cellules endothéliales au

niveau des thyroïdes de chien suite à la perfusion de PPP dans l'étude de Gimbrone suggère que les plaquettes pourraient « nourrir » l'endothélium (Gimbrone et al., 1969). Cette notion est confortée par des études de microscopie électronique montrant un affinement et des fenestrations de l'endothélium des capillaires et des veinules post-capillaires de la langue chez le lapin thrombopénique (Kitchens, 1977; Kitchens and Weiss, 1975). Ces altérations de l'endothélium semblent apparaître dans les heures suivant l'induction de la thrombopénie et être corrigées lors d'un retour à un compte plaquettaire normal (Kitchens and Weiss, 1975). Elles ont également été observées sur des capillaires de biopsies cutanées et musculaires de patients présentant une thrombopénie sévère (Kitchens and Pendergast, 1986). Il est tout de même important de noter que certains groupes n'ont pas mis en évidence de différence dans la structure endothéliale des capillaires d'animaux thrombopéniques par rapport à des animaux témoins (Dale and Hurley, 1977; Shepro et al., 1980).

D. La thrombose artérielle et les traitements antiplaquettaires

Les plaquettes jouent un rôle majeur lors d'une thrombose artérielle, définie comme la formation pathologique d'un thrombus, pouvant conduire à l'obstruction d'un vaisseau sanguin. Le thrombus se formant dans une artère est majoritairement composé de plaquettes et de fibrine. Il induit une réduction de l'apport en oxygène dans les tissus en aval du vaisseau touché. Lorsque le thrombus est adhérent à la paroi vasculaire, il est appelé thrombus mural et peut conduire à un infarctus du myocarde lors d'une atteinte des artères coronaires. Un thrombus mural peut également se fragmenter et former des emboles entraînés dans la circulation sanguine pouvant aller se loger dans les artères cérébrales et mener à un AVC ischémique ou dans les artères pulmonaires et induire une embolie pulmonaire.

1. La physiopathologie de l'athérosclérose et la thrombose artérielle

La thrombose artérielle est la principale complication de l'athérosclérose, une maladie vasculaire chronique évoluant tout au long de la vie d'un individu et générant la formation d'une plaque d'athérome dans la paroi d'une artère. Le développement de cette plaque est favorisé par des facteurs comme une dyslipidémie, une hypertension artérielle ou un diabète

aboutissant à l'activation des cellules endothéliales et à l'expression de molécules d'adhérence permettant le recrutement des leucocytes circulants, tout particulièrement des monocytes (Gimbrone and García-Cardena, 2016). Ces monocytes migrent alors dans l'intima et se différencient en macrophages capables de phagocyter le cholestérol pour former des cellules spumeuses. S'en suit la migration des cellules musculaires lisses vasculaires depuis la media vers l'intima où elles prolifèrent et synthétisent le collagène et l'élastine, composants de la matrice extracellulaire, pour former la chape fibreuse recouvrant et stabilisant la plaque (Libby et al., 2011). Les cellules spumeuses et les cellules musculaires lisses situées au centre de la plaque sont sujettes à l'apoptose et à la nécrose, induisant la libération des lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydés et générant une zone riche en cholestérol appelée cœur lipidique ou cœur nécrotique de la plaque (Libby et al., 2011) (**Figure 18**).

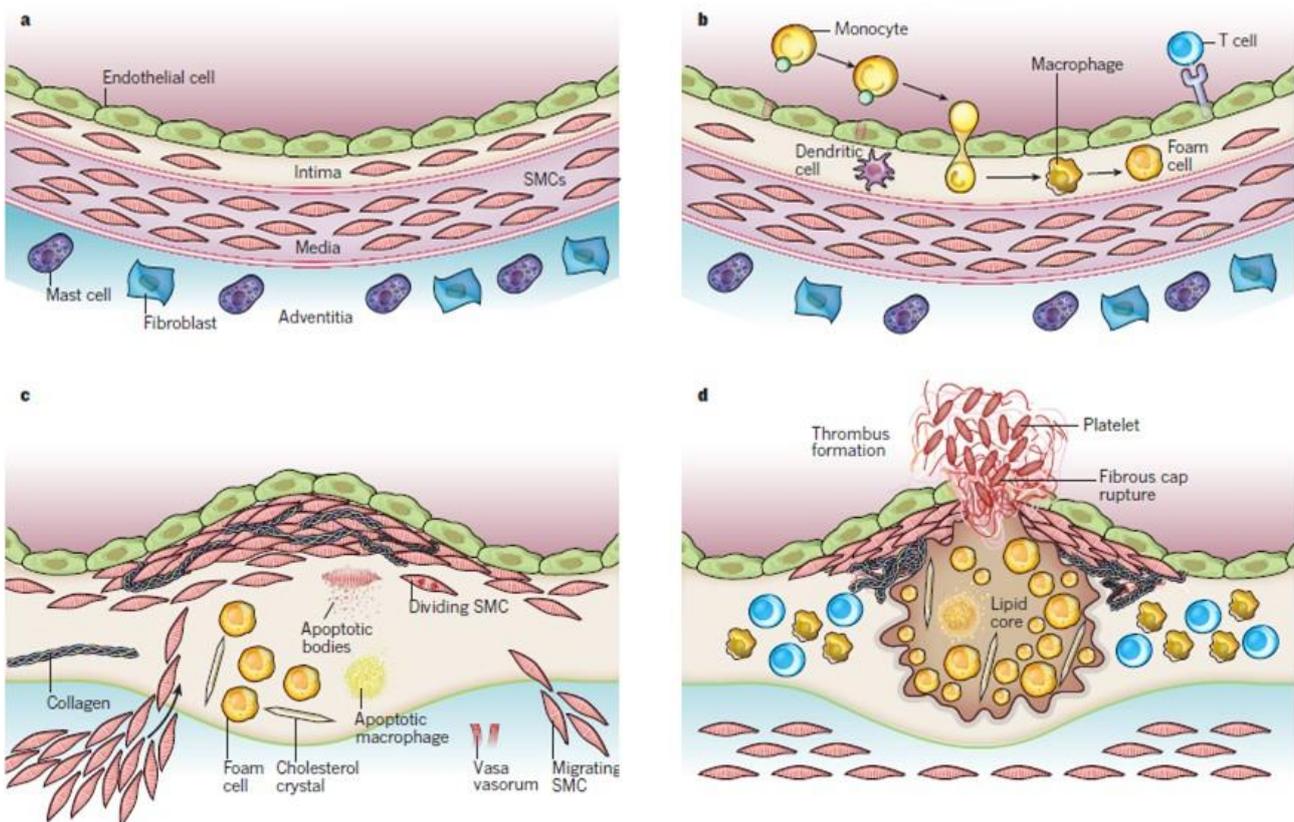


Figure 18 : Le développement d'une plaque d'athérosclérose. SMCs, cellules musculaires lisses (D'après Libby *et al.*, 2011).

Ces plaques d'athérosclérose présentent une évolution continue au cours de la vie d'un individu. Leur croissance peut conduire, lorsqu'elles sont très volumineuses, à des perturbations de flux locales, augmentant le risque de thrombose. Une plaque d'athérosclérose contient également du matériel fortement thrombogène, avec notamment du FT (Toschi et al., 1997) et du collagène (van Zanten et al., 1994), qui peuvent être exposés au flux sanguin lors de la rupture de la chape fibreuse ou lors de son érosion progressive, conduisant ainsi à la formation d'un thrombus ou d'emboles.

2. Les traitements de la thrombose artérielle : focus sur les approches pharmacologiques

La prise en charge de la thrombose artérielle dépend de sa sévérité et de l'artère touchée. Une combinaison composée d'une approche de cardiologie interventionnelle ou chirurgicale et d'un traitement pharmacologique est généralement utilisée pour un retour à une circulation normale et pour éviter la récurrence. L'intervention de revascularisation consiste le plus souvent en une angioplastie, c'est-à-dire une intervention transluminale percutanée permettant d'insérer un stent au niveau de la plaque d'athérosclérose dans le but de maintenir l'artère ouverte. Il est également possible d'éliminer directement la plaque en la meulant ou en l'excisant (athérectomie ou endartériectomie), de récupérer les emboles avec un cathéter ou encore de réaliser un pontage permettant de contourner la partie sténosée *via* un greffon (Mehta et al., 2016; Sorini Dini et al., 2019). Ces interventions s'accompagnent de traitements pharmacologiques par des antiagrégants plaquettaires principalement, mais aussi par des anticoagulants, permettant ensuite de réduire le risque de récurrence.

2.1. L'aspirine et les traitements ciblant les récepteurs TP

L'aspirine est un agent antiplaquettaire largement utilisé en clinique. Elle inhibe les COX de manière irréversible, notamment la COX-1 plaquettaire, par acétylation d'un résidu sérine, ce qui empêche la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines, la formation de TxA₂ et donc l'activation des récepteurs TP impliqués dans les voies d'amplification de l'activation plaquettaire (Awtry and Loscalzo, 2000) (**Figure 19**). Il a été

proposé qu'elle permettrait également l'augmentation de la synthèse de NO par les plaquettes réduisant ainsi leur activation (Chakraborty et al., 2003). L'aspirine, pour son activité antiplaquettaire, est généralement utilisée par voie orale à la dose de 75 mg par jour dans le traitement et la prévention secondaire des maladies cardiovasculaires thrombotiques comme l'infarctus du myocarde et l'AVC (Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002).

Le traitement à l'aspirine s'accompagne d'effets indésirables dont des saignements, qui peuvent notamment survenir au niveau gastro-intestinal, et le développement d'ulcères (García Rodríguez et al., 2016). En effet, l'aspirine est un inhibiteur non sélectif de COX-1 présent dans les plaquettes de manière constitutive, mais aussi de COX-2 inductible dans la plupart des cellules nucléées. La COX-2 est responsable de la synthèse de prostaglandines protectrices de la muqueuse gastrointestinale mais n'est généralement pas affectée lors d'une prise d'aspirine à des doses antiplaquettaires. Des inhibiteurs de TxA2 synthase et des antagonistes des récepteurs TP, plus spécifiques que l'inhibition des COX, ont été développés. Ils ne sont cependant pas disponibles en clinique car les inhibiteurs de TxA2 synthase n'ont pas montré d'effet antithrombotique du fait de l'accumulation de précurseurs du TxA2, PGG₂ et PGH₂, pouvant également activer les récepteurs TP, et l'utilisation d'antagonistes de TP n'a pas montré de bénéfice par rapport à l'aspirine (Fontana et al., 2014).

2.2. Les antagonistes des récepteurs P2Y₁₂

Une deuxième classe d'antiplaquettaires largement utilisée en thrombose artérielle cible le récepteur P2Y₁₂. Les antagonistes de ce récepteur comprennent, d'une part les thiéno-pyridines avec la ticlopidine, le clopidogrel et le prasugrel, des pro-drogues dont les métabolites actifs inhibent de manière irréversible et sélective le récepteur P2Y₁₂ ; et d'autre part les autres antagonistes avec le ticagrelor et le cangrelor, qui sont eux des inhibiteurs directs et réversibles de P2Y₁₂ (Gachet, 2015) (**Figure 19**). Ces antithrombotiques sont utilisés dans la prévention et le traitement des évènements thrombotiques comme le syndrome coronarien aigu, la thrombose sur stent et l'AVC ischémique (Baqi and Müller, 2019; Jamasbi et al., 2017).

La principale limite du ciblage de P2Y₁₂ est le risque de saignement qui augmente avec le degré d'inhibition du récepteur, expliquant que les doses utilisées en clinique ne permettent d'inhiber qu'environ 50% de l'agrégation plaquettaire. De plus, des polymorphismes des gènes codant les cytochromes P 450 (CYP450) hépatiques, qui métabolisent le clopidogrel en

métabolite actif, induisent une variabilité de réponse aux doses classiquement recommandées de clopidogrel et donc un risque accru d'événements cardiovasculaires graves pour environ un quart des patients traités (Gachet, 2006; Zhao et al., 2019).

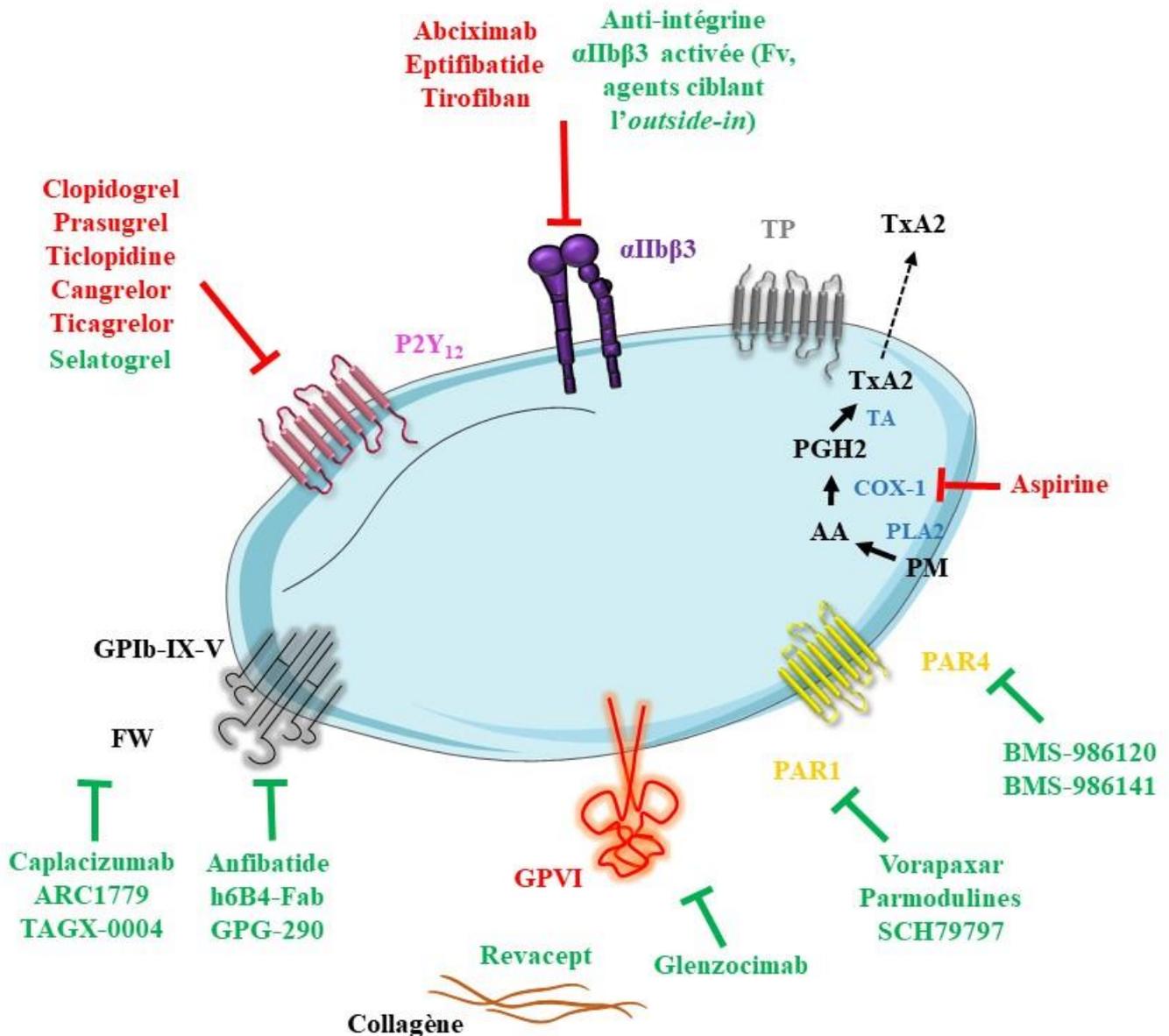


Figure 19 : Les antiplaquettaires utilisés en clinique et les nouvelles cibles pharmacologiques. AA, acide arachidonique; COX-1, cyclooxygénase-1; FW, facteur Willebrand; GP, glycoprotéine; PAR, *protease-activated receptor*; PGH₂, prostaglandine H₂; PLA₂, phospholipase A₂; PM, phospholipides membranaires; TA, thromboxane A₂ synthase; TP, récepteur au thromboxane et aux prostaglandines; TxA₂, thromboxane A₂.

Une deuxième limite d'un des traitements anti-P2Y₁₂ actuellement utilisés en clinique, le clopidogrel, est le temps de latence de quelques heures nécessaire pour atteindre l'effet antiplaquettaire maximal, ce qui est problématique dans une situation d'urgence (Gachet, 2005). Récemment, un nouvel inhibiteur sélectif et réversible de P2Y₁₂ administré par voie sous-cutané, appelé selatogrel, a été développé (Ufer et al., 2020). Il a été testé en essai clinique de phase 2 chez des patients présentant un infarctus du myocarde et met en évidence un effet antiplaquettaire rapide sans complications hémorragiques (Sinnaeve et al., 2020).

2.3. La bithérapie antiplaquettaire

Le traitement recommandé en prévention secondaire de la thrombose artérielle et chez les patients devant subir une intervention coronarienne transcutanée s'appuie sur une bithérapie antiplaquettaire composée d'aspirine et d'un inhibiteur de P2Y₁₂. Cette recommandation fait suite à l'essai clinique CURE qui a mis pour la première fois en évidence qu'une double thérapie composée d'aspirine et de clopidogrel réduisait davantage les événements cardiovasculaires, en comparaison à l'aspirine seule, chez les patients présentant un syndrome coronarien aigu devant subir une intervention coronarienne transcutanée lorsqu'elle est administrée avant l'intervention (Mehta et al., 2001). L'essai CHARISMA a ensuite confirmé l'effet de cette bithérapie dans la prévention secondaire à long terme des infarctus du myocarde (Bhatt et al., 2006).

Les recommandations actuelles préconisent l'utilisation du prasugrel ou du ticagrelor dans les bithérapies. En effet, l'étude TRITON-TIMI 38 réalisée chez des patients à risque de syndrome coronarien aigu devant subir une intervention coronarienne percutanée montre que, en combinaison avec l'aspirine, le prasugrel réduit plus le risque cardiovasculaire que le clopidogrel, mais il augmente le risque de saignement (Wiviott et al., 2007). De même pour le ticagrelor, l'étude PLATO comparant la combinaison ticagrelor et aspirine à clopidogrel et aspirine chez des patients avec un syndrome coronarien aigu a mis en évidence une réduction significative du risque cardiovasculaire dans le groupe traité par ticagrelor, sans augmentation du risque de saignement (Wallentin et al., 2009).

Malgré son efficacité dans la prévention secondaire de la thrombose artérielle, la bithérapie antiplaquettaire n'est pas recommandée suite à un AVC ischémique. En effet, la reperfusion de la zone ischémique suite à une thrombolyse désagrégant le caillot ou une thrombectomie consistant à retirer ce dernier, peut induire une transformation hémorragique de

l'AVC ischémique. Cette transformation hémorragique fait suite au retour du flux sanguin dans un tissu ischémié où les vaisseaux présentent une perméabilité augmentée. Dans cette situation, l'utilisation d'une combinaison d'antiagrégants plaquettaires amplifie le risque de transformation hémorragique pouvant devenir fatal pour le patient.

2.4. Les inhibiteurs de l'intégrine α IIb β 3

La troisième classe d'antiplaquettaires utilisée en thrombose artérielle cible l'intégrine α IIb β 3 grâce à l'abciximab, qui est un fragment Fab d'un anticorps monoclonal chimérique, l'eptifibatide, qui est un heptapeptide cyclique, et enfin le tirofiban, qui est un composé de synthèse dérivé de la tyrosine (Giordano et al., 2016) (**Figure 19**). Ces agents sont administrés par voie intraveineuse lors de situations d'urgence comme l'infarctus du myocarde ou lors d'interventions coronariennes percutanées (Jamasi et al., 2017) parce qu'ils constituent des antiagrégants plaquettaires particulièrement efficaces. Cependant, leur utilisation s'accompagne d'un risque hémorragique important, encore plus que pour les antagonistes du récepteur P2Y₁₂. Afin d'élargir leur utilisation à la prévention secondaire des maladies cardiovasculaires, des antagonistes d' α IIb β 3 oraux ont été développés. Des effets indésirables conséquents comme un risque de saignement important et une augmentation de la mortalité ont été rapportés, ce qui a entraîné l'arrêt brutal de leur utilisation (Chew et al., 2001). Cette augmentation de mortalité semble être due à l'apparition de thromboses suite à l'activation paradoxale des plaquettes par les antagonistes d' α IIb β 3 oraux. Les antagonistes d' α IIb β 3 actuels ciblent cette intégrine qu'elle soit dans un état activé ou non, augmentant ainsi le risque de saignement. Pour limiter ce risque de saignement, des agents ciblant seulement l'intégrine α IIb β 3 sous sa forme activée, qui n'affecteraient pas l'hémostase sont en cours de développement : i) des fragment variables d'anticorps bloquant l' α IIb β 3 activée (Hohmann et al., 2013; Ziegler et al., 2018) ; ii) de petites molécules n'induisant pas de changement de conformation (Li et al., 2014) ; iii) des agents ciblant la signalisation *outside-in* de l'intégrine plutôt que l'intégrine elle-même et sans impact sur la signalisation *inside-out* (Huang et al., 2015; Shen et al., 2013).

2.5. Les nouvelles cibles pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques de la thrombose artérielle classiquement utilisés cités plus haut, réduisent efficacement le risque de thrombose mais s'accompagnent d'un risque de saignement augmenté. Une nouvelle approche serait donc de développer des stratégies thérapeutiques ciblant d'autres récepteurs plaquettaires afin de réduire les saignements.

2.5.1. L'axe GPIb-IX-V/facteur Willebrand

Le complexe GPIb-IX-V est une cible antithrombotique intéressante puisqu'il est impliqué dans l'adhérence des plaquettes au sous-endothélium exposé suite à une lésion, qu'il joue un rôle important en thrombose artérielle et qu'il n'est exprimé que sur les plaquettes et les mégacaryocytes.

Une première stratégie pour cibler l'effet de ce complexe est indirecte et consiste à bloquer le domaine A1 du FW correspondant à son site de liaison au complexe GPIb-IX-V. Trois agents de ce type ont été développés. Le premier, un anticorps appelé caplacizumab, a été testé en essai clinique de phase 1 à la suite duquel son profil de sécurité lui a permis de passer en essai de phase 2. Ce dernier, réalisé chez des patients présentant un syndrome coronarien aigu candidats à une angioplastie, a montré ses effets antithrombotiques, mais également une augmentation des saignements qui a conduit à l'arrêt de l'étude (Bartunek et al., 2013). Cependant, le caplacizumab est aujourd'hui utilisé dans le traitement du purpura thrombotique thrombopénique, une pathologie due à l'inactivation de la métalloprotéinase ADAMTS13 induisant la formation de multimères de FW prothrombotiques, puisqu'il réduit les complications thrombotiques, malgré une légère augmentation du risque de saignement (Peyvandi et al., 2016; Scully et al., 2019). Le deuxième agent anti-domaine A1 du FW est l'ARC1779, un aptamère, qui montre une inhibition des fonctions plaquettaires dans les études cliniques de phase 1 (Gilbert et al., 2007). Cependant, l'essai de phase 2 chez des patients subissant une endartériectomie a dû être arrêté suite à l'observation d'une augmentation des saignements dans le groupe traité par ARC1779, et ce malgré une mise en évidence de la réduction des événements thromboemboliques (Markus et al., 2011). Un troisième agent, le TAGX-0004 qui est également un aptamère ciblant le FW a récemment été identifié et semble prometteur puisqu'il inhibe la formation du thrombus *in vitro* (Kazuya Sakai et al., 2019).

Une deuxième stratégie pour inhiber le complexe GPIb-IX-V consiste à cibler directement la GPIb α avec un antagoniste direct dérivé de venin de serpent, l'anfibatide, afin d'empêcher l'interaction GPIb α – FW/thrombine. En préclinique, il a été montré que l'anfibatide inhibe l'adhérence et l'agrégation des plaquettes *in vitro*, qu'il inhibe la thrombose *in vivo* et qu'il protège les souris dans un modèle d'AVC ischémique sans augmenter le risque de saignement (Lei et al., 2014; Li et al., 2015). Un essai de phase 2 chez des patients présentant un infarctus du myocarde avec élévation du segment ST candidats à une angioplastie est actuellement en cours pour évaluer la sécurité et l'efficacité de l'anfibatide (NCT02495012) (**Figure 19**).

D'autres molécules ciblant la GPIb α sont en cours de développement dont l'h6B4-Fab, un anticorps monoclonal humanisé bloquant la liaison du FW qui réduit efficacement la thrombose artérielle chez le babouin sans effet sur le temps de saignement (Fontayne et al., 2008), et la GPG-290, une protéine recombinante bloquant l'interaction GPIb α - FW, ayant des effets similaires dans des modèles canins (Wadanoli et al., 2007).

2.5.2. La GPVI

Il a été montré que la GPVI n'est pas indispensable à l'hémostase, qu'elle est impliquée dans la thrombose artérielle et que son expression est limitée aux plaquettes et aux mégacaryocytes, ce qui en fait une nouvelle cible antithrombotique potentiellement sûre. Plusieurs stratégies thérapeutiques visent à inhiber son activation.

La première repose sur le Revacept, une protéine dimérique recombinante, composée de deux domaines extracellulaires de la GPVI reliés à la partie constante d'un IgG1 humain, formant ainsi une GPVI-Fc. Cette stratégie consiste à mimer la GPVI, donc à lier le collagène exposé suite à une lésion, bloquant ainsi les sites de liaison de la GPVI. *In vitro*, il a été montré que le Revacept réduit la formation d'un thrombus sur plaque d'athérosclérose en flux (Mojica Muñoz et al., 2017). Une étude clinique de phase 1 a montré qu'il inhibe l'agrégation plaquettaire au collagène *ex vivo* après administration à des volontaires sains, sans augmenter le temps de saignement (Ungerer et al., 2011). Le Revacept est actuellement évalué en étude de phase 2 chez des patients présentant une insuffisance coronarienne stable devant subir une intervention percutanée (NCT03312855) ainsi que chez des patients présentant une sténose symptomatique des artères carotides, un accident ischémique transitoire ou un AVC ischémique (NCT01645306). Les premiers résultats de cette dernière étude indiquent qu'une dose de 120

mg de Revacept diminue de 46% l'apparition d'un nouvel AVC péri-interventionnel comparé au placebo (AdvanceCOR GmbH, 2020). De plus, une stratégie pour augmenter d'avantage l'activité antithrombotique du Revacept est à l'étude et consisterait à coupler la GPVI-Fc avec une ecto-ADPase CD39, qui inhibe les effets de l'ADP (Degen et al., 2017).

Une deuxième stratégie thérapeutique consiste à cibler la GPVI avec le Fab d'un anticorps monoclonal anti-GPVI humaine, 9O12. Plusieurs études montrent que cet anticorps inhibe la réponse au collagène lors de l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus *in vitro* dans un modèle de perfusion de sang (Lecut et al., 2003). Après administration chez le singe, le compte plaquettaire et les tests de coagulation restent inchangés (Ohlmann et al., 2008). La version humanisée de ce Fab, l'ACT017 aujourd'hui appelé glenzocimab, inhibe également l'agrégation des plaquettes de singe en réponse au collagène (Lebozec et al., 2017). Son effet inhibiteur de la thrombose expérimentale a pu être confirmé *in vivo* dans une souris humanisée pour la GPVI (Mangin et al., 2012). Le glenzocimab a été testé avec succès chez l'Homme dans un essai clinique de phase 1 (Voors-Pette et al., 2019) et est désormais évalué en essai clinique de phase 2 chez les patients présentant un AVC ischémique aigu en complément de la prise en charge classique (NCT03803007). En plus de son effet de prévention de la thrombose artérielle, le glenzocimab pourrait également être bénéfique chez des patients où la thrombose est déjà constituée puisqu'il a été montré qu'il limite la croissance du thrombus une fois ce dernier formé (Mangin et al., 2018). De plus, il permet *in vitro* la désagrégation des thrombi à la fois pauvres en fibrine et de ceux riches en fibrine lorsqu'il est combiné au rt-PA, ce qui constitue un argument supplémentaire pour son utilisation chez les patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde ou d'AVC ischémique (Ahmed et al., 2020) (**Figure 19**).

2.5.3. Les récepteurs PAR

Le récepteur plaquettaire de la thrombine, PAR-1 est considéré comme une cible antithrombotique potentielle puisqu'il permet l'agrégation des plaquettes à la thrombine et qu'il est impliqué en thrombose artérielle. Un antagoniste compétitif réversible de PAR-1, le vorapaxar, a été approuvé aux Etats-Unis et en Europe dans le cadre de la prévention secondaire des évènements ischémiques suite à un infarctus du myocarde ou à une maladie artérielle périphérique, en complément du traitement par aspirine et clopidogrel (Moon et al., 2018; Scirica et al., 2012). Son utilisation est cependant limitée : il est contre-indiqué en cas d'antécédents d'AVC ou d'hémorragies cérébrales du fait du risque de saignements

intracérébraux (Morrow et al., 2013). Pour pallier à son utilisation restreinte, d'autres inhibiteurs de PAR-1 sont en cours de développement avec notamment les parmodulines ciblant uniquement la partie cytoplasmique du récepteur (Aisiku et al., 2015), ainsi que le SCH 79797 (Mohamed et al., 2016).

Les plaquettes humaines possèdent un deuxième récepteur de la thrombine permettant leur activation, le PAR-4, qui représente également une cible antiplaquettaire devenue d'autant plus intéressante que le ciblage de PAR-1 semble augmenter le risque de saignement. Deux antagonistes sélectifs de PAR-4 sont en cours de développement. Le premier, BMS-986120, est un antagoniste réversible de PAR-4 qui réduit l'agrégation des plaquettes à la thrombine et montre, *in vivo* chez le primate, un effet antithrombotique important sans impact majeur sur l'hémostase (Wong et al., 2017). Un essai clinique de phase 1 a mis en évidence son effet sur l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus *ex vivo*, sans impact sur le temps de saignement (Wilson et al., 2018). Le deuxième antagoniste, BMS-986141, réduit la formation de thrombus *in vitro* et, comme le premier, est sans impact majeur sur l'hémostase (Meah et al., 2020). Il est actuellement en essai de phase 2 pour étudier son effet sur la réduction de la récurrence des AVC chez des patients présentant un historique d'AVC ou d'accident ischémique transitoire (NCT02671461) (**Figure 19**).

Au-delà du complexe GPIb-IX-V, de la GPVI et des récepteurs PAR, d'autres cibles pour le développement d'antiplaquettaires sont également évaluées comme la PI3K β et le récepteur P2Y₁ (Majithia and Bhatt, 2019).

E. Les fonctions non hémostatiques des plaquettes

Au-delà de leur rôle dans l'arrêt du saignement, les plaquettes sont également impliquées dans des fonctions non hémostatiques. Au niveau physiologique, les plaquettes jouent un rôle dans le développement embryonnaire et fœtal et ce *via* CLEC-2 qui semble impliqué dans la séparation des vaisseaux sanguins et lymphatiques. En effet, les souris KO pour CLEC-2 au niveau des plaquettes (Finney et al., 2012; Osada et al., 2012) présentent du sang dans les vaisseaux lymphatiques au cours du développement.

Les plaquettes participent également à l'angiogenèse, importante lors du développement mais aussi suite à une ischémie localisée, puisqu'elles libèrent des facteurs pro-angiogéniques depuis les granules α comme le VEGF, le PDGF ou l'EGF. Cette capacité des plaquettes

activées à libérer des facteurs de croissance leur confère également un rôle dans la réparation tissulaire ce qui facilite le recrutement de cellules inflammatoires et de fibroblastes.

Les plaquettes interviennent dans l'immunité innée puisque leurs récepteurs *toll-like receptor* (TLR)-1 à 9 sont en mesure de reconnaître des pathogènes et d'initier une réponse antimicrobienne. En réponse au lipopolysaccharide (LPS), les TLR-4 des plaquettes lient les bactéries et sécrètent des peptides antimicrobiens comme les thrombocidines, les kinocidines et la thymosine β 4 pour les éliminer (Tang et al., 2002; Yeaman, 2014). Cette interaction LPS – TLR-4 favorise également l'interaction plaquettes – neutrophiles, conduisant à la formation de NETs qui permettent d'éliminer les pathogènes (Clark et al., 2007).

Les plaquettes sont impliquées dans certaines pathologies comme la métastase tumorale. Ceci a été mis en évidence par Gasic et ses collaborateurs qui ont montré qu'une thrombopénie réduit la capacité de cellules tumorales à coloniser le poumon après leur injection intraveineuse, processus réversé lors d'une transfusion de plaquettes (Gasic et al., 1968).

Les plaquettes semblent également impliquées dans l'arthrite rhumatoïde comme suggéré par l'augmentation du compte plaquettaire, appelée thrombocytose, observée chez les patients souffrant de cette maladie inflammatoire, qui est corrélée à la sévérité de la maladie (Hutchinson et al., 1976). Ce rôle des plaquettes dans l'arthrite rhumatoïde a été confirmé dans un modèle murin pour lequel une déplétion des plaquettes conduit à une réduction de l'inflammation (Boilard et al., 2010).

Enfin, les plaquettes semblent jouer un rôle dans des maladies autoimmunes comme par exemple le lupus érythémateux systémique. Ceci a été suggéré par l'augmentation d'activation basale des plaquettes ainsi que du CD40L soluble dans le sérum des patients, les plaquettes étant la principale source de cette protéine (Duffau et al., 2010). De plus, dans un modèle de souris, une thrombopénie réduit la présence d'anticorps et l'infiltration de leucocytes (Duffau et al., 2010).

III. L'inflammation

L'inflammation est un mécanisme physiologique de défense du système immunitaire en réponse à une agression de l'organisme. Elle peut être septique c'est-à-dire induite par un pathogène comme une bactérie, un virus ou un parasite, ou aseptique induite par un allergène par exemple du pollen ou certains aliments, un agent physique comme un traumatisme ou une brûlure, un agent chimique comme une toxine, ou encore une réaction auto-immune comme dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaques (Hawiger and Zienkiewicz, 2019). L'inflammation peut être aiguë, caractérisée par une réponse à l'agression immédiate et de courte durée, au maximum quelques semaines, ou chronique persistant pendant plusieurs mois voire des années. Elle est généralement bénéfique puisqu'elle permet d'éliminer l'agent responsable de l'agression et de faciliter la réparation tissulaire. Cependant, elle peut devenir délétère si elle est prolongée comme dans le cas des maladies auto-immunes.

A. Le mécanisme général de la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire fait intervenir en premier lieu la phase vasculaire qui est caractérisée par quatre signes cardinaux : la rougeur, la chaleur, le gonflement et la douleur. En effet, les leucocytes détectent un signal de danger, s'activent et sécrètent des médiateurs inflammatoires. Les phagocytes et les mastocytes sécrètent notamment la prostacycline, les leucotriènes, le facteur d'activation plaquettaire (PAF) et le NO induisant une relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires et donc une vasodilatation des artérioles et des capillaires de la zone inflammatoire (Medzhitov, 2008). Cette vasodilatation conduit à une augmentation de l'apport sanguin local et à un ralentissement du flux, induisant la rougeur et la chaleur au site inflammatoire (Sherwood and Toliver-Kinsky, 2004). Ensuite, un œdème apparaît suite au passage de plasma dans le tissu interstitiel, ce qui se traduit par un gonflement des tissus pouvant comprimer les terminaisons nerveuses et déclencher la douleur. Cet œdème est dû à une augmentation de la pression hydrostatique suite à la vasodilatation locale et à l'augmentation de perméabilité de la paroi des microvaisseaux sous l'effet des médiateurs inflammatoires comme l'histamine, la bradykinine, les leucotriènes et les protéines du complément (Medzhitov, 2008; Sherwood and Toliver-Kinsky, 2004). Enfin, la diapédèse des leucocytes

permet leur transmigration hors de la circulation sanguine et leur accumulation au site inflammatoire.

Par la suite, la phase cellulaire intervient avec la formation d'un granulome inflammatoire composé de cellules endothéliales, de fibroblastes, de mastocytes et de macrophages résidents, mais aussi de polynucléaires, de monocytes et de lymphocytes provenant de la circulation. Enfin la phase de résolution comprend la détersion, c'est-à-dire l'élimination des tissus lésés et des pathogènes, initiée par les polynucléaires et les macrophages recrutés au sein du granulome inflammatoire puisqu'ils sont capables de phagocytose. Cette dernière phase comprend également la réparation et la cicatrisation.

B. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la réaction inflammatoire

1. L'activation des cellules endothéliales

La libération de médiateurs inflammatoires par les cellules immunitaires lors d'une agression de l'organisme active les cellules endothéliales (Pober and Sessa, 2007). On trouve d'une part les médiateurs inflammatoires activant des RCPG avec l'histamine qui est libérée des granules des mastocytes et des basophiles suite à leur activation (Borriello et al., 2017) et qui lie son récepteur H1 couplé à une protéine $G\alpha$ situé sur les cellules endothéliales (Heltianu et al., 1982). La signalisation *via* H1 conduit à l'activation de la $PLC\beta$ et à l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (Rotrosen and Gallin, 1986). L'activation des cellules endothéliales conduit à la libération de médiateurs lipidiques *via* la PLA_2 avec notamment le PAF, des leucotriènes et des prostaglandines dont la PGI_2 impliquée dans la vasodilatation (Sharma et al., 2010). De plus, la formation de complexes calcium-calmoduline augmente la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et initie la contraction de l'actine liée aux jonctions inter-endothéliales, induisant ainsi la formation d'espaces entre les cellules endothéliales et des fuites vasculaires (Garcia et al., 1995).

D'autre part, les cytokines inflammatoires sécrétées par les leucocytes activés stimulent également les cellules endothéliales : le facteur de nécrose tumorale α ($TNF\alpha$) par l'intermédiaire du récepteur $TNFR1$ et de la voie du *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* ($NF\kappa B$), et l'interleukine (IL) 1 *via* son récepteur $IL-1R$. Cette activation induit l'expression de molécules d'adhérence avec notamment la P-sélectine, la E-sélectine, le

vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) et l'*intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) qui permettent l'interaction avec les intégrines des leucocytes (Poerber and Sessa, 2007). Le TNF α et l'IL-1 induisent aussi la production de cytokines et de chimiokines comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF α par les cellules endothéliales (Krishnaswamy et al., 1998; Nilsen et al., 1998). Enfin, ces cytokines inflammatoires sont aussi responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire par ouverture des jonctions endothéliales (Ganter et al., 2008; Royall et al., 1989; Wójciak-Stothard et al., 1998).

Les médiateurs inflammatoires présentés ici ne sont pas les seuls à activer l'endothélium, d'autres facteurs comme les LDL oxydées, le LPS et la protéine C réactive jouent également ce rôle (Menden et al., 2013; Verma et al., 2002).

2. La diapédèse des leucocytes

La diapédèse des leucocytes est définie comme le processus de migration des leucocytes à travers la paroi vasculaire pour atteindre le site inflammatoire et se fait en plusieurs étapes : i) l'adhérence transitoire et le roulement à la surface des cellules endothéliales ; ii) l'arrêt ; iii) le crawling ; iv) la transmigration endothéliale ; v) et enfin, le passage de la membrane basale (Ley et al., 2007) (**Figure 20**).

2.1. L'adhérence transitoire et le roulement des leucocytes

La première étape de la diapédèse des leucocytes est leur adhérence faible et transitoire à l'endothélium vasculaire activé exprimant des molécules d'adhérence, ce qui induit leur roulement. Cette interaction fait intervenir la E-sélectine et la P-sélectine exposée à la surface de cellules endothéliales activées ainsi que leurs ligands situés sur les leucocytes, le *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) principalement (Mehta et al., 1998; Norman et al., 1995, 2000; Xia et al., 2002), mais aussi l'*E-selectin ligand-1* (ESL-1) et le CD44 (Hidalgo et al., 2007). L'adhérence transitoire fait également intervenir l'interaction entre les intégrines $\alpha 4$ leucocytaires, notamment le *very late antigen-4* (VLA-4 ou $\alpha 4\beta 1$) et VCAM-1 endothélial (Chan et al., 2001). Enfin, l'adhérence transitoire peut également se faire par l'interaction entre

les leucocytes déjà adhérents et les leucocytes circulants *via* l'interaction entre la L-sélectine et PSGL-1 (Walcheck et al., 1996).

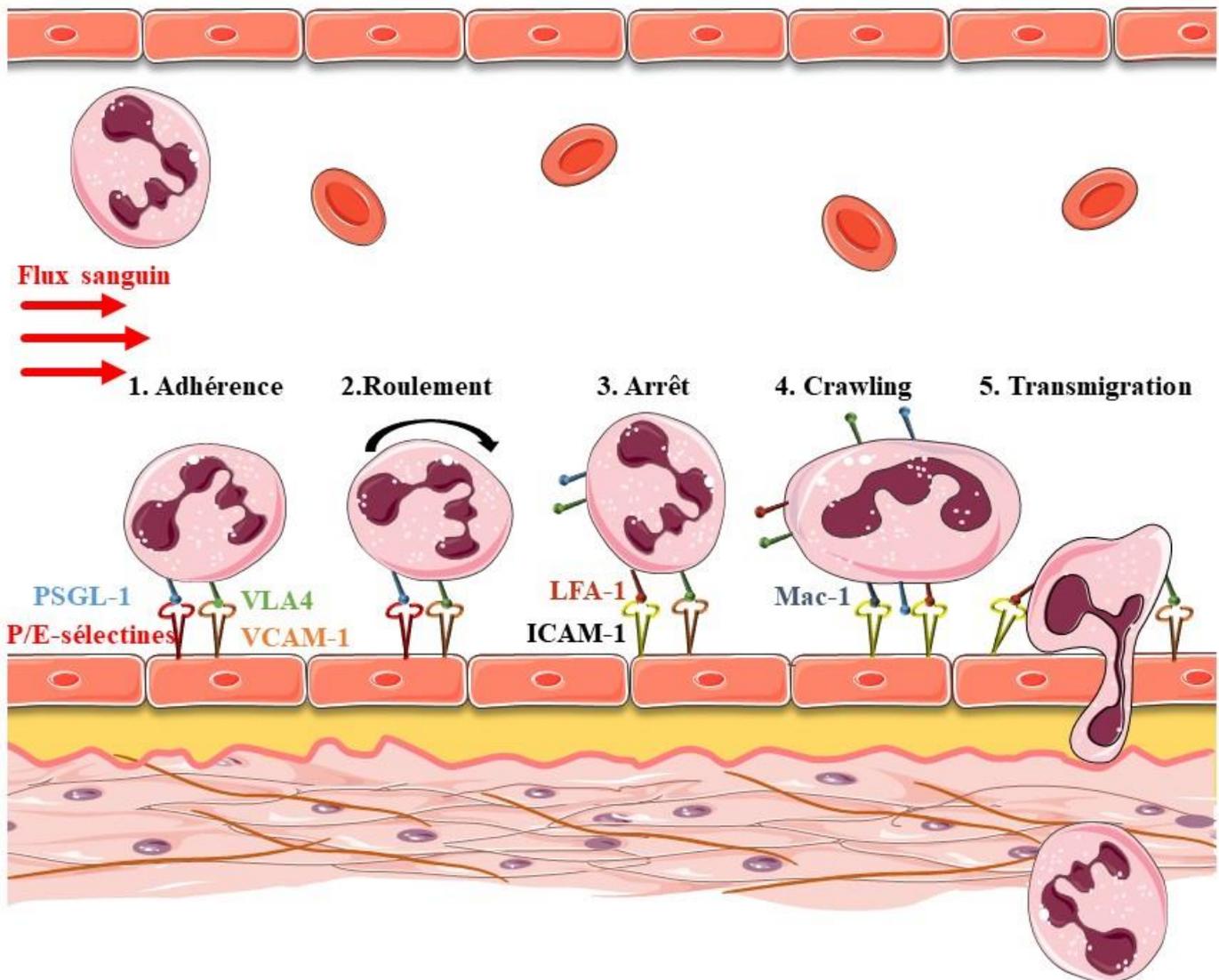


Figure 20 : Les différentes étapes de la diapédèse des leucocytes. ICAM-1, *intracellular adhesion molecule 1*; LFA-1, *Lymphocyte function-associated antigen 1*; Mac-1, *macrophage antigen-1*; PSGL-1, *P-selectin glycoprotein ligand-1*; VLA4, *Very Late Antigen-4*; VCAM-1, *vascular cellular adhesion molecule 1* (Adapté de Caster et al., 2017).

2.2. L'arrêt des leucocytes

Le roulement des leucocytes permet l'interaction de leurs RCPGs avec les chimiokines libérées par les cellules endothéliales activées. En effet, les chimiokines comme l'IL-8, le CXCL1 ou le CXCL2 chargées positivement sont immobilisées à la surface de l'endothélium par liaison à l'héparane sulfate chargé négativement (Massena et al., 2010). Leur interaction avec les RCPGs des leucocytes induit le changement de conformation des intégrines leucocytaires vers un état de forte affinité pour les ligands (Mócsai et al., 2015). L'interaction des intégrines *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1 ou α L β 2) et VLA-4 avec leurs ligands endothéliaux respectifs, ICAM-1 et VCAM-1, permet l'arrêt des leucocytes (Nourshargh and Alon, 2014). L'implication de ces intégrines est confirmée par les déficits d'adhérence leucocytaire de type I (LAD-I) et de type III (LAD-III), caractérisés par une mutation du gène codant pour les intégrines β 2 ou pour la kindline-3, une protéine du cytosquelette impliquée dans l'activation des intégrines, conduisant à une réduction de l'arrêt des leucocytes (Das et al., 2020).

2.3. Le crawling des leucocytes

Lorsque les leucocytes sont fermement adhérents à l'endothélium, ils s'aplatissent et se polarisent afin de réaliser le crawling, c'est-à-dire une migration à la recherche d'un site compatible à leur transmigration. Cette étape fait intervenir l'interaction entre l'intégrine Mac-1 ou α M β 2 des leucocytes et ICAM-1 des cellules endothéliales (Phillipson et al., 2006). En effet, il a été mis en évidence que bloquer Mac-1 avec un anticorps ou utiliser des neutrophiles déficients en Mac-1 réduit les déplacements des leucocytes (Phillipson et al., 2006; Schenkel et al., 2004). PSGL-1 serait également impliqué dans le crawling puisque les neutrophiles de souris déficientes pour le PSGL-1 voient leur crawling réduit (Sreeramkumar et al., 2014). Il dépendrait aussi de LFA-1 et du *Vav guanine nucleotide exchange factor 1* (VAV-1), impliqués dans la migration directionnelle (Phillipson et al., 2009; Schenkel et al., 2004).

2.4. La transmigration des leucocytes

Une fois le site de transmigration repéré, les leucocytes adhérents se trouvent entourés de régions de cellules endothéliales riches en ICAM-1 et VCAM-1, formant une structure de

type « coupe de transmigration » (Barreiro et al., 2008; Carman and Springer, 2004). Les leucocytes peuvent alors effectuer l'extravasation hors des vaisseaux sanguins depuis la face luminale jusqu'à la face basale des cellules endothéliales. Elle peut se faire par la voie paracellulaire par les jonctions entre les cellules endothéliales ou par la voie transcellulaire directement à travers les cellules endothéliales.

La transmigration paracellulaire

La transmigration paracellulaire est la voie la plus fréquemment empruntée par les leucocytes avec jusqu'à 90% des passages. Elle s'effectue entre deux cellules endothéliales adjacentes, au niveau des jonctions cellulaires.

Suite à l'interaction des intégrines des leucocytes avec ICAM-1 et VCAM-1 des cellules endothéliales, la transmigration paracellulaire est régulée par la VE-cadhérine des jonctions intermédiaires selon plusieurs mécanismes : i) la phosphorylation de la VE-cadhérine la dissocierait du cytosquelette d'actine, aboutissant ainsi à l'ouverture des jonctions et à la transmigration des leucocytes (Allingham et al., 2007; Turowski et al., 2008) ; ii) la dissociation de la *vascular endothelial protein tyrosine phosphatase* de la VE-cadhérine, qui maintient la VE-cadhérine dans un état déphosphorylé, faciliterait sa phosphorylation (Broermann et al., 2011; Nottebaum et al., 2008) ; et iii) la redistribution de la VE-cadhérine à distance des jonctions du site inflammatoire favoriserait aussi la transmigration (Allport et al., 2000; Shaw et al., 2001). De plus, d'autres molécules de jonctions comme la *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), la molécule d'adhérence de jonction-A (JAM-A) et CD99 sont également impliquées dans la transmigration paracellulaire (Lou et al., 2007; Muller et al., 1993; Woodfin et al., 2007). Au-delà des mécanismes directement liés aux molécules de jonctions, la liaison des leucocytes aux cellules endothéliales augmente également les niveaux de calcium cytosolique de l'endothélium (Huang et al., 1993), induisant la contraction des cellules endothéliales et la formation de trous entre elles ce qui favorise la transmigration (Saito et al., 1998).

La transmigration transcellulaire

La transmigration transcellulaire est plutôt rare et intervient surtout au niveau de la barrière hémato-encéphalique du fait de la présence de nombreuses jonctions serrées réduisant le passage paracellulaire. Ce type de transmigration nécessite la mise en place d'un canal transcellulaire entre les membranes endothéliales apicales et basales (Carman et al., 2007). Le crawling des leucocytes, le regroupement d'ICAM-1, l'intervention de PECAM-1 et de JAM-

A (Carman, 2009), mais également l'extension de protrusions leucocytaires dans les membranes des cellules endothéliales, sont nécessaires.

2.5. Le passage des leucocytes à travers la membrane basale

Après le passage de la couche de cellules endothéliales, les leucocytes doivent également traverser la membrane basale sous-jacente afin de terminer la transmigration dans le milieu interstitiel. La membrane basale présente une distribution irrégulière de ses composants avec des zones où l'expression des laminines et du collagène est fortement réduite (Voisin et al., 2010; Wang et al., 2006). Il a été proposé que les neutrophiles dégraderaient les composants de la membrane basale, dont le collagène IV, le nidogène, les protéoglycanes et les laminines, du fait de l'expression à leur surface de protéases comme l'élastase et les métalloprotéases matricielles, ce qui leur permettrait de se frayer un chemin (Cepinskas et al., 1999; Delclaux et al., 1996; Keck et al., 2002; Wang et al., 2005). De plus, au niveau des capillaires et des veinules post-capillaires, des péricytes enchâssés dans cette membrane forment une couche discontinue de cellules et il a été montré que les zones de faible expression en laminines et en collagène correspondraient aux zones de discontinuité des péricytes (Voisin et al., 2010; Wang et al., 2006). Ces zones représenteraient la localisation préférentielle de passage des leucocytes puisqu'elles présentent une moindre résistance.

C. Le rôle des plaquettes dans l'inflammation

La participation des plaquettes aux processus inflammatoires est bien documentée. Elle est notamment mise en évidence par la réduction du recrutement des neutrophiles lors d'une thrombopénie dans certains modèles inflammatoires comme la dermatite cutanée (Hara et al., 2010), l'hypersensibilité de contact (Tamagawa-Mineoka et al., 2007) et la péritonite (Kornerup et al., 2010; Petri et al., 2010). L'implication des plaquettes dans l'inflammation est basée sur deux mécanismes distincts. D'une part, un rôle direct lié à la capacité des plaquettes à interagir physiquement avec les acteurs de l'inflammation dont les cellules endothéliales activées et les leucocytes ce qui facilite le recrutement de ces derniers au site inflammatoire. D'autre part, un rôle indirect par lequel les plaquettes activées libèrent le contenu de leurs granules menant à la

régulation des cellules immunitaires. Les différentes interactions moléculaires impliquées dans ce processus sont résumées dans le **Tableau 2**.

La participation des plaquettes au processus inflammatoire peut également conduire à un phénomène appelé thromboinflammation. Il survient notamment lors de l'AVC ischémique où une activation de l'endothélium induite par l'ischémie entraîne le recrutement de plaquettes et de leucocytes (De Meyer et al., 2016). Il a également été mis en évidence que les patients souffrant d'un AVC ischémique, présentent une augmentation des complexes leuco-plaquettaires, indiquant une coopération entre ces deux types cellulaires dans la pathologie (McCabe et al., 2005).

Tableau 2 : Résumé des interactions moléculaires impliquant les plaquettes dans l'inflammation.

CD40L, CD40 ligand; EMMPRIN, *extracellular matrix metalloproteinase inducer*; FW, facteur Willebrand; GP, glycoprotéine; HMGB1, *high-mobility group box 1*; ICAM, *intracellular adhesion molecule*; IL, interleukine; LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen-1*; Mac-1, *macrophage-1 antigen*; MMP, métalloprotéases matricielles; NAP2, *neutrophil activating peptide 2*; NETs, *neutrophil extracellular traps*; PAF, facteur d'activation plaquettaire; PF4, facteur plaquettaire 4; PSGL-1, *P-selectin glycoprotein ligand-1*; RANTES, *regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted*; ROS, espèces réactives de l'oxygène; VEGF, facteur de croissance endothélial vasculaire.

	Plaquettes – cellules endothéliales		Plaquettes – cellules immunitaires	
	Récepteur/molécule impliqué(e)	Effet	Récepteur/molécule impliqué(e)	Effet
Interaction via les récepteurs de surface	P-sélectine – PSGL-1 GPIb α – P-sélectine CD40L – CD40 α IIb β 3 – FW – α v β 3 α IIb β 3 – ICAM-1 α IIb β 3 – fibrinogène – ICAM-1	Activation des plaquettes et libération du contenu des granules	CD40L – CD40 CD40 – CD40L ICAM2 – Mac-1 ICAM-2 – LFA-1 GPVI – EMMPRIN P-sélectine – PSGL-1 α IIb β 3 – fibrinogène – Mac-1 GPIb – Mac-1 GPIb – LFA-1	Recrutement des leucocytes Recrutement des leucocytes Agrégats plaquettes – leucocytes Formation de NETs Recrutement des leucocytes Agrégats plaquettes - leucocytes Dégranulation des leucocytes (élastase, MMP, libération de ROS) Formation de NETs
Libération du contenu des granules plaquettaires	VEGF Sérotonine PAF	Augmentation de la perméabilité endothéliale facilitant la transmigration des neutrophiles	IL1- β Sérotonine NAP2 HMGB1 RANTES PF4	Recrutement des leucocytes Recrutement des leucocytes Formation de NETs Recrutement des leucocytes Dégranulation des leucocytes (élastase, MMP, libération de ROS) Formation de NETs

IV. Les saignements en conditions inflammatoires

Les saignements en conditions inflammatoires se manifestent dans différents territoires vasculaires. Au niveau de la peau, on constate la présence de pétéchies caractérisées par des points rouges, causés par un saignement mineur dû à la rupture de capillaires, ne disparaissant pas à la vitropression et d'un diamètre inférieur à 10 mm. Ces saignements cutanés sans gravité en tant que tels peuvent cependant être le signe d'une pathologie sous-jacente plus grave comme un sepsis sévère ou une méningite bactérienne. Au niveau d'autres organes, par exemple dans le cerveau, les saignements en condition inflammatoire sont généralement dus à la transformation hémorragique d'un AVC ischémique. On en trouve également au niveau des poumons suite à une pneumonie ou à une bronchite par exemple (Earwood and Thompson, 2015). Les conséquences sont alors bien plus graves qu'au niveau cutané. Dans la suite de ce travail, nous nous sommes focalisés tout particulièrement sur ces trois organes, la peau, le cerveau et les poumons.

A. Le rôle des neutrophiles dans le déclenchement des saignements en conditions inflammatoires

Deux groupes ont montré un rôle majeur des neutrophiles dans l'induction des saignements cutanés en condition inflammatoire dans un modèle murin de vascularite induite par des complexes immuns, aussi appelée réaction passive inversée d'Arthus (rpA). En effet, une déplétion de plus de 70% des neutrophiles réduit fortement l'apparition des saignements (Gros et al., 2015; Hillgruber et al., 2015). C'est la transmigration des neutrophiles qui a été identifiée comme l'étape clé de ce processus puisqu'elle induit la formation de trou au niveau de la paroi vasculaire et de ce fait, l'apparition de saignements, comme mis en évidence grâce à l'inhibition pharmacologique de la transmigration et l'imagerie intravitale (Hillgruber et al., 2015).

Ce rôle des neutrophiles dans l'induction des saignements en conditions inflammatoires a également été étudié au niveau d'autres organes chez la souris. Au niveau pulmonaire, leur rôle semble proche de celui retrouvé au niveau cutané puisqu'une déplétion des neutrophiles réduit l'apparition de saignements, tout comme une inhibition pharmacologique de leur transmigration (Hillgruber et al., 2015). Un résultat similaire a également été observé au niveau

rénal suite à l'inhibition d'infiltration des neutrophiles dans un modèle de glomérulonéphrite (Hirahashi et al., 2009). Pour ce qui est du cerveau, une transmigration des neutrophiles comme inducteur de saignements n'a pas encore été décrite, malgré la mise en évidence de leur recrutement suite à une inflammation.

B. La participation des plaquettes dans le déclenchement des saignements en conditions inflammatoires

La capacité des plaquettes à interagir avec les cellules endothéliales activées et à permettre le recrutement des neutrophiles (**Tableau 2**) implique qu'elles participent au processus d'induction des lésions endothéliales menant aux saignements en situation inflammatoire. Ce rôle a été démontré lors d'une thrombopénie chez la souris, par une diminution tissulaire de la concentration de myéloperoxydase (MPO), un marqueur de l'infiltration des neutrophiles, et par des observations intravitales qui ont montré un recrutement moindre de leucocytes dans les tissus (Gros et al., 2015; Hillgruber et al., 2015).

C. Le rôle des plaquettes dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires

Même si les plaquettes facilitent le recrutement des neutrophiles, leur rôle majeur est d'arrêter les saignements en conditions inflammatoires. Ceci est notamment illustré dans une publication qui décrit le cas d'un patient présentant une thrombopénie modérée, qui suite à un coup de soleil a développé des pétéchies localisées au niveau de la zone inflammatoire (Carbo et al., 2009).

Le rôle des plaquettes dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires a été étudié dans différents modèles expérimentaux, comme la réaction passive inversée d'Arthus (rpA), l'inflammation pulmonaire induite par du LPS ou encore l'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (tMCAO). A noter qu'une limite de ces modèles, impliquant qu'ils ne reflètent pas tout à fait la situation chez l'Homme, est qu'une thrombopénie sévère est requise pour observer des saignements, c'est-à-dire moins de 5% du compte plaquettaire normal. Cette observation a été faite par plusieurs groupes et dans plusieurs modèles, notamment i) des modèles cutanés comme la rpA (Boulaftali et al., 2013; Deppermann et al.,

2017; Goerge et al., 2008; Gros et al., 2015; Hillgruber et al., 2015; Lee et al., 2017; Rayes et al., 2018a), la dermatite irritante de contact (Goerge et al., 2008; Hillgruber et al., 2015) ou celle due aux rayonnements UV (Hillgruber et al., 2015) ii) des modèles pulmonaires qu'ils soient induits par les LPS (Boulaftali et al., 2013; Deppermann et al., 2017; Goerge et al., 2008; Hillgruber et al., 2015; Lax et al., 2017; Lee et al., 2017; Rayes et al., 2018a) ou par rpA (Rayes et al., 2018a) ; et iii) des modèles cérébraux d'ischémie reperfusion induits par occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (tMCAO) (Goerge et al., 2008; Zhao et al., 2009). On retrouve aussi des saignements en conditions inflammatoires en cas de thrombopénie dans des modèles de glomérulonéphrite à complexes immuns (Hirahashi et al., 2009), d'infection virale (Iannacone et al., 2008) ou de tumeur solide (Demers et al., 2011; Ho-Tin-Noé et al., 2008, 2009).

1. Les plaquettes dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires : mécanismes cellulaires

Concernant le mécanisme cellulaire, il a été proposé que l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires se ferait *via* des plaquettes individuelles qui couvriraient les zones de passage des neutrophiles à travers les cellules endothéliales créant une barrière physique bouchant ainsi les lésions, un rôle donc purement mécanique (Gros et al., 2014). Ce phénomène pourrait différer du processus hémostatique classique dans le sens où seulement une ou plusieurs monocouches de plaquettes sont formées, par rapport à un clou hémostatique qui contient de très nombreuses plaquettes agrégées (Gros et al., 2015). En plus de leur rôle purement mécanique, il a également été proposé que les plaquettes pourraient sceller les brèches vasculaires induites par le passage des neutrophiles en sécrétant le contenu de leurs granules (Gros et al., 2014, 2015). En effet, même en l'absence d'agrégation, l'interaction des plaquettes avec les protéines matricielles exposées au niveau des lésions endothéliales entrainerait la libération de facteurs solubles comme l'angiopoïétine-1 et la sphingosine-1-phosphate (S1P) ayant la capacité de resserrer les jonctions endothéliales (Gros et al., 2014; Herzog et al., 2013; Ollivier et al., 2014) (**Figure 21**).

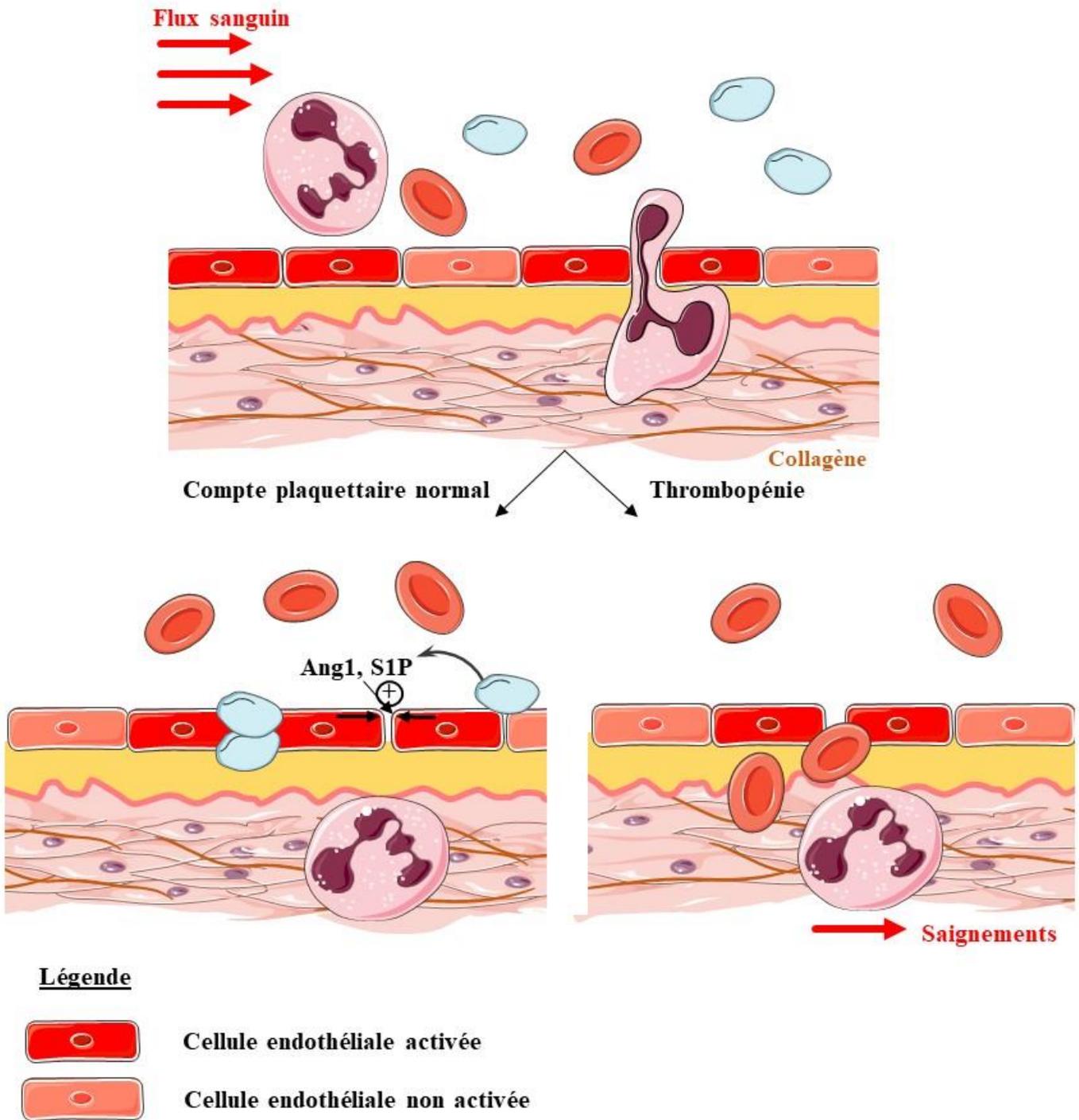


Figure 21 : Le rôle des plaquettes dans l'arrêt du saignement en conditions inflammatoires. Ang1, angiopoïétine 1; S1P, sphingosine-1-phosphate (Adapté de Gros *et al.*, 2015).

2. Les plaquettes dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires : mécanismes moléculaires

Le rôle de la GPVI dans l'arrêt des saignements en condition inflammatoire a été mis en évidence dans le modèle de rpA cutané chez des souris génétiquement déficientes pour ce récepteur (GPVI^{-/-}) (Gros et al., 2015; Rayes et al., 2018a) et chez des souris fortement thrombopéniques transfusées avec des plaquettes déficientes en GPVI (Boulaftali et al., 2013). La GPVI serait également impliquée dans l'arrêt de ces saignements au niveau du myocarde (Pachel et al., 2016) et de tumeurs solides (Volz et al., 2019). Au niveau pulmonaire, un modèle d'inflammation basé sur l'inoculation intranasale de LPS et la transfusion de plaquettes déficientes en GPVI à des souris thrombopéniques suggère également un rôle de ce récepteur (Boulaftali et al., 2013), qui n'a pas été confirmé chez des souris GPVI^{-/-} (Rayes et al., 2018a). Enfin, la GPVI n'est pas impliquée dans l'arrêt des saignements cérébraux en condition inflammatoire (Kleinschnitz et al., 2007; Kraft et al., 2015).

Le rôle d'un deuxième récepteur ITAM plaquettaire, CLEC-2, dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires a également été évalué. Son implication a été mise en évidence dans un modèle de rpA et un modèle d'inflammation pulmonaire au LPS basé sur de la transfusion de plaquettes (Boulaftali et al., 2013), mais n'a pas été confirmé chez des souris déficientes pour CLEC-2 au niveau plaquettaire (Rayes et al., 2018a). Cependant, l'utilisation de souris déficientes à la fois pour GPVI et CLEC-2 met en évidence des saignements cutanés plus importants que pour les souris GPVI^{-/-} (Rayes et al., 2018a), indiquant une coopération entre ces deux récepteurs où GPVI jouerait un rôle majeur et CLEC-2 un rôle mineur.

Les saignements cutanés en conditions inflammatoires observés chez les souris déficientes pour GPVI et CLEC-2 restent moins importants que ceux retrouvés chez les souris thrombopéniques, indiquant l'implication probable d'autres récepteurs plaquettaires. Parmi ces autres récepteurs potentiels, on trouve le complexe GPIb-IX-V et l'intégrine α IIb β 3 impliqués dans l'arrêt des saignements suite à un traumatisme. L'utilisation de souris transgéniques exprimant un complexe GPIb-IX-V non fonctionnel, où la partie intracellulaire et transmembranaire de la GPIb α est couplée à la partie extracellulaire du récepteur IL4R humain (hIL-4R α /GPIb α), ou des souris KO pour son principal ligand, le FW, ne présentent pas de saignements aux points inflammatoires dans un modèle de rpA cutanée, indiquant que ce récepteur ne joue pas de rôle majeur dans l'arrêt des saignements en condition inflammatoire

au niveau de la peau (Goerge et al., 2008; Rayes et al., 2018a). De même, au niveau cérébral et dans les tumeurs solides l'absence de GPIb-IX-V fonctionnel n'induit pas de saignement (Ho-Tin-Noé et al., 2008; Kleinschnitz et al., 2007; Kraft et al., 2015). Cependant, au niveau pulmonaire des saignements modérés apparaissent chez les souris hIL-4R α /GPIba suite à l'inoculation intranasale de LPS suggérant un rôle modeste du complexe GPIb-IX-V dans l'arrêt des saignements en condition inflammatoire pulmonaire, mais pas lors d'une rpA pulmonaire (Rayes et al., 2018a).

Pour sa part, l'intégrine α IIb β 3 ne semble à première vue pas impliquée dans l'arrêt des saignements en condition inflammatoire au niveau cutané puisque les souris totalement déficientes pour les intégrines β 3 ou traitées par un anticorps anti- α IIb β 3 ne présentent pas de saignement dans un modèle de rpA (Deppermann et al., 2017; Goerge et al., 2008). Comme pour la peau, l'intégrine α IIb β 3 ne semble pas impliquée au niveau des poumons ou d'une tumeur solide (Ho-Tin-Noé et al., 2009; Rayes et al., 2018b). En revanche, au niveau cérébral, un inhibiteur d' α IIb β 3 induit des saignements intracrâniens dans le modèle de tMCAO (Kleinschnitz et al., 2007; Kraft et al., 2015).

L'implication d'autres récepteurs plaquettaires dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires a également été étudiée. L'utilisation d'un modèle de rpA cutanée et de LPS intranasal avec transfusion de plaquettes, a montré que les récepteurs TP, P2Y₁₂ et PAR4 ne seraient pas impliqués dans l'arrêt de ces saignements (Boulaftali et al., 2013). En revanche, dans un modèle de colite, il a été mis en évidence que le P2X₁, un récepteur de l'ATP, serait nécessaire à l'arrêt des saignements intestinaux en condition inflammatoire (Wéra et al., 2020). Enfin, la P-sélectine ne semble pas jouer de rôle majeur dans l'arrêt des saignements en condition inflammatoire au niveau de la peau (Goerge et al., 2008) alors que le *triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) like transcript – 1* (TLT-1), serait pour sa part impliqué (Jessica et al., 2018).

En résumé, l'ensemble de ces données de la littérature met en évidence que l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires au niveau de la peau est indépendant des principaux récepteurs classiquement impliqués dans l'arrêt des saignements suite à un traumatisme, à savoir le complexe GPIb-IX-V et l'intégrine α IIb β 3, mais qu'il dépend des récepteurs ITAMs GPVI et CLEC-2. De plus, la contribution des différents récepteurs plaquettaires dépend de l'organe observé, sûrement du fait des conditions rhéologiques différentes, et probablement également du mécanisme déclenchant l'inflammation (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Résumé des récepteurs plaquettaires impliqués dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires. CalDAG-GEFI, *calcium and DAG-regulated guanine-nucleotide-exchange factor*; CLEC-2, *C-type lectin-like receptor-2*; Fc γ R, chaîne γ des récepteurs Fc; FW, facteur Willebrand; GP, glycoprotéine; IL, interleukine; LPS, lipopolysaccharide; rpA, réaction passive inversée d'Arthus; PAR-4, *protease-activated receptor-4*; tMCAO, occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne.

	Modèles expérimentaux			Références
	Cutané	Pulmonaire	Cérébral	
GPIb-IX-V	rpA hIL4R α -GPIb α ou FW $^{-/-}$: absence de saignement	LPS hIL4R α -GPIb α ou FW $^{-/-}$: saignements modérés rpA hIL4R α -GPIb α : absence de saignement	tMCAO anti-GPIb α : absence de saignement	Goerge <i>et al</i> , 2008 Rayes <i>et al</i> , 2018 Kleinschnitz <i>et al</i> , 2007 Kraft <i>et al</i> , 2015
GPVI	rpA ou dermatite irritante de contact Fc γ R $^{-/-}$: absence de saignement rpA GPVI $^{-/-}$: saignements rpA transfusion traitement JAQ.1 : réduction des saignements	LPS transfusion traitement JAQ.1 : réduction des saignements	tMCAO traitement JAQ.1 : absence de saignement	Goerge <i>et al</i> , 2008 Sylvestre <i>et al</i> , 1994 Gros <i>et al</i> , 2015 Rayes <i>et al</i> , 2018 Boulaftali <i>et al</i> , 2013 Kleinschnitz <i>et al</i> , 2007 Kraft <i>et al</i> , 2015
CLEC-2	rpA PF4Cre-CLEC-2 : absence de saignement rpA transfusion CLEC-2 $^{-/-}$: réduction des saignements	LPS PF4Cre-CLEC-2 : absence de saignement LPS transfusion CLEC-2 $^{-/-}$: réduction des saignements		Rayes <i>et al</i> , 2018 Boulaftali <i>et al</i> , 2013
GPVI + CLEC-2	rpA GPVI $^{-/-}$ + PF4Cre-CLEC-2 : saignements plus important que GPVI $^{-/-}$ rpA transfusion traitement JAQ.1 + CLEC-2 $^{-/-}$: pas de réduction des saignements	LPS GPVI $^{-/-}$ + anti-podoplanine : absence de saignement LPS transfusion traitement JAQ.1 + CLEC-2 $^{-/-}$: pas de réduction des saignements		Rayes <i>et al</i> , 2018 Boulaftali <i>et al</i> , 2013
P2Y₁₂ + TP + PAR-4	rpA transfusion PAR4 $^{-/-}$ + clopidogrel + aspirine ou individuellement : correction des saignements	LPS transfusion PAR4 $^{-/-}$ + clopidogrel + aspirine : correction des saignements		Boulaftali <i>et al</i> , 2013
αIIBβ3	rpA β 3 $^{-/-}$ total ou CalDAG-GEFI $^{-/-}$ ou anti- α IIB β 3 : absence de saignement	LPS anti- α IIB β 3 : absence de saignement	tMCAO anti- α IIB β 3 : saignements	Goerge <i>et al</i> , 2008 Rayes <i>et al</i> , 2018 Kleinschnitz <i>et al</i> , 2007 Kraft <i>et al</i> , 2015

Problématisation du sujet et objectifs de la thèse

Les traitements antithrombotiques utilisés en clinique, malgré leur efficacité dans la réduction de la thrombose, présentent un risque de saignement. Disposer d'agents qui inhiberaient la thrombose artérielle mais avec un risque hémorragique faible représenterait une avancée majeure. Un premier objectif de ma thèse a porté sur la caractérisation et l'identification de nouvelles cibles antiplaquettaires potentiellement plus sûres. Deux agents anti-GPVI ont été évalués favorablement dans des essais cliniques de phase 1. Ils ne présentent pas d'impact sur l'hémostase et sont en cours d'évaluation dans le traitement de la thrombose artérielle dans des essais de phase 2. Il semble donc essentiel de parfaitement maîtriser le rôle de ce récepteur dans la formation d'un thrombus. Récemment, le laboratoire a identifié le fibrinogène comme un nouveau ligand de la GPVI impliqué dans la croissance du thrombus chez l'Homme. Un travail auquel j'ai participé (voir **Annexe**) a montré que la GPVI, par son interaction avec le fibrinogène, joue également un rôle dans la stabilité du thrombus chez l'Homme. Afin d'étudier ce rôle *in vivo*, j'ai mené une étude ayant pour but de confirmer dans la souris, le rôle de la GPVI dans la croissance et la stabilité d'un thrombus.

En parallèle, mon travail de thèse s'est intéressé à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ plaquettaire, qui est connue pour être un récepteur de la fibronectine, mais dont l'importance en hémostase et en thrombose artérielle n'était pas connue. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'intérêt de cibler cette intégrine dans le cadre d'une approche antithrombotique.

Les plaquettes jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité vasculaire et sont impliquées dans l'arrêt du saignement en conditions inflammatoires. Au niveau moléculaire, des études réalisées au cours des 15 dernières années décrivent un rôle important des récepteurs plaquettaires GPVI et CLEC-2 dans ce processus, contrairement au complexe GPIb-IX-V et à l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$. Etant donné que GPVI et CLEC-2 ne sont pas des récepteurs d'adhérence plaquettaire, se pose la question des récepteurs assurant le recrutement des plaquettes, un rôle qui pourrait être joué par les intégrines de la famille $\beta 1$. L'objectif de mon travail a consisté à étudier le rôle des intégrines dans l'arrêt du saignement en conditions inflammatoires dans différents modèles expérimentaux en me focalisant sur les intégrines $\beta 1$ et en revisitant celui de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Comparaison du rôle de la GPVI humaine et murine dans la croissance et la stabilité du thrombus

Publication 1 :

« Differential role of glycoprotein VI in mouse and human thrombus progression and stability »

Emily Janus-Bell^{1*}, Muhammad Usman Ahmed^{1*}, Nicolas Receveur¹, Clarisse Mouriaux¹, Bernhardt Nieswandt², Elizabeth E. Gardiner³, Christian Gachet¹, Martin Jandrot-Perrus^{4,5}, Pierre H. Mangin¹

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France; ²Institute of Experimental Biomedicine, University Hospital and Rudolf Virchow Center, University of Würzburg, Germany; ³ACRF Department of Cancer Biology and Therapeutics, The John Curtin School of Medical Research, The Australian National University, Canberra, Australia; ⁴Université de Paris INSERM, Hôpital Bichat, Paris, France; ⁵Acticor Biotech, Paris, France

* These authors contributed equally to this work.

Thromb Haemost. 2020 Oct 29. doi: 10.1055/s-0040-1718737.

Introduction

La GPVI est un récepteur spécifique des plaquettes qui est considéré comme une cible antithrombotique potentiellement sûre. Elle est principalement connue pour être un récepteur d'activation des plaquettes au collagène, mais en 2018, le laboratoire a publié que l'interaction GPVI – fibrinogène favorise également l'activation plaquettaire participant à la croissance du thrombus (Mangin et al., 2018). Dans cet article, il a également été observé que la GPVI humaine, mais pas celle de souris, facilite l'activation plaquettaire sur fibrinogène en condition statique. Plus récemment, une publication du laboratoire à laquelle j'ai contribué, a montré que l'interaction entre la GPVI et le fibrinogène est également importante pour assurer la stabilité du thrombus (Ahmed et al., 2020). Ce travail a été essentiellement réalisé grâce à des expériences *in vitro* avec du sang humain et nous avons, par la suite, voulu confirmer le rôle de la GPVI dans la croissance et la stabilité du thrombus *in vivo* chez la souris.

Pour cela, il a d'abord fallu confirmer les résultats *in vitro* obtenus chez l'Homme dans le système murin. Pour étudier le rôle de la GPVI dans la stabilité du thrombus, nous avons utilisé un modèle de perfusion de sang anticoagulé de souris sur du collagène afin de préformer des agrégats riches en plaquettes, puis nous avons perfusé du tampon sur ces agrégats afin d'en tester la stabilité. Nous avons également évalué le rôle de la GPVI de souris dans la croissance du thrombus. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de perfusion de sang de souris sur du collagène ainsi que la microscopie confocale pour mesurer le volume des thrombi formés. L'objectif initial de ce travail était de confirmer le rôle de la GPVI de souris dans la croissance et la stabilité des thrombi afin de générer les résultats nécessaires avant de commencer les expériences *in vivo*. Cependant, il a abouti à l'identification d'une différence d'espèces quant à la fonction de la GPVI.

Ce travail, pour lequel j'ai signé premier auteur, a été accepté sous forme de lettre à l'éditeur dans *Thrombosis and Haemostasis* en septembre 2020.

Differential Role of Glycoprotein VI in Mouse and Human Thrombus Progression and Stability

Emily Janus-Bell^{1,*} Muhammad Usman Ahmed^{1,*} Nicolas Receveur¹ Clarisse Mouriaux¹
Bernhard Nieswandt² Elizabeth E. Gardiner³ Christian Gachet¹ Martine Jandrot-Perrus^{4,5}
Pierre H. Mangin¹

¹ Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France

² Institute of Experimental Biomedicine, University Hospital and Rudolf Virchow Center, University of Würzburg, Würzburg, Germany

³ ACRF Department of Cancer Biology and Therapeutics, The John Curtin School of Medical Research, The Australian National University, Canberra, Australia

⁴ Université de Paris INSERM, Hôpital Bichat, Paris, France

⁵ Acticor Biotech, Paris, France

Address for correspondence Pierre H. Mangin, PhD, INSERM, Université de Strasbourg, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, 10 rue Spielmann, F-67065 Strasbourg, France (e-mail: pierre.mangin@efs.sante.fr).

Thromb Haemost

Introduction

Platelet glycoprotein (GP) VI is a promising, safe, antithrombotic target as its absence or blockade prevents in vitro thrombus formation and experimental thrombosis in various animal models without impacting the tail-bleeding time.¹ In addition, patients with a mutation in the GPVI gene exhibit only a mild bleeding diathesis,² further suggesting that GPVI does not play a critical role in hemostasis. GPVI is the main platelet activation receptor for collagen and viewed as being important in the initiation of thrombus formation.¹ In addition to collagen, GPVI interacts physically or functionally with other adhesive proteins including laminins, fibrin, and fibrinogen.^{3–7} We have shown that human GPVI activates platelets on immobilized fibrinogen and that this process is key for the progression and stability of human thrombi.^{7,8} In sharp contrast, we observed that mouse GPVI does not promote such an activation, as platelets deposited on fibrinogen do not fully spread.⁷ In this study, we investigated the consequence of absence of GPVI/fibrinogen-mediated platelet activation in mice on the regulation of thrombosis in comparison to the human system. It is important to appreciate species difference between humans and mice as the latter represent the most broadly used animal model to study experimental thrombosis and that a significant part of our current understanding of the molecular mechanism of thrombosis relies on experiments performed with these animals.

* These authors contributed equally to this work.

Results and Discussion

To investigate the role of GPVI in mouse thrombus build-up, beyond its role as a collagen receptor, we used a flow-based assay. We preformed thrombi by perfusing hirudinized whole blood of wild-type (WT) mice over immobilized type-I fibrillar collagen for 1 minute at 300 s^{-1} and stained platelet aggregates with DiOC₆ (green). We next perfused hirudinized blood from WT or GPVI^{-/-} mice for 6 minutes at 300 s^{-1} which were stained with the anti-GPIIb/IIIa antibody RAM.1-A647 (red) to visualize thrombus progression. Three-dimensional reconstructed confocal microscopy images showed that the second population of red platelets formed thrombi on the top of the first population of green aggregates similarly with GPVI^{-/-} and WT blood (►Fig. 1A). This was confirmed by measuring thrombus volume, which indicated that the aggregates formed with GPVI^{-/-} mouse blood presented a similar volume to WT thrombi (WT: $5.7 \pm 0.9\ \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$; GPVI^{-/-}: $5.1 \pm 0.6\ \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, $p > 0.05$; ►Fig. 1B). This result demonstrates that mouse GPVI does not play a critical role in thrombus build-up beyond its role as an initial collagen receptor and is in sharp contrast with the key role played by human GPVI.⁷ Moreover, this result also implies that murine thrombus progression in the absence of thrombin in mice primarily occurs via GPVI-independent activation pathways, notably those relying on soluble agonists such as thromboxane A2 and adenosine diphosphate (ADP; ►Fig. 1C). These in vitro observations are consistent with in vivo results showing that following FeCl₃ injury of the carotid artery, which does not expose subendothelial proteins such as collagen, thrombus build-up is largely independent of GPVI.⁹

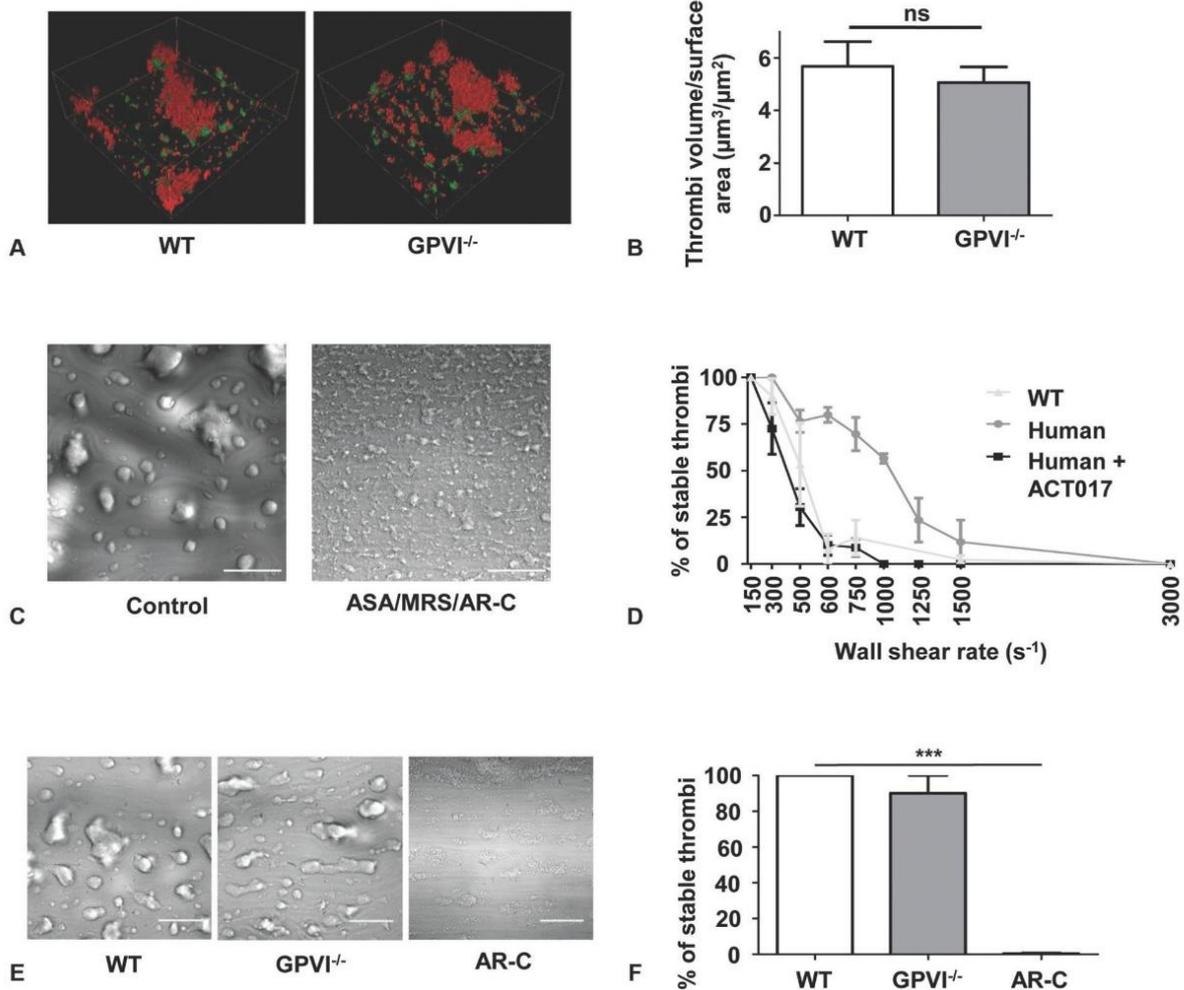


Fig. 1 GPVI plays a key role in human but not in mouse thrombus progression and stability. (A) Representative 3D reconstructed confocal images of wild-type (WT) and GPVI-deficient (GPVI^{-/-}) mouse thrombi obtained after perfusing hirudinized whole blood stained with RAM.1-A647 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (in red) over WT aggregates for 6 minutes at 300 s^{-1} . The preformed thrombi were obtained by perfusing WT mice hirudinized whole blood stained with DiOC₆ 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (in green) over fibrillar collagen for 1 minute at 300 s^{-1} . (B) Quantification of WT ($n = 6$) and GPVI^{-/-} ($n = 7$) thrombus volume by confocal microscopy. (C) Representative DIC images obtained after perfusing WT mice hirudinized whole blood for 5 minutes at 300 s^{-1} and washed with PBS for 3 minutes at 300 s^{-1} . For the ASA/MRS/ARC69931MX (AR-C) condition, WT whole blood was treated with 1 mM of aspirin, 10 μM of MRS 2500, and 10 μM of AR-C, 10 minutes before perfusion. Scale bar represents 50 μm . (D) The curves represent the percentage of stable thrombi obtained 8 minutes after perfusion of PBS over WT mouse ($n = 4$) and human ($n = 3$) aggregates at indicated wall shear rates. Thrombi were preformed by perfusing human or WT mouse hirudinized whole blood over collagen. For the ACT017 condition, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ACT017 was perfused over human thrombi at indicated wall shear rates. (E) Representative DIC images obtained 8 minutes after perfusion of PBS at 300 s^{-1} over preformed aggregates. Thrombi were preformed by perfusing WT mice hirudinized whole blood over collagen, followed by the perfusion of WT or GPVI^{-/-} whole blood. For the ARC69931MX (AR-C) condition, 10 μM of AR-C in PBS was perfused over preformed WT aggregates. Scale bar represents 50 μm . (F) Quantification of the percentage of stable thrombi of WT ($n = 5$), GPVI^{-/-} ($n = 5$), and WT + AR-C ($n = 5$) after perfusing PBS with or without AR-C over preformed aggregates for 8 minutes at 300 s^{-1} . All the experiments were done with PDMS flow chambers coated with type I fibrillar collagen at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Ns $p > 0.05$, *** $p < 0.001$. Data were compared using Mann-Whitney and chi-square test. 3D, three-dimensional; DIC, differential interference contrast; GPVI, glycoprotein VI; PBS, phosphate-buffered saline.

We next studied the role of GPVI in thrombus stability and compared this process in humans and mice. Therefore, we preformed aggregates in a similar way to that described for **Fig. 1(A, B)**, before testing the thrombus stability by perfusing PBS over the surface. We observed that mouse platelet aggregates were much less stable when compared to human thrombi (**Fig. 1D**). Indeed, a reduction in thrombus stability in mouse versus human platelet thrombi was already observed at wall shear rates of 300 s^{-1} . This difference became very obvious at 600 s^{-1} where almost all mouse thrombi

disaggregated while more than 80% of human platelet aggregates were still stable (**Fig. 1D**). These results indicate that mouse platelet aggregates are much less stable than their human counterpart in such an experimental setting. In parallel, we observed that the blocking anti-GPVI agent ACT017 reduced the stability of human platelet aggregates to the level of mouse thrombi (**Fig. 1D**). This result confirms that GPVI-fibrinogen mediated platelet activation in humans markedly increases thrombus stability. In contrast, when we perfused GPVI^{-/-} or WT blood over aggregates formed with WT blood as described

Table 1 Comparison of mouse and human system with focus on GPVI

	Human GPVI	Mouse GPVI
Platelet count	300 ± 150 ($\times 10^3$) platelets/ μ L	956 ± 38 ($\times 10^3$) platelets/ μ L
Copy number per platelet	3,000–4,000	4,500–5,500
Structure	<ul style="list-style-type: none"> Human and mouse GPVI share a 64% homology Mouse GPVI cytoplasmic tail lacks the 24 C-terminal residues of human GPVI 	
Physiological ligands	Fibrillar collagen Fibrinogen Fibrin Laminin	Fibrillar collagen Fibrin Laminin
Nonphysiological ligands	Convulxin CRP	Convulxin CRP (slightly less reactive)
GPVI shedding	ADAMs family members (ADAMs 10 and 17), physiological and nonphysiological ligands	ADAMs family members and nonphysiological ligands
Signaling pathway	No major differences identified to date (FcR γ chain, Src kinases, Syk, PI3 kinases, LAT, SPLP76, and calmodulin all involved in human and mouse GPVI function)	
Dependency on soluble mediators	Human and mouse GPVI-initiated platelet activation relies on soluble agonists ADP and TxA ₂ for full activation especially with low collagen concentrations	
GPVI/collagen interaction	Human and mouse GPVI activate platelets through collagen which promotes thrombus formation	
GPVI/fibrinogen interplay	Human GPVI interaction with fibrinogen supports thrombus growth and stability	Mouse GPVI does not interact with fibrinogen
Arterial thrombosis	Under evaluation in phase II studies	<ul style="list-style-type: none"> Reduced experimental thrombosis in several models when GPVI is absent/blocked Protection in an experimental stroke model in GPVI-immunodepleted mice
Hemostasis	Patients with GPVI deficiencies (acquired or genetic) have a modest/no bleeding diathesis. No spontaneous bleeding and no prolonged bleeding time in healthy volunteers treated with anti-GPVI agents (phase I studies)	GPVI- or Fc γ R-deficient mice <ul style="list-style-type: none"> No spontaneous bleeding No bleeding during surgery No prolonged tail-bleeding time and normal volume of blood loss when GPVI is absent or blocked

Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; CRP, C-reactive protein; GPVI, glycoprotein VI.

for the data in ► **Fig. 1(A, B)**, we observed that GPVI^{-/-} platelet aggregates were as stable as WT platelet thrombi (► **Fig. 1E**). Quantification confirmed no difference in the number of stable platelet aggregates between GPVI^{-/-} and WT thrombi (WT: 100 ± 0%; GPVI^{-/-}: 90 ± 10%; ► **Fig. 1F**). As a positive control, we used ARC69931MX (10 μ M), an antagonist of the ADP receptor P2Y₁₂, which efficiently destabilized mouse platelet aggregates (► **Fig. 1E, F**). Together, these results indicate that mouse platelet thrombi are less stable than human thrombi and that their stability at low shear does not critically rely on GPVI, whereas GPVI is critical for the stability of human platelet thrombi. We propose that this species difference does limit the relevance of using standard mouse models to study the thrombus stabilizing action of GPVI and limits extrapolation of data obtained on the progression and stability of thrombi in mice to the human system with regard to GPVI.

In conclusion, this study highlights a significant species difference between the human and mouse hemostatic systems with regard to the contribution of GPVI in thrombus progression and stability beyond GPVI's role as a collagen receptor (► **Table 1**). The reason why mouse GPVI does not contribute to thrombus build-up and stability most likely results from an inability to promote platelet activation on fibrinogen. This adhesive protein, found in every layer of a growing thrombus, is very well known to support platelet aggregation through its

interaction with integrin α IIb β 3, but also through its interplay with human GPVI to promote and maintain platelet activation. This species difference is critical when judging the importance of GPVI in thrombosis as most of our knowledge is acquired from in vivo experiments performed in mice. This study suggests that the importance of GPVI in cardiovascular events in humans might be more important than previously anticipated based on experiments in mice. This is particularly important to highlight since anti-GPVI agents are currently under evaluation in phase II studies in the setting of acute coronary syndromes and ischemic stroke.

Authors' Contributions

E.J.-B., M.U.A., and N.R. acquired, analyzed, and interpreted the data, and wrote the manuscript; C.M. acquired and analyzed the data; B.N. provided essential tools and contributed to the writing of the manuscript; C.G. and E.E. G. contributed to the writing of the manuscript; M.J.-P. and P.H.M. conceived and designed the research, interpreted the data, wrote the manuscript, and handled funding and supervision.

Funding

This work was supported by ARMESA and by a grant from the Concours mondial de l'innovation: TherAVC 2.0 (BPI

France). M.U.A. was supported by a PhD fellowship from HEC Pakistan.

Conflict of Interest

M.J.-P.: founder of Acticor Biotech. All other authors have declared that they have no conflict of interest.

References

- 1 Zahid M, Mangin P, Loyau S, et al. The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target. *J Thromb Haemost* 2012;10(12):2418–2427
- 2 Jandrot-Perrus M, Hermans C, Mezzano D. Platelet glycoprotein VI genetic quantitative and qualitative defects. *Platelets* 2019;30(06):708–713
- 3 Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJT, et al. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood* 2006;107(04):1405–1412
- 4 Schaff M, Tang C, Maurer E, et al. Integrin $\alpha 6\beta 1$ is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation* 2013;128(05):541–552
- 5 Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood* 2015;126(05):683–691
- 6 Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, et al. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood* 2015;126(13):1601–1608
- 7 Mangin PH, Onselae M-B, Receveur N, et al. Immobilized fibrinogen activates human platelets through glycoprotein VI. *Haematologica* 2018;103(05):898–907
- 8 Ahmed MU, Kaneva V, Loyau S, et al. Pharmacological blockade of glycoprotein VI promotes thrombus disaggregation in the absence of thrombin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020;40(09):2127–2142
- 9 Eckly A, Hechler B, Freund M, et al. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* 2011;9(04):779–789

Conclusion

Grâce à un modèle de perfusion de sang hirudiné de souris *wild-type* (WT) sur du collagène fibrillaire de type-I immobilisé, nous avons préformé des thrombi avant de perfuser du sang de souris WT ou déficientes pour la GPVI (GPVI^{-/-}). De manière surprenante, les images de reconstruction 3D indiquent qu'il n'existe pas de différence de taille entre les thrombi des souris WT et ceux des souris GPVI^{-/-}. La quantification du volume des thrombi de la seconde phase confirme ces observations, indiquant que la GPVI de souris, contrairement à la GPVI humaine, ne joue pas un rôle clé dans la croissance du thrombus. Nous avons ensuite évalué la stabilité des thrombi de souris en les soumettant à différents taux de cisaillement. Nous avons utilisé un modèle similaire au précédent comprenant la préformation de thrombi puis la perfusion de tampon PBS sur ces thrombi, afin d'en tester la stabilité. Nous avons observé que les agrégats de plaquettes de souris GPVI^{-/-} sont aussi stables que ceux des souris WT, ce qui a été confirmé par une quantification. Ces résultats indiquent que la GPVI de souris ne joue pas non plus de rôle majeur dans la stabilité des thrombi murins.

En parallèle, nous avons comparé la stabilité des thrombi murins et humains à différents taux de cisaillement et observé que les agrégats de plaquettes humaines sont plus stables que ceux de souris. De plus, lorsque les thrombi humains sont traités avec l'ACT017, un agent bloquant la GPVI, nous avons observé que les thrombi devenaient moins stables, leur stabilité étant alors similaire à celle des thrombi de souris. Ces résultats indiquent que la GPVI humaine est responsable de l'augmentation de stabilité des thrombi humains par rapport à ceux de souris.

En conclusion, cette étude met en évidence une différence d'espèce entre l'Homme et la souris concernant la contribution de la GPVI dans la croissance et la stabilité du thrombus. Cette différence vient probablement de l'impossibilité des plaquettes de souris à s'activer *via* l'interaction GPVI – fibrinogène. Chez la souris, une signalisation indépendante de la GPVI, sûrement par l'intermédiaire des récepteurs TP et P2Y₁₂, permettrait donc d'assurer un certain degré de stabilité des thrombi.

Caractérisation du rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la fonction plaquettaire, en hémostase et en thrombose expérimentale

Publication 2 :

« Characterization of the role of integrin $\alpha 5\beta 1$ in platelet function, in hemostasis and experimental thrombosis »

Emily Janus-Bell^{1*}, Alexandra Yakusheva^{1,2*}, Nicolas Receveur¹, Usman Muhammad Ahmed¹, Clarisse Mouriaux¹, Catherine Bourdon¹, Mikhail A. Panteleev², Christian Gachet¹, Pierre H. Mangin¹

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France; ²Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow 119991, Russia

* These authors contributed equally to this work.

En préparation

Introduction

Les intégrines sont des récepteurs que l'on retrouve à la surface des plaquettes avec deux familles : les intégrines $\beta 1$ comprenant l' $\alpha 2\beta 1$, l' $\alpha 5\beta 1$ et l' $\alpha 6\beta 1$, ainsi que les intégrines $\beta 3$ comprenant principalement l' $\alpha IIb\beta 3$. Parmi les intégrines $\beta 1$, l' $\alpha 2\beta 1$ et l' $\alpha 6\beta 1$ sont impliquées dans les étapes d'adhérence et d'activation plaquettaire et leurs rôles en hémostasie et en thrombose ont également été mis en évidence (Habart et al., 2013; He et al., 2003b; Kuijpers et al., 2003; Schaff et al., 2013). Un travail réalisé au laboratoire a montré que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, participe à l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes sur de la fibronectine fibrillaire en conditions de flux (Maurer et al., 2015a). L'importance de cette intégrine en hémostasie et en thrombose expérimentale n'était pas connue avant ce travail.

L'objectif de mon second papier a été d'évaluer le rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en hémostasie et en thrombose artérielle. Pour ce travail, nous avons généré des souris déficientes pour cette intégrine spécifiquement sur la lignée mégacaryocytaire. Nous avons en premier lieu caractérisé ces souris et leurs plaquettes en évaluant notamment le compte plaquettaire et l'expression des récepteurs de surface, afin de s'assurer de l'absence d'anomalies majeures. Nous avons ensuite évalué les fonctions plaquettaires *in vitro* en réalisant des agrégations, en déterminant leur état d'activation en réponse à des agonistes solubles par cytométrie en flux et en perfusant du sang de souris anticoagulé sur différentes protéines adhésives. Nous avons également évalué le rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en thrombose artérielle *in vivo* en soumettant ces souris à trois modèles de thrombose expérimentale différents pour lesquels les conditions rhéologiques ainsi que les protéines adhésives exposées diffèrent. Enfin, nous avons évalué le rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en hémostasie à l'aide d'un modèle de temps de saignement à la queue. Un modèle de réaction passive inversée d'Arthus nous a également permis d'évaluer le rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires.

Ce travail, pour lequel je signerai en premier auteur, sera soumis prochainement pour publication.

Characterization of the role of integrin $\alpha 5\beta 1$ in platelet function, hemostasis and experimental thrombosis

*Emily Janus-Bell¹, *Alexandra Yakusheva^{1,2}, Nicolas Receveur¹, Usman Muhammad Ahmed¹, Clarisse Mouriaux¹, Catherine Bourdon¹, Mikhail A. Panteleev², Christian Gachet¹, Pierre H. Mangin¹

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France; ²Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow 119991, Russia

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Pierre H. Mangin (PhD), Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, 10 rue Spielmann, F-67065 Strasbourg, France; Phone: (+33) 3 88 21 25 25; Fax: (+33) 3 88 21 25 21; E-mail: pierre.mangin@efs.sante.fr

Running heads: Role of $\alpha 5\beta 1$ in hemostasis and thrombosis

Word count abstract: 238

Word count main text: 3175

Table: 1

Figures: 5

Supplementary file: 1

ABSTRACT

The role of integrins in regulating platelet adhesion, activation and aggregation has been extensively studied. Moreover, the pathophysiological importance of most of them has been investigated, with the exception of integrin $\alpha 5\beta 1$, a platelet receptor for fibronectin. The aim of this study was to further characterize the role of integrin $\alpha 5\beta 1$ in the interplay of platelets with fibronectin and to determine its importance in hemostasis and arterial thrombosis. We generated a mouse strain which does not express integrin $\alpha 5\beta 1$ on platelets ($\alpha 5^{-/-}$). $\alpha 5^{-/-}$ mice were viable and fertile and presented a normal platelet count with no apparent signs of abnormality. Expression of the main platelet receptors and the response of $\alpha 5^{-/-}$ platelets to a series of soluble agonists were all completely normal. Adhesion and aggregation of $\alpha 5^{-/-}$ platelets under shear flow on fibrinogen, laminin or von Willebrand factor were unimpaired. In contrast, $\alpha 5^{-/-}$ platelets displayed a marked decrease in adhesion, activation and aggregation on fibrillar fibronectin and collagen. $\alpha 5^{-/-}$ mice presented no defect in a tail-bleeding time assay and no increase in inflammatory bleeding in a reverse passive Arthus model. No defects were observed in three distinct experimental models of arterial thrombosis based on laser-induced injury of mesenteric vessels, ferric chloride-induced injury of the carotid artery or mechanical injury of the abdominal aorta. In summary, this study shows that platelet integrin $\alpha 5\beta 1$ is a key receptor for fibrillar cellular fibronectin but is dispensable in hemostasis and arterial thrombosis.

Key words: platelets, arterial thrombosis, integrin $\alpha 5\beta 1$, fibronectin

INTRODUCTION

Platelets adhere, become activated and aggregate at a site of vessel injury to form a hemostatic plug which stops bleeding. They are also involved in maintaining vascular integrity and in the arrest of inflammatory bleeding in various organs.(Goerge et al., 2008) On the other hand, platelets play an instrumental role in arterial thrombosis by precipitating the formation of an occlusive thrombus in a diseased artery, which results in life-threatening ischemic pathologies such as myocardial infarction or ischemic stroke.(Jackson, 2011) The molecular mechanisms involved in the interactions of platelets with an injured vessel wall have been extensively investigated. The initial step of attachment of circulating platelets is ensured by binding of the glycoprotein (GP) Ib-IX complex to subendothelial von Willebrand factor (vWF) at elevated shear rates.(Savage et al., 1996, 1998) When the flow is slower, $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins assist the GPIb-IX complex to allow further platelet recruitment as well as stable adhesion to various extracellular matrix proteins.(Savage et al., 1996, 1998) This enables the interaction of GPVI with its ligands, including collagen, which initiates platelet activation.(Zahid et al., 2012) Aggregation results through interactions of integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ with plasma fibrinogen, forming a plug that seals the breach in healthy vessels(Versteeg et al., 2013) or a pathological thrombus in diseased arteries.(Jackson, 2011)

Platelets express at their surface five different integrins of the $\beta 1$ and $\beta 3$ families, namely $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$ and $\alpha \text{IIb}\beta 3$ whose main ligands are collagen, fibronectin, laminins, vitronectin and fibrinogen, respectively. $\alpha \text{IIb}\beta 3$, the most abundant integrin at the platelet surface(Wagner et al., 1996), enables platelet adhesion and aggregation through its binding to fibrinogen. This receptor plays a major role in hemostasis as evidenced by the hemorrhagic disorder known as Glanzmann's thrombasthenia, where $\alpha \text{IIb}\beta 3$ is absent or non-functional.(Nurden, 2006) It is also the target of a class of potent anti-platelet agents, illustrating

its key involvement in arterial thrombosis.(Jamasbi et al., 2017) The role of the other integrins, notably the $\beta 1$ integrins, appears to be limited to the initial step of platelet adhesion and activation through interactions with extracellular matrix proteins. Concerning their importance, it has been shown that the absence of either $\alpha 2\beta 1$ or $\alpha 6\beta 1$ has no major impact on the tail-bleeding time in mice(Habart et al., 2013; Schaff et al., 2013), but reduces thrombosis in several experimental models.(He et al., 2003a; Kuijpers et al., 2003; Schaff et al., 2013) In contrast, the importance of $\alpha 5\beta 1$ in hemostasis and arterial thrombosis has never been studied.

Integrin $\alpha 5\beta 1$ is a well-known receptor for fibronectin, which is broadly expressed on various cell types and plays an important role in migration and differentiation, especially during fetal development. As a consequence, knocking out the $\alpha 5$ gene results in death at the embryonic stage due to a defect in the mesoderm.(Yang et al., 1993) Concerning platelets, it has been shown that $\alpha 5\beta 1$ supports modest platelet adhesion and activation on fibronectin under flow.(Beumer et al., 1994; McCarty et al., 2004) Using a blood flow assay, we compared the relative contributions of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha IIb\beta 3$ to platelet adhesion and activation on fibronectin. We also showed that the GPIb-IX-V complex and toll-like receptor-4, but not GPVI, contributed to the interaction of platelets with fibrillar tissue fibronectin located in the inner layers of the vessel wall.(Maurer et al., 2015a) However, although the role of $\alpha 5\beta 1$ as a platelet receptor for fibronectin is recognized, its importance in hemostasis and arterial thrombosis remains unknown.

To study the role of integrin $\alpha 5\beta 1$ in hemostasis and arterial thrombosis, we generated a new mouse strain which does not express this integrin on platelets or megakaryocytes ($\alpha 5^{-/-}$) by crossing PF4Cre⁺ mice with animals expressing the $\alpha 5$ gene flanked by loxP sites. The function of platelets from $\alpha 5^{-/-}$ mice were characterized using flow cytometry, aggregometry and flow-

based in vitro assays. We also employed a tail-bleeding time assay, a reverse passive Arthus (rpA) model and experimental thrombosis models to evaluate the participation of integrin $\alpha 5\beta 1$ in hemostasis and arterial thrombosis.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Materials and antibodies are described in the Supplementary Material.

Mice

Mice lacking integrin $\alpha 5$ in platelets were generated by crossing mice having a pure C57BL/6 background containing the *Itga5* gene flanked by loxP sites ($\alpha 5^{fl/fl}$) with pure C57BL/6 transgenic animals selectively expressing Cre recombinase in the megakaryocyte lineage under control of the platelet factor 4 (PF4) gene promoter (PF4-Cre⁺), (Jackson laboratories, Bar Harbor). The offspring were intercrossed to produce animals homozygous for the floxed allele (PF4-Cre⁺/ $\alpha 5^{fl/fl}$, hereafter called $\alpha 5^{-/-}$). C57BL/6 PF4-Cre⁺ mice served as controls (Ctrl), unless specified otherwise.

Platelet count, volume and glycoprotein expression

Whole blood was collected into EDTA (6 mM) after severing the tail of anesthetized mice. Platelet count and volume were analyzed in an automatic cell counter (Scil Animal Care Company, Altorf, France) and surface glycoprotein expression was determined by flow cytometry.

Preparation and properties of washed mouse platelets

Washed mouse platelets were prepared and platelet aggregation was measured as reported previously.(Cazenave et al., 2004) Agonist-induced binding of soluble fibrinogen and exposure of P-selectin were determined as previously described(Schaff et al., 2013) while phosphatidylserine exposure was quantified by Alexa Fluor 488-annexin V binding.

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

PDMS flow chambers (0.1 x 1 mm) were coated with vWF binding protein (DDR2, 100 µg/mL), fibrinogen (100 µg/mL), laminins (100 µg/mL), collagen (200 µg/mL) or cellular fibronectin (300 µg/mL) overnight at 4°C. Mechanical stretching of fibronectin was performed as described previously.(Maurer et al., 2015a) To prevent non-specific adhesion, the channels were blocked with phosphate buffered saline (PBS) containing human serum albumin (10 mg/mL) for 30 min at room temperature. Hirudinated (100 U/mL) whole blood drawn from the abdominal aorta of anesthetized mice was perfused through the chambers at the indicated wall shear rates and platelet adhesion was observed in real-time and analyzed as detailed elsewhere.(Schaff et al., 2013) Thrombus formation on fibrillar fibronectin was monitored as previously reported.(Maurer et al., 2015a)

***In vivo* thrombosis models**

Platelets were labeled by administering 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide to anesthetized mice. Ferric chloride (FeCl₃)-mediated thrombosis was induced by applying a 3x3 mm Whatman filter paper saturated with 7.5% FeCl₃ laterally to the carotid artery for 2.5 min. Thrombosis was initiated mechanically by pinching the abdominal aorta with forceps for 15 s. Thrombus formation was monitored in real-time with a fluorescent microscope (Leica Microsystems, San Westlar, Germany) and a CCD camera (CoolSNAP HQ2, Photometrics, Roper Scientific). Laser-induced thrombosis was triggered in mesenteric arterioles using a high intensity 440 nm pulsed nitrogen dye laser applied with a Micropoint system (Photonic Instruments, Andor Technology, Belfast, UK) causing a deep injury. Thrombus formation was monitored in real-time by bright field and fluorescence microscopy (Leica DM IRB) using a CMOS ORCA Flash V2 camera (Hamamatsu Photonics, Massy, France).

Bleeding time

The bleeding time and volume of blood lost were determined by transversally severing a 3 mm segment from mouse tails, as reported previously.(Léon et al., 2007)

Reverse passive Arthus (rpA) model

An rpA reaction was elicited in anesthetized mice by intradermal injection of an anti-bovine serum albumin antibody (60 µg/spot), followed by retro-orbital injection of bovine serum albumin (75 mg/kg), as previously described.(Goerge et al., 2008)

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (see Figure Legends).

RESULTS

Characterization of $\alpha 5$ -deficient mice and platelets

To study the role of integrin $\alpha 5\beta 1$ in platelet functions, we crossed a mouse strain floxed for the $\alpha 5$ gene with a strain expressing Cre recombinase under control of the PF4 promoter ($\alpha 5^{-/-}$). No obvious abnormalities were detected in $\alpha 5^{-/-}$ mice which bred normally. Deletion of $\alpha 5$ had no impact on the platelet count or volume, while surface expression of the major glycoproteins was normal, except for that of integrin $\alpha 5$, which was reduced by 80% (**Table 1**). Using light-transmission aggregometry, we found that platelets from $\alpha 5^{-/-}$ mice responded normally to a series of agonists including adenosine diphosphate (ADP) (2 μM), collagen (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), thrombin (0.2 U/mL) and U46619 (1 μM), (**Figure 1A and B**). No differences in P-selectin exposure, fibrinogen binding or annexin V binding in response to ADP, thrombin, proteinase-activated receptor 4 (PAR-4) peptide or convulxin were observed by flow cytometry in $\alpha 5^{-/-}$ platelets as compared to controls (**Figure 1C-E**). This confirmed that platelets deficient in integrin $\alpha 5$ respond normally to a GPVI ligand and a series of soluble agonists. Thus, $\alpha 5$ -deficient mice appeared to be normal while $\alpha 5$ -deficient platelets displayed no major defect in response to the main soluble platelet agonists.

Characterization of $\alpha 5$ -deficient platelet adhesion under shear flow

We next evaluated the ability of $\alpha 5\beta 1$ to support platelet adhesion to various surfaces under flow by perfusing hirudinized blood over immobilized proteins. We observed normal adhesion and rolling of $\alpha 5^{-/-}$ platelets recruited to vWF bound to DDR2 at 1,500 s^{-1} (**Figure 2A**) and normal adhesion of these platelets to fibrinogen and laminin at 300 s^{-1} (**Figure 2B**). In contrast, adhesion of $\alpha 5^{-/-}$ platelets to immobilized fibrillar fibronectin displayed a major defect as

compared to controls, with a 78% reduction in the number of adherent platelets at 8 min (Ctrl: $7.1 \pm 0.7 \times 10^3/\text{mm}^2$; $\alpha 5^{-/-}$: $1.6 \pm 0.05 \times 10^3/\text{mm}^2$) (**Figure 2C and D**). A detailed analysis indicated that $\alpha 5\beta 1$ was important to establish the initial bond with fibronectin, as the recruitment of $\alpha 5^{-/-}$ platelets to the surface was decreased by 55% as compared to controls (**Figure 2E**). Moreover, study of the adhesive behavior of the recruited platelets showed a marked increase in numbers of $\alpha 5^{-/-}$ platelets detaching from the surface and a clear decrease in stationary adhesion, highlighting the importance of $\alpha 5\beta 1$ in stabilizing the bonds between platelets and fibronectin (**Figure 2F**). These results indicated that platelet integrin $\alpha 5\beta 1$ is a major receptor for fibronectin supporting platelet attachment and maintaining the bonds to ensure stable adhesion.

A major defect of $\alpha 5^{-/-}$ platelet activation and aggregation on fibrillar fibronectin and collagen

Platelet activation is a key step in thrombus formation. Microscopic fluorescence images showed a clear JonA-PE signal for control platelets accumulating on fibrillar fibronectin under flow at 300 s^{-1} , while only a weak signal was detected for $\alpha 5^{-/-}$ platelets, indicating that $\alpha 5\beta 1$ is important to promote $\alpha \text{IIb}\beta 3$ activation on fibronectin (Ctrl: $26.9 \pm 8.8 \times 10^4 \text{ AU}$; $\alpha 5^{-/-}$: $3.5 \pm 2.7 \times 10^4 \text{ AU}$) (**Figure 3A and B**). We observed that thrombi formed in control blood but not in $\alpha 5^{-/-}$ blood, highlighting a key role of $\alpha 5\beta 1$ in platelet aggregation on fibrillar fibronectin (**Figure 3C and D**). Surprisingly, a defect in thrombus formation was also observed when $\alpha 5^{-/-}$ blood was perfused over fibrillar collagen, a surface which does not directly activate $\alpha 5\beta 1$, suggesting that this integrin participates in thrombus build-up, probably through interactions with plasma fibronectin (**Figure 3E and F**). Altogether, these findings indicated that integrin $\alpha 5\beta 1$ participates in thrombus growth on fibronectin-rich and fibronectin-poor surfaces.

$\alpha 5\beta 1$ does not act as a major platelet receptor in experimental thrombosis

Mice deficient in platelet integrin $\alpha 5\beta 1$ were studied in three models of arterial thrombosis differing by the nature of the lesion, the vessel type and the local rheology. When the common carotid artery was injured with a 7.5% solution of FeCl_3 , $\alpha 5^{-/-}$ mice (n=6) presented a similar profile of thrombus formation and disaggregation as compared to controls (n=3) (area under the curve, Ctrl: $2 \pm 0.6 \times 10^9 \mu\text{m}^2$; $\alpha 5^{-/-}$: $2.1 \pm 0.2 \times 10^9 \mu\text{m}^2$; $p > 0.05$), (**Figure 4A and B**). A comparable result was obtained after mechanical injury of the abdominal aorta with forceps, the thrombus area in $\alpha 5^{-/-}$ mice (n=5) being not significantly different from that in control mice (n=5) (area under the curve, Ctrl: $4 \pm 2 \times 10^8 \mu\text{m}^2$; $\alpha 5^{-/-}$: $6 \pm 1 \times 10^8 \mu\text{m}^2$; $p > 0.05$), (**Figure 4C and D**). Finally, $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 3) also formed thrombi in a similar manner as control mice (n = 3) following laser-induced injury of a mesenteric artery (area under the curve, Ctrl: $7.19 \pm 0.9 \times 10^6 \mu\text{m}^2$; $\alpha 5^{-/-}$: $7.15 \pm 0.8 \times 10^6 \mu\text{m}^2$; $p > 0.05$), (**Figure 4E and F**). Hence mouse platelet $\alpha 5\beta 1$ did not appear to be a major receptor for arterial thrombosis.

Platelets from $\alpha 5^{-/-}$ mice display no important hemostatic defect

$\alpha 5^{-/-}$ mice did not present any spontaneous bleeding. In addition, $\alpha 5^{-/-}$ mice showed no signs of excessive bleeding during surgery as compared to control animals, suggesting that the lack of this integrin on platelets does not critically affect hemostasis. This was further supported by a normal bleeding time (Ctrl: 302 ± 119 s; $\alpha 5^{-/-}$: 121 ± 17 s) and normal volume of blood lost (Ctrl: $259 \pm 130 \mu\text{L}$; $\alpha 5^{-/-}$: $130 \pm 84 \mu\text{L}$) in a tail-bleeding time assay (**Figure 5A and B**). Finally, we did not observe any effect on inflammatory bleeding in $\alpha 5^{-/-}$ mice as compared to control mice in an rpA model of skin inflammation (**Figure 5C and D**). These results do not favor a major role of integrin $\alpha 5\beta 1$ in the murine hemostatic system.

DISCUSSION

Platelets express numerous adhesion receptors, notably integrins, to sense the proteins exposed on the subendothelium of an injured vessel and to ensure their efficient recruitment to the site of injury. We confirm in this study using tissue-specific knock out combined with in vitro flow-based assays, that integrin $\alpha 5\beta 1$ is a functionally important receptor for efficient platelet adhesion, activation and aggregation on immobilized fibrillar fibronectin and collagen, which are found in the vessel wall. Interestingly, in the absence of $\alpha 5\beta 1$, the other main platelet receptor for fibronectin, $\alpha IIb\beta 3$, was inefficient in promoting normal platelet adhesion, activation and aggregation, highlighting the importance of $\alpha 5\beta 1$ in these processes. Despite this functional importance demonstrated in vitro, we found that platelet $\alpha 5\beta 1$ did not play an essential role in the arrest of bleeding after trauma or under inflammatory conditions. Finally, three distinct experimental models of thrombosis revealed no impact on thrombus formation in $\alpha 5\beta 1$ -deficient mice as compared to controls, indicating that this receptor is probably not a major factor in arterial thrombosis.

We observed that $\alpha 5\beta 1$ -deficient platelets aggregated normally in response to a series of soluble agonists and to collagen. In addition, fibrinogen binding and P-selectin and annexin V exposure in response to soluble agonists were completely normal, indicating no role of $\alpha 5\beta 1$ in the amplification step of platelet activation driven by these agonists. Adhesion under flow of $\alpha 5\beta 1$ -deficient platelets to many adhesive surfaces including fibrinogen, laminins and vWF was likewise unchanged. In contrast, we observed a marked impairment of the adhesion of these platelets to immobilized fibrillar fibronectin and collagen. These results suggest that $\alpha 5\beta 1$ is a highly specialized platelet receptor for probably only one adhesive protein, fibronectin. This is not a unique case, as platelets express many receptors to sense a single adhesive protein, notably

the GPIb-IX complex and integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ which bind respectively to vWF, collagen, laminins and vitronectin.(Versteeg et al., 2013) The reason why platelets have maintained distinct specific receptors is probably to ensure efficient adhesion to a wide range of matrices found in different types of vessels and at different depths of injury.(Bergmeier and Hynes, 2012)

It is well established that platelets express two main receptors for fibronectin, $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha IIb\beta 3$. Our results confirm that $\alpha 5\beta 1$ is a major receptor for fibronectin, since in its absence, we observed a dramatic reduction in platelet adhesion and activation on fibrillar fibronectin with almost no aggregation at all. As a consequence, our observations also indicate that $\alpha IIb\beta 3$ alone is not sufficient to compensate for the absence of $\alpha 5\beta 1$ in the case of adhesion to a fibronectin surface. We further found that $\alpha 5\beta 1$, in addition to its role in initiating platelet adhesion and activation on fibronectin(Beumer et al., 1994; McCarty et al., 2004), contributed to thrombus growth on collagen, a process known to be mainly ensured by $\alpha IIb\beta 3$.(Cho and Mosher, 2006; Matuskova et al., 2006; Ni et al., 2003) However, the impairment we observed when perfusing $\alpha 5^{-/-}$ blood over collagen was very modest as compared to what has been reported when $\alpha IIb\beta 3$ is blocked or absent, where no thrombus growth occurs and only a platelet monolayer forms.(Savage et al., 1998) One remaining question is the mechanism by which $\alpha 5\beta 1$ participates in thrombus build-up, as this receptor does not interact with fibrinogen or vWF, two adhesive proteins found in a growing thrombus. Heyu Ni et al. reported many years ago that mice deficient in both vWF and fibrinogen were still able to form thrombi at late stages and proposed a role of fibronectin in this process.(Ni et al., 2000) It is therefore reasonable to propose that fibronectin exposed after platelet activation or plasma fibronectin, through interaction with $\alpha 5\beta 1$, participates in platelet aggregation. This is consistent with the role of platelet $\alpha 5\beta 1$ in facilitating the assembly of plasma fibronectin on the surface of activated

platelets within a growing thrombus.(Olorundare et al., 2001) Such a multimerization of fibronectin would increase its reactivity and pro-thrombotic potential.

Petzold et al. reported that the absence of all three platelet $\beta 1$ integrins resulted in an increased tail-bleeding time, suggesting that one or more of these integrins play an important part in normal hemostasis.(Petzold et al., 2013) Using a similar tail-bleeding time assay, we found that $\alpha 5\beta 1$ -deficient mice did not bleed longer or lose more blood as compared to controls, indicating that $\alpha 5\beta 1$ is not a key platelet receptor for hemostasis in mice. This result might appear surprising, especially since the absence of either $\alpha 2$ or $\alpha 6$ likewise had no impact on the tail-bleeding time.(Habart et al., 2013; Schaff et al., 2013) A possible explanation is that $\beta 1$ integrins play redundant roles in hemostasis, where the absence of one integrin can be compensated by the others to ensure the interaction of platelets with the extracellular matrix components.

Platelets not only arrest bleeding after trauma, but also maintain vascular integrity and stop inflammatory bleeding.(Goerge et al., 2008) The molecular mechanism relies on the immunoreceptor tyrosine-based activation motif, GPVI and C-type lectin-like receptor II, which promote platelet activation.(Boulaftali et al., 2013; Gros et al., 2015) An unresolved question is which receptors support platelet adhesion at sites of inflammatory bleeding, since the process appears to be independent of two major adhesion receptors, the GPIb-IX complex and integrin $\alpha IIb\beta 3$.(Goerge et al., 2008; Rayes et al., 2018a) Our results exclude a key role of $\alpha 5\beta 1$, since no bleeding phenotype was observed in $\alpha 5^{-/-}$ mice using a cutaneous rPA model. While further studies will be required to identify the adhesion receptors important to stop inflammatory bleeding, it is tempting to speculate that compensatory mechanisms between such receptors could explain why no major bleeding occurs when only one of them is absent.

Using three distinct models of arterial thrombosis, in different vessels and under distinct rheological conditions, we did not find any major involvement of $\alpha 5\beta 1$ in thrombus formation, even though a tendency was observed in two models. These results indicate that $\alpha 5\beta 1$ alone does not play a central role in experimental thrombosis. Moreover, $\alpha 5\beta 1$ appears to be less important than the two other $\beta 1$ integrins, $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 6\beta 1$, which have both been shown to contribute to experimental thrombosis in at least one of the models used in this study. (He et al., 2003a; Kuijpers et al., 2007; Schaff et al., 2013) The apparent discrepancy we observed between an important role of $\alpha 5\beta 1$ in platelet aggregation on fibronectin *in vitro* and the absence of a role in experimental models of thrombosis could be linked to the nature of the surface exposed to the flowing blood *in vivo*, which might not contain enough fibrillar fibronectin. Another explanation could be the ability of other platelet adhesion receptors to compensate for the lack of $\alpha 5\beta 1$ on platelets. As it has been reported that an evolved atherosclerotic plaque is particularly rich in fibrillar fibronectin (Bültmann et al., 2010; Matter et al., 2004), it might be interesting to test the impact of $\alpha 5\beta 1$ blockade in apolipoprotein E-deficient models of atherosclerotic plaque rupture.

In conclusion, *in vitro* experiments performed with $\alpha 5\beta 1$ -deficient mouse platelets indicated that this integrin plays a very important role in supporting platelet adhesion, activation and aggregation on fibrillar fibronectin and participates in thrombus growth. However, integrin $\alpha 5\beta 1$ appears to be dispensable for hemostasis under normal and inflammatory conditions and is also not essential in *in vivo* models of experimental thrombosis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM, EFS, ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique) and SFH (Société Française d'Hématologie).

DISCLOSURES

None.

References

1. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* 2008;111(10):4958–4964.
2. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med* 2011;17(11):1423–1436.
3. Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996;84(2):289–297.
4. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998;94(5):657–666.
5. Zahid M, Mangin P, Loyau S, et al. The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target. *J Thromb Haemost JTH* 2012;10(12):2418–2427.
6. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 2013;93(1):327–358.
7. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Coller BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 1996;88(3):907–914.
8. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 2006;110.
9. Jamasbi J, Ayabe K, Goto S, Nieswandt B, Peter K, Siess W. Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future. *Thromb Haemost* 2017;117(7):1249–1257.
10. Habart D, Cheli Y, Nugent DJ, Ruggeri ZM, Kunicki TJ. Conditional knockout of integrin $\alpha 2\beta 1$ in murine megakaryocytes leads to reduced mean platelet volume. *PloS One* 2013;8(1):e55094.
11. Schaff M, Tang C, Maurer E, et al. Integrin $\alpha 6\beta 1$ is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation* 2013;128(5):541–552.

12. He L, Pappan LK, Grenache DG, et al. The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood* 2003;102(10):3652–3657.
13. Kuijpers MJE, Schulte V, Bergmeier W, et al. Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2003;17(6):685–687.
14. Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Dev Camb Engl* 1993;119(4):1093–1105.
15. Beumer S, IJsseldijk MJ, de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood* 1994;84(11):3724–3733.
16. McCarty OJT, Zhao Y, Andrew N, et al. Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion. *J Thromb Haemost JTH* 2004;2(10):1823–1833.
17. Maurer E, Schaff M, Receveur N, et al. Fibrillar cellular fibronectin supports efficient platelet aggregation and procoagulant activity. *Thromb Haemost* 2015;114(6):1175–1188.
18. Cazenave J-P, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2004;272:13–28.
19. Léon C, Eckly A, Hechler B, et al. Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood* 2007;110(9):3183–3191.
20. Bergmeier W, Hynes RO. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*;4(2):.

21. Cho J, Mosher DF. Impact of fibronectin assembly on platelet thrombus formation in response to type I collagen and von Willebrand factor. *Blood* 2006;108(7):2229–2236.
22. Matuskova J, Chauhan AK, Cambien B, et al. Decreased plasma fibronectin leads to delayed thrombus growth in injured arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(6):1391–1396.
23. Ni H, Yuen PST, Papalia JM, et al. Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(5):2415–2419.
24. Ni H, Denis CV, Subbarao S, et al. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest* 2000;106(3):385–392.
25. Olorundare OE, Peyruchaud O, Albrecht RM, Mosher DF. Assembly of a fibronectin matrix by adherent platelets stimulated by lysophosphatidic acid and other agonists. *Blood* 2001;98(1):117–124.
26. Petzold T, Ruppert R, Pandey D, et al. β 1 integrin-mediated signals are required for platelet granule secretion and hemostasis in mouse. *Blood* 2013;122(15):2723–2731.
27. 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.
28. 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.
29. Rayes J, Jadoui S, Lax S, et al. The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent. *Haematologica* 2018;103(6):e256–e258.

30. Kuijpers MJE, Pozgajova M, Cosemans JMEM, et al. Role of murine integrin $\alpha 2 \beta 1$ in thrombus stabilization and embolization: contribution of thromboxane A₂. *Thromb Haemost* 2007;98(5):1072–1080.
31. Bültmann A, Li Z, Wagner S, et al. Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis--a possible role of fibronectin. *J Mol Cell Cardiol* 2010;49(3):532–542.
32. Matter CM, Schuler PK, Alessi P, et al. Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin. *Circ Res* 2004;95(12):1225–1233.

LEGENDS TO THE TABLE AND FIGURES

Table 1. Platelet counts, volumes and expression of major surface glycoproteins in Ctrl and $\alpha 5^{-/-}$ mice.

Platelet counts and volumes in Ctrl and $\alpha 5^{-/-}$ mice were analyzed with an automatic cell counter; values represent the mean \pm standard error of the mean (SEM). The surface expression of various glycoproteins on platelets in whole blood from Ctrl and $\alpha 5^{-/-}$ mice was evaluated using selective antibodies and flow cytometry; results are expressed as the mean fluorescence intensity \pm SEM and were compared by the Mann-Whitney test. ** $p < 0.01$.

Figure 1: Characterization of the functional properties of $\alpha 5^{-/-}$ platelets. A and B, washed platelets ($3.0 \times 10^5/\mu\text{L}$) from Ctrl and $\alpha 5^{-/-}$ mice were stimulated with adenosine diphosphate (ADP) (2 μM), collagen (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or U46619 (1 μM) in the presence of fibrinogen (320 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or with thrombin (0.2 U/mL) in the absence of fibrinogen. Arrows indicate the point of agonist addition and aggregation profiles are representative of 3 separate experiments (A). The bar graph represents the percentage of platelet aggregation at 5 min ($n = 3$) (B). **C and D**, washed platelets ($5.0 \times 10^4/\mu\text{L}$) from Ctrl and $\alpha 5^{-/-}$ mice were stimulated for 10 min with ADP (2 μM), thrombin (0.25 U/mL) or protease-activated receptor 4 (1 mM) and the binding of a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-P-selectin antibody (C) or FITC-fibrinogen (D) was detected by flow cytometry. Results represent the mean fluorescence intensity \pm standard error of the mean (SEM) in 3 separate experiments performed in duplicate and were compared by the Mann-Whitney test. **E**, washed platelets ($3.0 \times 10^5/\mu\text{L}$) from Ctrl and $\alpha 5^{-/-}$ mice were stimulated with thrombin (0.25 U/mL), convulxin (15 nM) or both for 15 min, incubated with Alexa Fluor 488-annexin V for 20 min and analyzed by flow cytometry. The forward light scatter and fluorescence intensity of 10,000 cells were collected with a logarithmic

gain and the percentage of annexin V-positive platelets was determined in the upper quadrant of the plot. Data are expressed as the mean \pm SEM in 3 separate experiments performed in duplicate.

Figure 2: $\alpha 5^{-/-}$ platelets adhere normally to von Willebrand factor (vWF), fibrinogen and laminin but not to fibronectin. **A**, whole blood from Ctrl (n = 3) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 3) was perfused at $1,500 \text{ s}^{-1}$ through PDMS flow chambers coated with vWF binding protein (DDR2, $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$). Platelet adhesion was visualized in random fields by differential interference contrast (DIC) microscopy, scale bar $20 \text{ }\mu\text{m}$. The number of adherent platelets was determined over 2 min. **B**, whole blood from Ctrl (n = 3) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 3) was perfused at 300 s^{-1} through PDMS flow chambers coated with fibrinogen ($100 \text{ }\mu\text{g/mL}$) or laminin 411 ($100 \text{ }\mu\text{g/mL}$). Platelet adhesion was visualized in random fields by DIC microscopy and the number of adherent platelets was quantified over 5 min. **C and D**, whole blood from Ctrl (n = 5) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 4) was perfused at 300 s^{-1} through PDMS flow chambers coated with cellular fibrillar fibronectin ($300 \text{ }\mu\text{g/mL}$). Platelet adhesion was visualized in random fields by DIC microscopy, scale bar $20 \text{ }\mu\text{m}$ (C). The number of adherent platelets was determined over 8 min (D). **E and F**, whole blood from Ctrl (n = 5) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 5) was perfused at 300 s^{-1} through PDMS flow chambers coated with fibronectin and platelet attachment was quantified over 60 s (E). The behavior of platelets on the fibronectin surface was recorded for 20 platelets per perfusion over a period of 90 s in 5 different movies (F). Results are expressed as the mean \pm standard error of the mean and were compared by 2-way ANOVA (B) or the Mann-Whitney test (E); * $p < 0.05$.

Figure 3: Defective activation and aggregation of $\alpha 5^{-/-}$ mouse platelets on fibronectin and collagen. **A and B**, whole blood from Ctrl (n = 5) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 5) was perfused at 300 s^{-1}

¹ through PDMS flow chambers coated with cellular fibrillar fibronectin (300 µg/mL) for 15 min. Platelet adhesion was visualized in random fields by differential interference contrast (DIC) microscopy and JonA-PE fluorescence microscopy, scale bar 20 µm (A). The mean fluorescence intensity of JonA-PE platelet labeling was quantified (B). **C and D**, whole blood from Ctrl (n = 4) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 4) was perfused at 300 s⁻¹ through PDMS flow chambers coated with fibronectin for 15 min. Thrombus formation was visualized in random fields by DIC microscopy, scale bar 20 µm (C). The area of thrombi of more than 15 µm² was quantified (D). **E and F**, whole blood from PF4-Cre⁻ (n = 7) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 7) was perfused at 300 s⁻¹ through PDMS flow chambers coated with collagen (200 µg/mL) for 10 min. Platelet aggregation was visualized in random fields by confocal microscopy, scale bar 50 µm (E). The volume of the thrombi was quantified (F). Results are expressed as the mean ± standard error of the mean and were compared by the Mann-Whitney test (B, D and F); * p < 0.05.

Figure 4: Platelet integrin $\alpha 5\beta 1$ does not play a major role in experimental thrombosis in mice. **A and B**, thrombosis was triggered in Ctrl (n = 3) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 6) by application of a filter paper saturated with 7.5% FeCl₃ to the common carotid artery. Representative fluorescence images of the thrombus (green) at the indicated time points after injury, scale bar 500 µm (A). **C and D**, thrombosis was triggered in Ctrl (n = 5) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 5) by compression of the abdominal aorta with forceps. Representative fluorescence images of the thrombus (green) at the indicated time points after injury, scale bar 500 µm (C). **E and F**, thrombosis was triggered in Ctrl (n = 3) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 3) by superficial laser injury of a mesenteric arteriole, 3-4 vessels per mouse. Representative composite images of the thrombus (green) using bright field and fluorescence microscopy at the indicated time points after injury, scale bar 50 µm (E). Arrows indicate the direction of blood flow and the dotted lines the borders

of the vessels. The time course of thrombus growth is represented by its surface area (mean \pm standard error of the mean, B, D and F).

Figure 5: $\alpha 5^{-/-}$ mice display a normal bleeding time and do not present cutaneous bleeding under inflammatory conditions. **A and B**, the tail of Ctrl (n = 6) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 6) was sectioned. The time required for the first arrest of bleeding was recorded (A) and the volume of blood lost was measured over 30 min (B). The symbols correspond to individual mice. **C**, representative images of skin lesions 4 h after induction of a reverse passive Arthus (rpA) reaction in Ctrl and $\alpha 5^{-/-}$ mice. White circles represent the points of injection of an anti-bovine serum albumin antibody and yellow circles the points of injection of control IgG. **D**, quantification of the hemoglobin content (mg/cm²) in skin biopsies from Ctrl (n = 4) and $\alpha 5^{-/-}$ mice (n = 4). Values are the mean \pm SEM and results were compared by the Mann-Whitney test. Ns p > 0.05.

Table 1

	Ctrl	$\alpha 5^{-/-}$	Number of mice
Platelet count	$1095 \pm 48 \times 10^3/\mu\text{L}$	$1119 \pm 29 \times 10^3/\mu\text{L}$	13
Mean platelet volume	$4.98 \pm 0.07 \mu\text{m}^3$	$4.68 \pm 0.02 \mu\text{m}^3$	13
$\alpha\text{IIb}\beta 3$	3.16 ± 0.55	2.20 ± 0.23	3
$\alpha 2$	10.58 ± 0.06	10.63 ± 0.13	3
$\alpha 5$	1.16 ± 0.03	$0.24 \pm 0.009^{**}$	6
$\alpha 6$	13.26 ± 0.11	13.18 ± 0.18	3
$\beta 1$	2.66 ± 0.28	2.30 ± 0.19	3
GPIbα	6.70 ± 0.44	5.21 ± 0.26	3
GPV	1.12 ± 0.01	1.02 ± 0.03	3
GPIX	2.21 ± 0.21	2.03 ± 0.02	3
GPVI	1.71 ± 0.04	1.39 ± 0.01	3

Figure 1

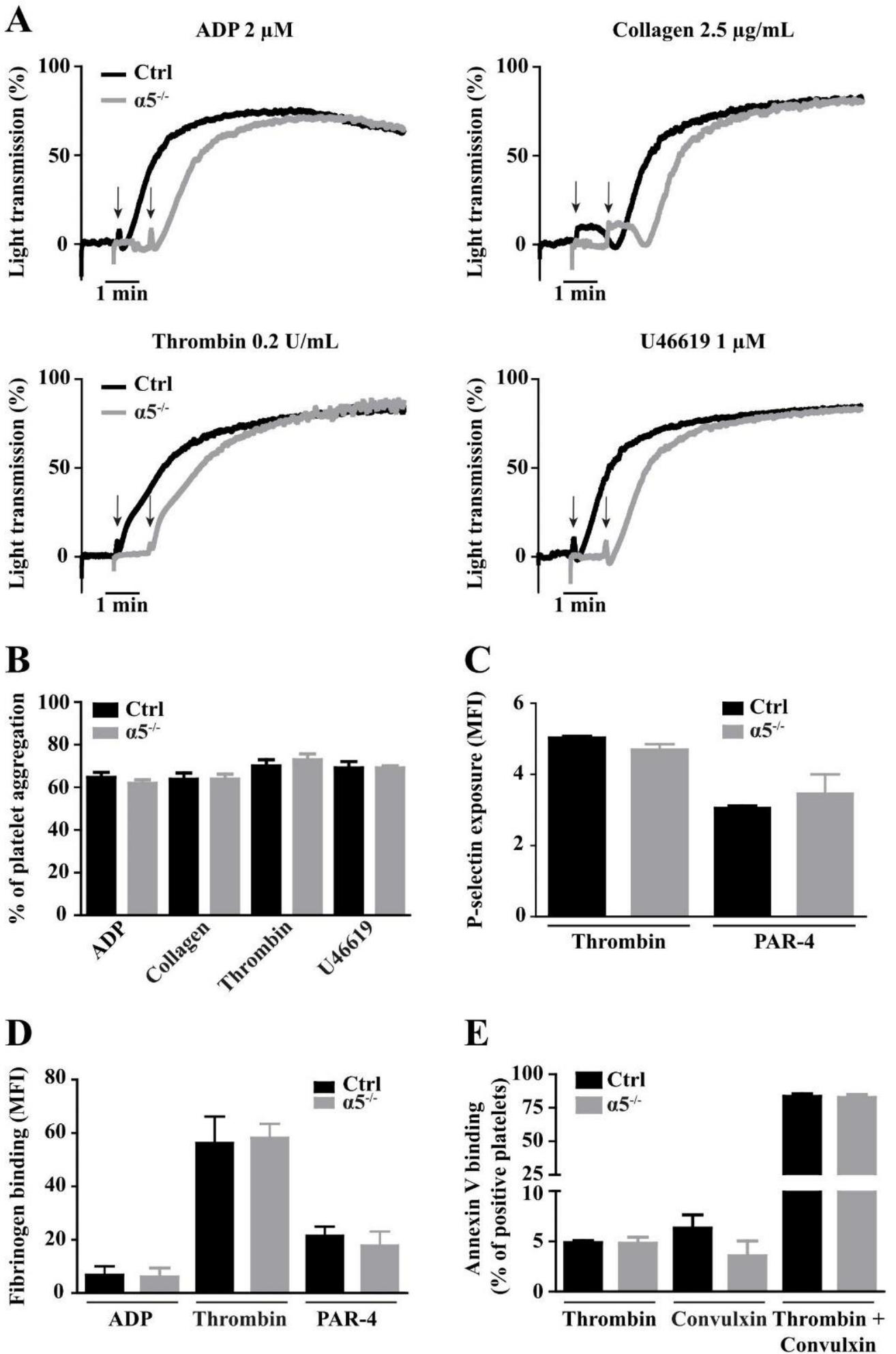


Figure 2

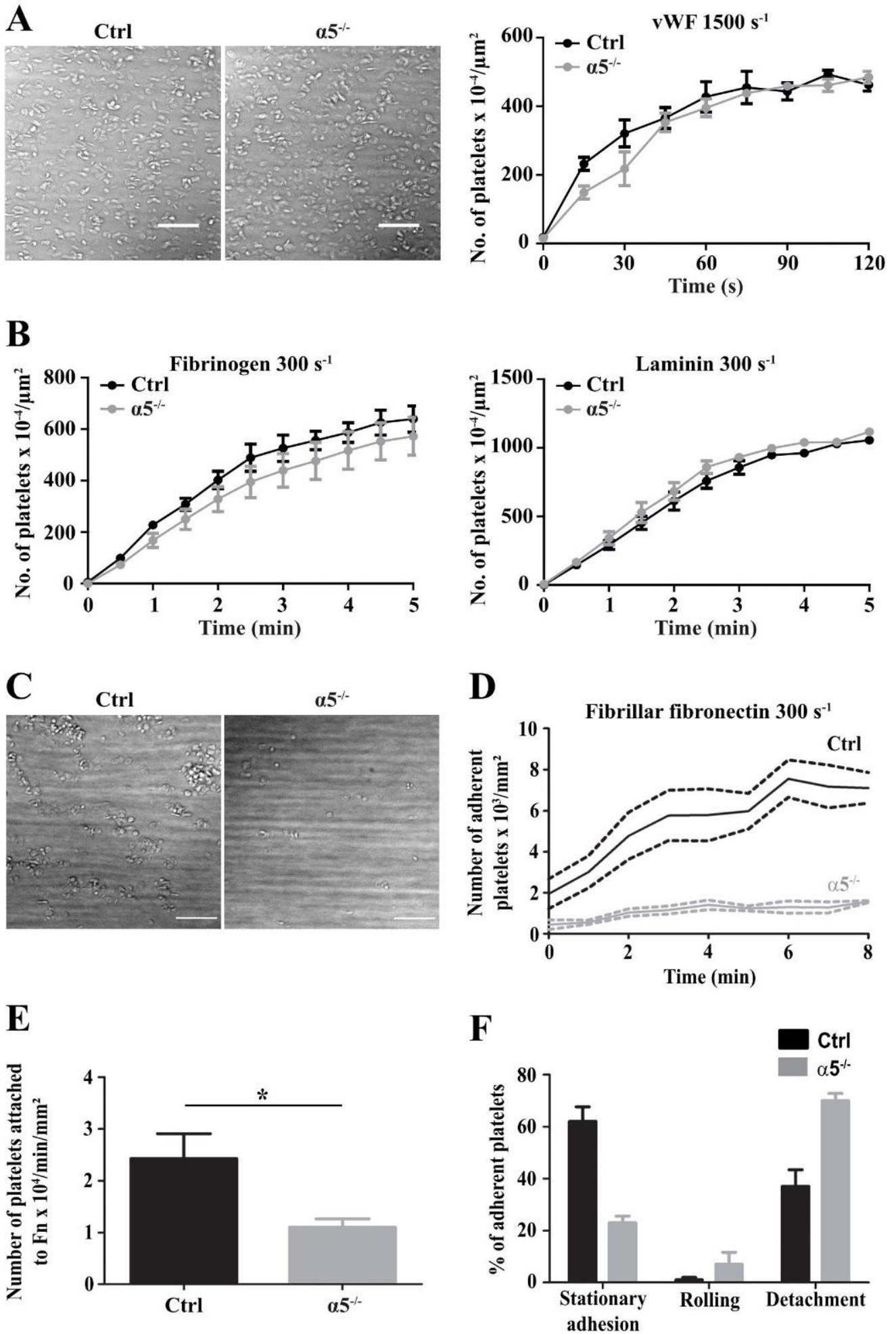


Figure 3

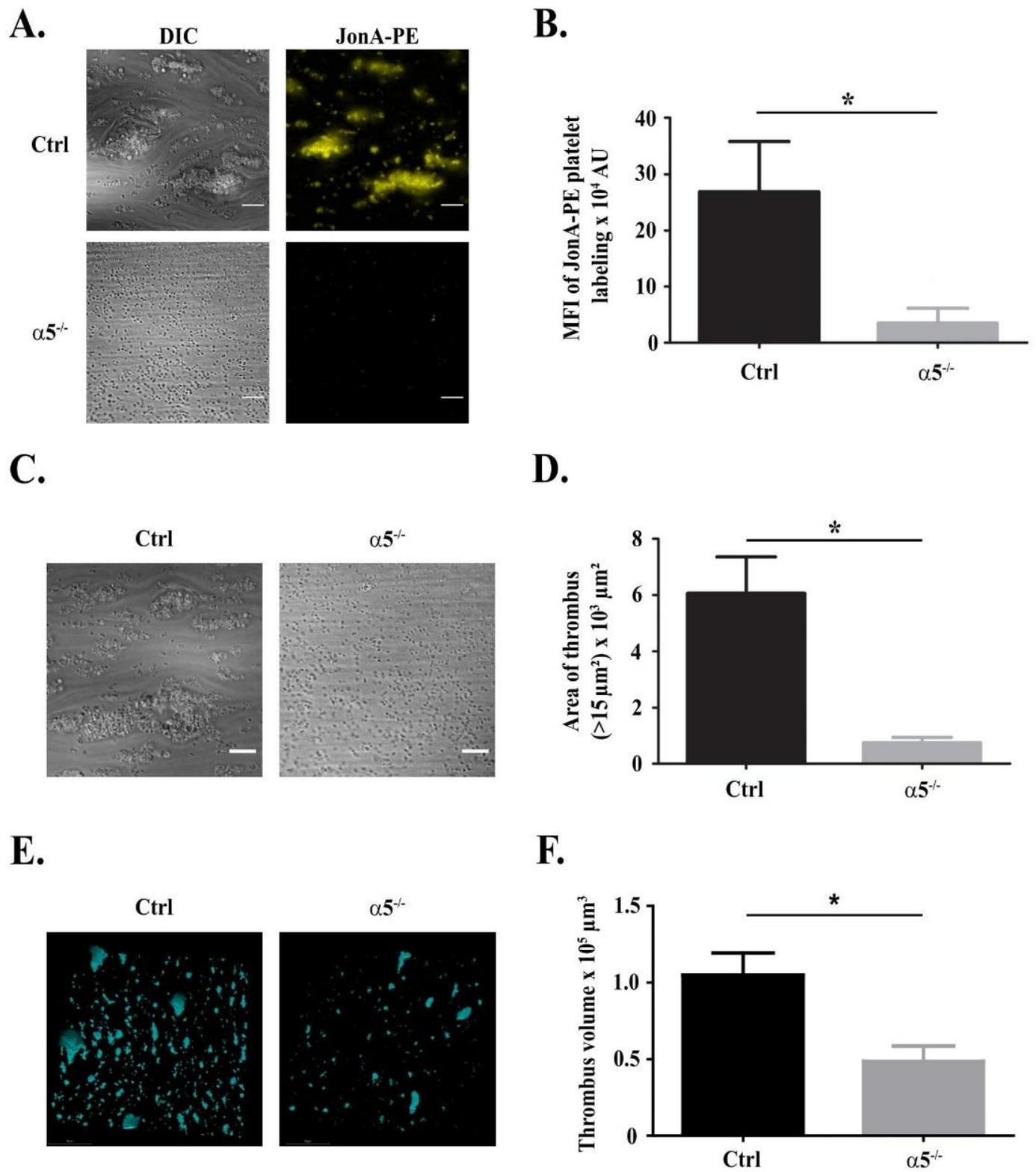
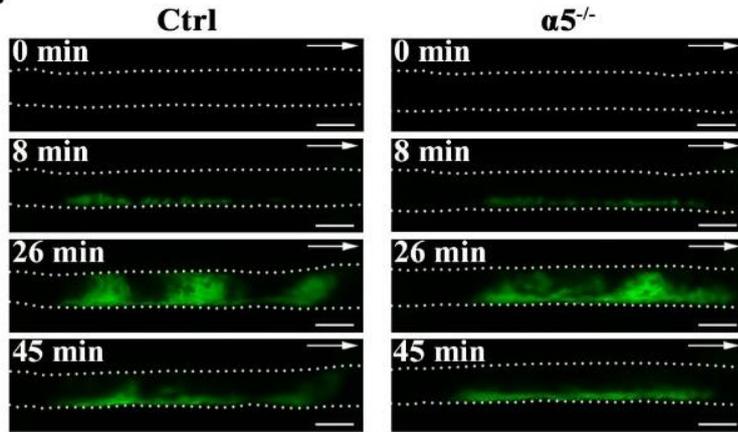
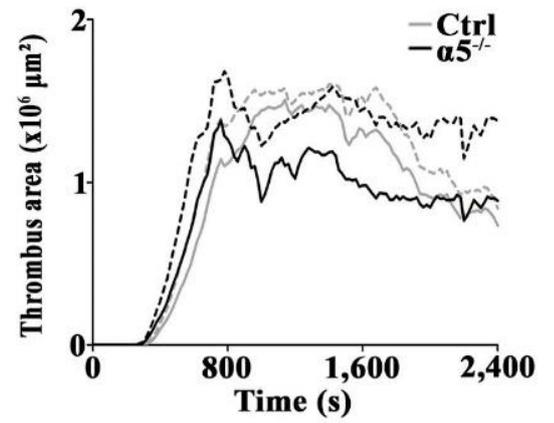


Figure 4

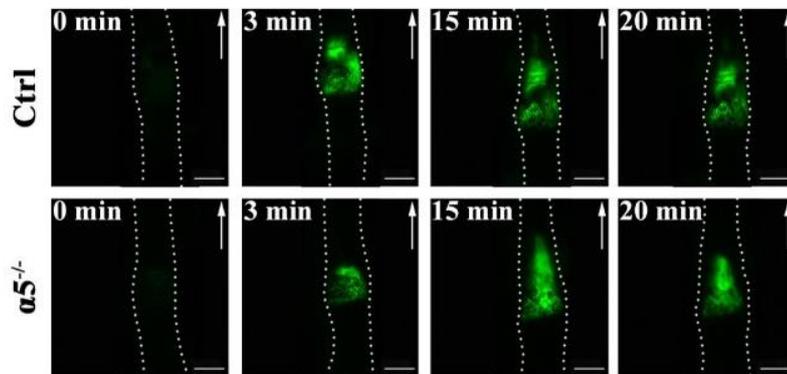
A.



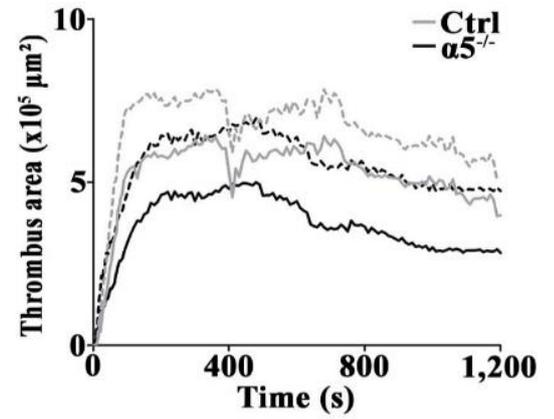
B.



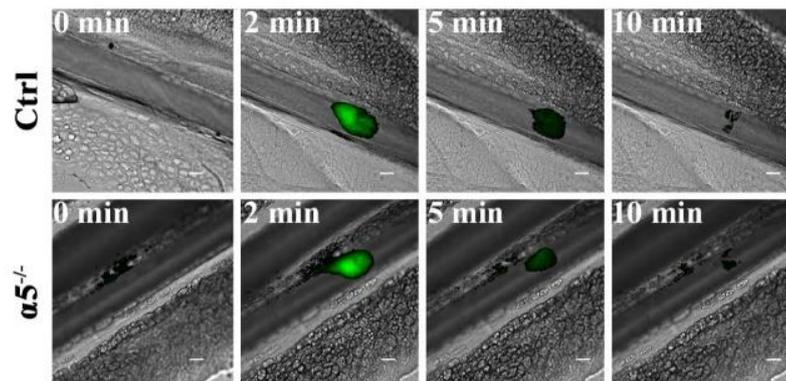
C.



D.



E.



F.

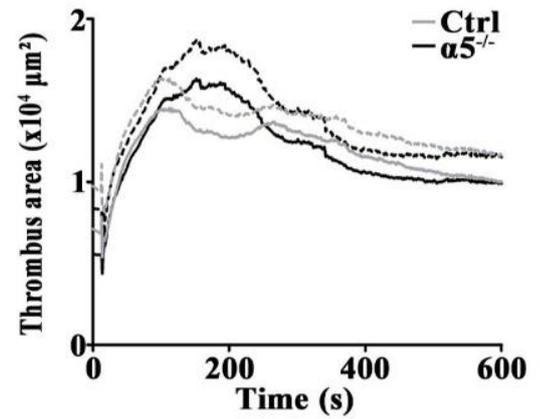
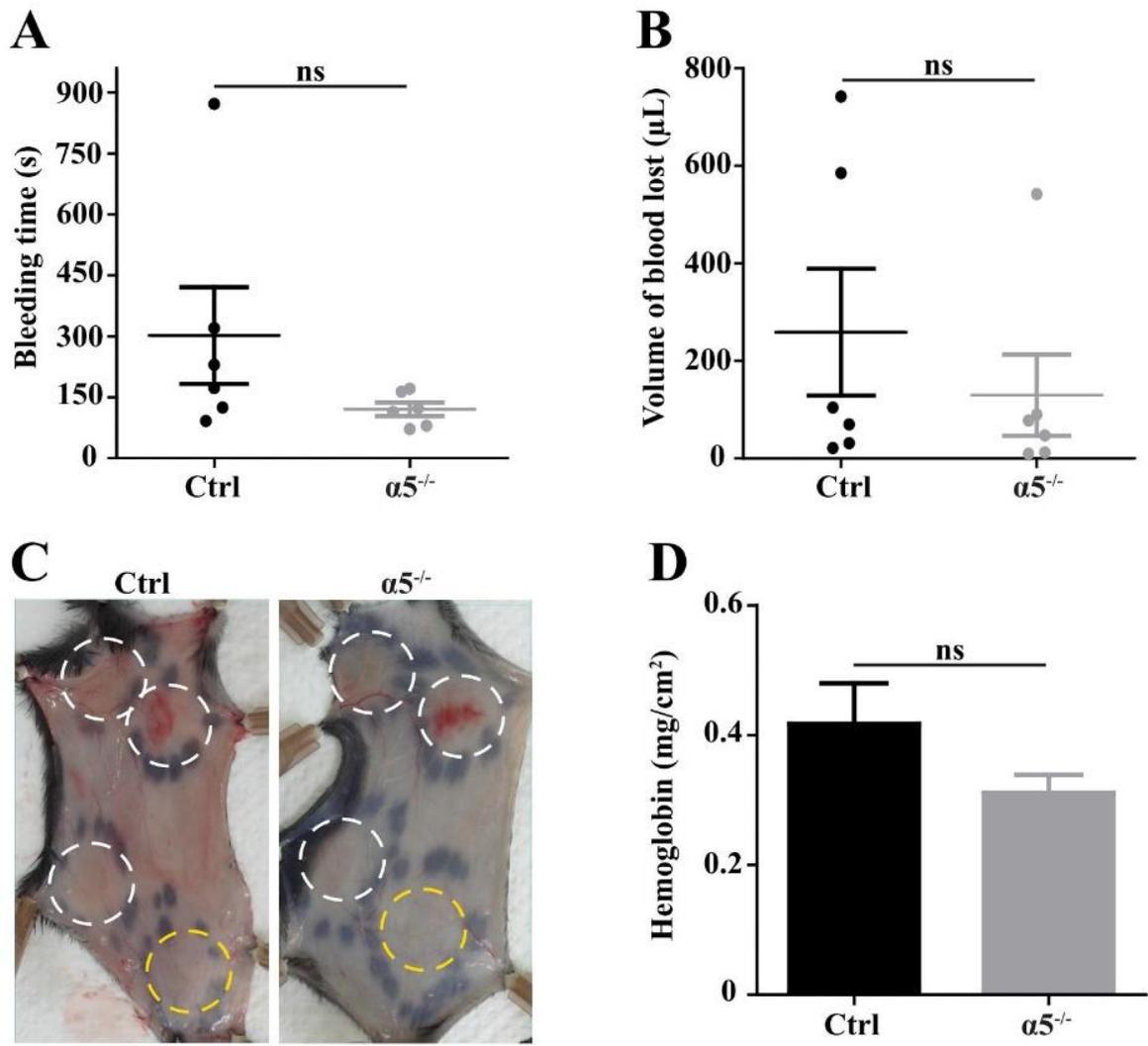


Figure 5



SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Materials

ADP, fibronectin, fatty acid free human serum albumin (HSA), hemoglobin (Hb), fibrinogen, thrombin and U46619 were from Sigma-Aldrich (Lyon, France). EDTA was from Invitrogen (Paisley, UK), acid citrate dextrose (ACD) from Bioluz (St-Jean-de-Luz, France) and recombinant hirudin from Transgene (Illkirch-Graffenstaden, France). Apyrase was purified from potatoes as previously described.(Cazenave et al., 2004) Collagen was from Takeda (Horm®, Linz, Austria), laminin from Biolamina (Stockholm, Sweden) and Von Willebrand factor (vWF) binding protein DDR2 was from Cambcol (Ely, UK). Alexa Fluor 488-annexin V was from Life technologies (Bleiswijk, Netherlands). FITC- fibrinogen and DIOC₆ (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide) were from Molecular Probes (Paisley, UK). Ferric chloride (FeCl₃) was from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France) and bovine serum albumin (BSA) from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Xylazine (Rompun®) from Bayer, ketamine (Imalgene®) from Merial and isoflurane (Vetflurane®) from Virbac were purchased from Elvetis (Domloup, France).

Antibodies

PE-conjugated anti- α 2 (clone HM α 2), anti- α 5 (clone 5H10-27) and anti- α 6 antibodies (clone GOH3), and Alexa Fluor 488-conjugated anti- β 1 antibody (clone HM β 1-1) were from Biologend (San Diego, CA, USA). FITC conjugated anti- α IIb β 3 (clone Leo.F2), anti-GPIIb α (clone Xia.G7), anti-GPV (clone Gon.G6), anti-GPIX (clone Xia.B4), anti-GPVI (clone Jaq.1) and anti- β 3 antibodies (clone Luc.H11), and PE-conjugated anti-activated α IIb β 3 antibody (JONA-PE) were from Emfret Analytics (Würzburg, Germany). FITC-coupled anti-P-selectin antibody (clone RB40.34) was from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Anti-BSA

antibody was from MP Biomedicals (Solon, OH, USA) and non-immunizing IgG-control from Southern Biotech (Birmingham, Alabama, USA).

Platelet glycoprotein expression

Whole blood was collected into EDTA (6 mM) after a 1-mm severing of the tail of mice anesthetized with isoflurane inhalation. Briefly, collected blood was diluted with PBS to obtain a concentration of 100,000 platelets/ μ L. Labeled antibodies against murine platelet α IIb β 3, α 2, α 5, α 6, β 1, GPIb α , GPV, GPIX and GPVI were incubated with diluted blood for 20 min at room temperature. After dilution with 500 μ L of PBS, surface glycoprotein expression of 10,000 platelet events was determined by flow cytometry.

Washed platelet preparation, and measurement of platelet aggregation, P-selectin exposure, soluble fibrinogen and annexin V binding

Blood drawn into ACD anticoagulant from the abdominal aorta of 4 to 5 mice was pooled and platelets were washed by sequential centrifugations and adjusted to 300,000 platelets/ μ L in Tyrode's albumin buffer containing 0.02 U/mL apyrase. Washed platelets aggregation was measured turbidimetrically in an APACT 4004 aggregometer (ELITech, Puteaux, France) in response to ADP (2 μ M), collagen (2.5 μ g/mL), thrombin (0.2 U/mL) and U46619 (1 μ M). For soluble fibrinogen binding and P-selectin exposure, washed platelets adjusted to 50,000 platelets/ μ L were incubated with FITC-fibrinogen (20 μ g/mL) or FITC-coupled anti-P-selectin antibody (25 μ g/mL) and stimulated with agonists (ADP 2 μ M, Thrombin 0.25 U/mL or PAR4 1 mM). For phosphatidylserine exposure, washed platelets adjusted to 300,000 platelets/ μ L were stimulated with agonists (convulxin 15 nM, thrombin 0.25 U/mL or both) for 15 min and then incubated with Alexa Fluor 488-annexin V (1/10th) for 20 min in the presence of 100 U/mL hirudin. Fluorescence was determined as previously published.(Schaff et al., 2013)

***In vitro* flow-based adhesion assay and measurement of thrombi volume**

Flow experiments were performed as previously described.(Schaff et al., 2013) PDMS flow chambers (0.1 x 1 mm) were coated with vWF binding protein (DDR2, 100 µg/mL), fibrinogen (100 µg/mL), laminins (100 µg/mL) or collagen (200 µg/mL) overnights and blocked with HSA (10 mg/mL in PBS) for 30 min. Hirudinated (100 U/mL) whole blood drawn from the abdominal aorta of adult mice was perfused through the coated PDMS chambers with a programmable syringe pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA) at indicated wall shear rates for the indicated time. Platelet adhesion was monitored by differential interference contrast (DIC) (Leica DMI4000B) using a 63x, 1.25 NA oil objective and a Hamamatsu ORCA Flash 4L.T camera (Hamamatsu Photonics, Massy, France).

For fibronectin flow-based assays, PDMS flow chambers (0.1 x 1 mm) were coated with cellular fibronectin (300 µg/mL) overnights and blocked with HSA (10 mg/mL in PBS) for 30 min. Mechanical stretching of cellular fibronectin was performed as described.(Maurer et al., 2015a) After hirudinated (100 U/mL) whole blood perfusion at 300 s⁻¹ for 15 min, the number of adherent platelets was quantified on DIC images and the platelet adhesion behavior was analyzed on videos: platelets adherent for more than 15 s were considered stationary adherent and platelets adherent for less than 15 s were classified in the detachment class. After hirudinated (100 U/mL) whole blood perfusion in presence of JONA-PE (1/50°) at 300 s⁻¹ for 15 min, αIIbβ3 integrin activation was determined by quantification of fluorescence images. Fluorescent platelets were monitored by DIC or fluorescence microscopy (Leica DMI4000B) using a 40x, 1.3 NA oil objective and a CMOS ORCA Flash 4L.T camera (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Hirudinated (100 U/mL) whole blood perfusion at 300 s⁻¹ for 15 min was used to quantified area of thrombus over fibronectin.

Ferric chloride-mediated thrombosis in carotid artery

FeCl₃-mediated thrombosis was performed in 7- to 11-week-old mice as previously described.(Eckly et al., 2011) Briefly, mice were anesthetized with xylazine 10 mg/kg and ketamine 100 mg/kg and received an injection of DIOC₆ to label platelets. The left common carotid artery was exposed and vascular injury was induced by applying a 3x3 mm Whatman filter paper saturated with 7.5% FeCl₃ laterally to the carotid artery for 2.5 min. Thrombus formation was monitored for 40 min in real time with a fluorescent microscope (Leica Microsystems San Westlar, Germany) coupled to a CCD (charge-coupled device) camera (ORCA-Fusion C14440-20UP, Hamamatsu, Japan). Image acquisition and analysis were performed with Metamorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Mechanical-injury-induced thrombus formation in abdominal aorta

Thrombosis was performed in 8- to 10-week-old mice as previously described.(Mangin et al., 2012) Briefly, the abdominal aorta of xylazine 10 mg/kg and ketamine 100 mg/kg anesthetized mice was isolated and DIOC₆ was injected to label platelets. A mechanical injury of the aorta was induced by pinching it with forceps for 15 s. Thrombus formation was monitored in real time with a fluorescent microscope (Leica Microsystems San Westlar, Germany) and a CCD camera (ORCA-Fusion C14440-20UP, Hamamatsu, Japan). Image acquisition and analysis were performed with Metamorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Laser-induced thrombus formation in mesenteric arterioles

Thrombosis was performed in 3- to 4-week-old mice (10-13 g) as previously described.(Hechler et al., 2010) Briefly, mice were anesthetized with xylazine 10 mg/kg and ketamine 100 mg/kg and received an injection of DIOC₆ to label platelets. A localized deep injury of a mesenteric arteriole (85-115 μm in diameter) was induced with a high intensity 440-nm-pulsed nitrogen

dye laser applied with a Micropoint system (Photonic Instruments, Andor Technology, Belfast, UK). Images were acquired with SlideBook 6 software (3i SAS, Paris, France).

Bleeding time

The bleeding times and volumes of blood lost were determined by transversally severing a 3-mm segment from the distal tail of 50-60-day-old mice anesthetized with isoflurane inhalation, as previously reported.(Léon et al., 2007) The tail was immersed in 0.9% saline at 37°C and the time needed for the bleeding to stop was recorded. The saline tube containing blood was spun for 5 min, the pellet was homogenized in lysis buffer and used for blood lost quantification comparing the optical density at 540 nm with a standard curve.

Reverse passive Arthus (rpA) reaction

An rpA reaction was elicited on isoflurane anesthetized mice by intradermal injection of an anti-BSA antibody or non-immunizing IgG (60 µg/spot in PBS), followed by retro-orbital injection of BSA (75 mg/kg in PBS), as previously described.(Goerge et al., 2008) Mice were killed after 4 h and 8-mm skin biopsies were homogenized in 250 µL PBS. The homogenate was spun for 5 min and the supernatant used for hemoglobin analysis, comparing the optical density at 405 nm with a standard curve.

References

1. Cazenave J-P, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2004;27213–28.

2. Schaff M, Tang C, Maurer E, et al. Integrin $\alpha 6\beta 1$ is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation* 2013;128(5):541–552.
3. Maurer E, Schaff M, Receveur N, et al. Fibrillar cellular fibronectin supports efficient platelet aggregation and procoagulant activity. *Thromb Haemost* 2015;114(6):1175–1188.
4. Eckly A, Hechler B, Freund M, et al. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost JTH* 2011;9(4):779–789.
5. Mangin PH, Tang C, Bourdon C, et al. A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;341(1):156–163.
6. Hechler B, Nonne C, Eckly A, et al. Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb Haemost JTH* 2010;8(1):173–184.
7. Léon C, Eckly A, Hechler B, et al. Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood* 2007;110(9):3183–3191.
8. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* 2008;111(10):4958–4964.

Conclusion

Les résultats de ce travail mettent en évidence que les plaquettes des souris déficientes pour l' $\alpha 5\beta 1$ ne présentent pas de défaut particulier. Au niveau fonctionnel, elles agrègent, activent l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ et sécrètent le contenu de leurs granules normalement en réponse à des agonistes solubles. Elles adhèrent également normalement sur une surface de FW, de fibrinogène ou de laminines. Cependant, en conditions de flux, les plaquettes de ces souris présentent un défaut majeur d'adhérence, d'activation et d'agrégation sur une surface de fibronectine fibrillaire. De plus, nous avons également constaté un défaut de croissance des thrombi sur collagène. Dans trois modèles *in vivo* distincts, l'utilisation de ces souris n'a pas permis de mettre en évidence un rôle majeur de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en thrombose artérielle. Enfin, un modèle de temps de saignement à la queue ainsi qu'un modèle de réaction passive inversée d'Arthus n'ont pas non plus mis en évidence de rôle majeur de cette intégrine en hémostase ainsi que dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est impliquée dans l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes à la fibronectine et également dans la croissance du thrombus. Cependant, cette intégrine ne semble pas jouer de rôle majeur en hémostase et en thrombose artérielle.

La coopération des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ plaquettaires dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires chez la souris

Publication 3 :

« Cooperation of platelet $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in the arrest of inflammatory bleeding in mice »

Emily Janus-Bell¹ *et al*

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065
Strasbourg, France

En préparation

Introduction

Les saignements en conditions inflammatoires se manifestent sous forme de pétéchies notamment au niveau cutané, mais peuvent également apparaître au niveau cérébral et pulmonaire où ils ont des conséquences graves pour les patients. Les plaquettes sont impliquées dans l'arrêt de ces saignements au niveau cutané par l'intermédiaire des récepteurs GPVI et CLEC-2 (Boulaftali et al., 2013; Rayes et al., 2018a), mais pas du complexe GPIb-IX-V et des intégrines $\beta 3$ (Deppermann et al., 2017; Goerge et al., 2008; Rayes et al., 2018a). La GPVI et CLEC-2 n'étant pas des récepteurs d'adhérence plaquettaire, on s'est intéressé au rôle des intégrines dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires, puisqu'elles sont impliquées dans l'adhérence des plaquettes suite à une lésion traumatique.

L'objectif de mon troisième projet a été d'étudier l'importance des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ plaquettaires dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de la réaction passive inversée d'Arthus (rpA) induisant une inflammation cutanée locale, auquel nous avons soumis des souris totalement déficientes pour les intégrines $\beta 3$, ou déficientes pour les intégrines $\beta 1$ et/ou $\beta 3$ plaquettaires. En parallèle, un modèle d'inflammation pulmonaire et un modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (tMCAO) ont également permis d'évaluer le rôle de ces intégrines dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires au niveau pulmonaire et cérébral.

Ce travail, pour lequel je signerai en premier auteur, sera soumis prochainement pour publication.

Cooperation of platelet $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in the arrest of inflammatory bleeding in mice

Emily Janus-Bell¹ *et al*

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065
Strasbourg, France;

Text word count: 1191

Abstract word count: 193

Number of figures: 2

Number of references: 14

Corresponding author: Pierre H. Mangin (PhD), Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, 10 rue Spielmann, F-67065 Strasbourg, France;
Phone: (+33) 3 88 21 25 25; Fax: (+33) 3 88 21 25 21; E-mail: pierre.mangin@efs.sante.fr

Key points:

Platelet integrins arrest bleeding under inflammatory conditions in the skin, brain and lungs.

Platelet $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins cooperate to arrest bleeding under inflammatory conditions in the skin.

En préparation

ABSTRACT

The main function of platelets is to arrest bleeding at sites of injury. Platelets also stop bleeding under inflammatory conditions through a mechanism proposed to rely on GPVI and CLEC-2, which appears to be independent of the receptors classically involved in the arrest of bleeding, the GPIb-V-IX complex and $\beta 3$ integrins. This raises the question of which platelet receptors support stable platelet adhesion at sites of inflammation, a role played by integrins during trauma. In this study, we found that PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ and $\alpha I I b^{-/-}$ mice, but not full integrin $\beta 3$ knock-outs, developed local petechial bleeding after a cutaneous reverse passive Arthus reaction, pointing to a central role of platelet $\alpha I I b \beta 3$ in this process. PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$ animals did not present bleeding, while PF4Cre- $\beta 1^{-/-} / \beta 3^{-/-}$ mice developed more severe cutaneous bleeding than PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ ones, implying a cooperation between these integrin families in stopping inflammatory bleeding in the skin. Similar results were obtained in a stroke model, where only PF4Cre- $\beta 1^{-/-} / \beta 3^{-/-}$ mice developed cerebral bleeding. Platelet $\beta 3$ integrins were also playing a role in the arrest of pulmonary bleeding after LPS challenge. Altogether, these results identify a major role of platelet integrins in the arrest of bleeding under inflammatory conditions.

INTRODUCTION

The main physiological function of platelets is to stop bleeding at sites of injury by forming a hemostatic plug which seals the breach (Versteeg et al., 2013). Platelets also participate in the arrest of bleeding under inflammatory conditions, since thrombocytopenic mice and humans develop local bleeding at sites of inflammation (Boulaftali et al., 2013; Carbo et al., 2009; Goerge et al., 2008; Gros et al., 2015; Hillgruber et al., 2015; Rayes et al., 2018a). Such bleeding is induced in the skin by neutrophil transmigration through the vascular wall (Gros et al., 2015; Hillgruber et al., 2015). The molecular mechanism by which platelets stop petechial bleeding relies on ITAM receptors, primarily GPVI, with CLEC-2 playing a secondary role (Boulaftali et al., 2013; Rayes et al., 2018a). These observations, together with the fact that petechial bleeding appears to be independent of the GPIb-V-IX complex and $\beta 3$ integrins (Deppermann et al., 2017; Goerge et al., 2008; Rayes et al., 2018a), would suggest that platelets play a part in arresting bleeding under inflammatory conditions, independently of the receptors classically involved in hemostasis. This also raises the question of how platelets are recruited at inflammatory sites. Such a role could be fulfilled by the three $\beta 1$ integrins expressed at the platelet surface, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 6\beta 1$, which all bind to subendothelial matrix proteins and whose involvement in the arrest of bleeding during inflammation remains unknown.

In this study, we investigated the role of platelet $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in arresting bleeding under inflammatory conditions in the skin, brain and lungs, using mice deficient in one (PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$ and PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$) or both (PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$) integrin families in the platelet lineage.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Anti-BSA antibody was from Cappel and the IgG-control from BD Bioscience. Bovine serum albumin (BSA) was from Euromedex. Hemoglobin (Hb) and lipopolysaccharide (LPS) (L9143) were from Sigma-Aldrich.

Animals

C57BL/6J mice were from Charles River Laboratories. $\beta 1^{fl/fl}$ (R. Fässler, Max Planck Institute) (Potocnik et al., 2000) and $\beta 3^{fl/fl}$ mice (K. Weilbaecher, USA) were crossed with PF4Cre⁺ mice (Tiedt et al., 2007). PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$ mice were generated in our animal facilities. Total $\beta 3$ knock-out mice ($\beta 3^{-/-}$) were donated by J. Reiser. $\alpha IIb^{-/-}$ mice were previously described [12]. All procedures for animal experiments were approved by the Regional Ethical Committee for Animal Experimentation and the French government (approval no: 2019040211599410 and 2017061410012423).

Reverse passive Arthus (rpA) reaction and *in vivo* imaging

Mice were anesthetized with isoflurane. An rpA reaction was elicited by intradermal injection of an anti-BSA antibody or non-immunizing IgG (60 μ g/spot), followed by retro-orbital injection of BSA (75 mg/kg), as previously described (Goerge et al., 2008). Eptifibatide (16 mg/kg) was injected retro-orbitally. After 4 hours, the mice were killed and punch biopsies were blended in 250 μ L PBS. The homogenate was spun and the supernatant used for Hb analysis (plate reader, 405 nm). For *in vivo* imaging, a dorsal skinfold chamber was employed as described previously (Goerge et al., 2008).

Lung inflammation model

Mice were anesthetized with xylazine 5 mg/kg and ketamine 50 mg/kg and inoculated intranasally with *P. Aeruginosa* LPS (1 µg). After 24 hours, 2 broncho-alveolar lavages (BAL) with 1 mL cold PBS were performed to analyze the Hb content.

Stroke model, MRI and histological analysis

Transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) was induced by inserting for 120 min a siliconized monofilament (Doccol) into the common carotid artery (Goerge et al., 2008). After 6 hours, the mice were: i) anesthetized and scanned by MRI (7T, Bruker, Germany); ii) sacrificed and the brains cut into 1 mm coronal sections to measure intracerebral hemorrhage volumes.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (see figure legends).

RESULTS AND DISCUSSION

To evaluate the role of platelet integrins in arresting bleeding during cutaneous inflammation, we used an rpA model. In agreement with previous studies, we observed that the absence of integrin $\beta 3$ (total $\beta 3^{-/-}$ knock-out) (**Figure 1A, B**) or pharmacological blockade of $\alpha \text{IIb}\beta 3$ with eptifibatide (**Figure 1C, D**) did not result in bleeding at inflammatory sites. In contrast, platelet-specific integrin $\beta 3$ -depleted mice (PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$) developed severe bleeding (WT: 0.39 ± 0.04 mg Hb/cm²; PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$: 0.78 ± 0.09 mg/cm²; $p < 0.01$) (**Figure 1E, F**). Similar results were obtained with $\alpha \text{IIb}^{-/-}$ mice (WT: 0.19 ± 0.03 mg/cm²; $\alpha \text{IIb}^{-/-}$: 0.42 ± 0.07 mg/cm²; $p < 0.05$), confirming the central role of platelet $\alpha \text{IIb}\beta 3$ integrin in stopping cutaneous bleeding during inflammation (**Figure 1G**). The use of a skinfold chamber revealed the occurrence of petechial bleeding in PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ animals at earlier time points, which is typical of inflammatory bleeding (**Figure 1H**). How can we explain that tissue-specific PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ but not full $\beta 3^{-/-}$ knock-out mice display bleeding in the rpA model? As vascular injury in this model is mediated by neutrophils transmigrating through the endothelium (Gros et al., 2015; Hillgruber et al., 2015) and neutrophils express $\beta 3$ integrins, we hypothesize that in $\beta 3^{-/-}$ mice, neutrophils might not induce vascular damage. To evaluate this hypothesis, it would be interesting to do intravital microscopy using skinfold chambers to follow neutrophil extravasation in the tissue.

We also identified a role of platelet $\beta 1$ integrins in stopping bleeding after skin inflammation. Thus, while depletion of all three platelet $\beta 1$ integrins (PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$) did not result in skin hemorrhages, mice expressing neither platelet $\beta 1$ nor platelet $\beta 3$ integrins (PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$) presented bleeding (1.22 ± 0.13 mg Hb/cm²), which was significantly increased as compared to PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ mice (0.78 ± 0.09 mg/cm²; $p < 0.05$) (**Figure 1I, J**). These results not only identify a novel role of $\beta 1$ integrins in stopping inflammatory bleeding, but also highlight a cooperation

between platelet $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in the arrest of bleeding after a local skin inflammatory challenge.

To further evaluate the part played by platelet integrins in arresting bleeding during inflammation, we used a tMCAO model. Since the majority of PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ and PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$ mice die 24 hours after occlusion of the MCA (**data not shown**) (Kleinschnitz et al., 2007; Kraft et al., 2015), we sacrificed the animals at very early stages, i.e., 6 hours after induction of occlusion. Under these experimental conditions, ischemic infarcts were observed in all mice (**Figure 2A, B**). On SWI-MRI sequences and by histological analysis, we observed important cerebral hemorrhages in the brain sections of PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$, but not of WT, PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$ or PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ mice (**Figure 2A**). This was confirmed by measuring cerebral hemorrhagic volumes, which were markedly increased in PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$ ($1.63 \pm 0.46 \text{ mm}^3$, n=17) as compared to WT mice ($0.18 \pm 0.07 \text{ mm}^3$, n=8; $p < 0.05$) (**Figure 2C**). These findings indicate that similarly as in the skin, platelet $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins cooperate to arrest cerebral bleeding under inflammatory conditions.

In parallel, we used an LPS-induced lung inflammation model to investigate the role of platelet integrins in the arrest of pulmonary bleeding during inflammation. Consistent with previous observations (Boulaftali et al., 2013; Deppermann et al., 2017; Goerge et al., 2008; Hillgruber et al., 2015; Rayes et al., 2018a), we found that severe platelet immunodepletion increased lung hemorrhages under inflammatory conditions (**data not shown**). We observed bleeding in the BAL fluids from PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ and PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$, but not in PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$ mice (**Figure 2D**). This was supported by the Hb quantification in the BAL fluids which was increased in PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ and PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$ (PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$: $0.88 \pm 0.14 \text{ mg Hb/mL}$; PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$: $1.16 \pm 0.22 \text{ mg Hb/mL}$) as compare to Ctrl mice (Ctrl: $0.17 \pm 0.06 \text{ mg Hb/mL}$; $p < 0.01$) (**Figure 2E**).

These results show that platelet β_3 integrins also play a role in the arrest of inflammatory pulmonary bleeding.

In conclusion, this work leads us to propose that platelet β_1 and β_3 integrins cooperate to stop bleeding under inflammatory conditions in the skin and brain. In addition, we did observe a role of platelet β_3 integrins in the arrest of bleeding in inflamed lungs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by ARMESA, Société Française d'Hématologie (SFH) and by a grant from the Concours mondial de l'innovation: TherAVC 2.0 (BPI France).

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

E.J.B. and N.R. acquired, analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript; C.M. acquired the data; B.H. analyzed and interpreted the data; B.N. acquired and interpreted the data, provided essential tools and wrote the manuscript; C.G. contributed to writing of the manuscript; P.H.M. conceived and designed the research, interpreted the data, wrote the manuscript and handled funding and supervision.

DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that no conflicts of interest exist.

REFERENCES

- [1] H. H. Versteeg, J. W. M. Heemskerk, M. Levi, et P. H. Reitsma, « New fundamentals in hemostasis », *Physiol. Rev.*, vol. 93, n° 1, p. 327-358, janv. 2013, doi: 10.1152/physrev.00016.2011.
- [2] Y. Boulaftali *et al.*, « Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation », *J. Clin. Invest.*, vol. 123, n° 2, p. 908-916, févr. 2013, doi: 10.1172/JCI65154.
- [3] T. Goerge *et al.*, « Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia », *Blood*, vol. 111, n° 10, p. 4958-4964, mai 2008, doi: 10.1182/blood-2007-11-123620.
- [4] A. Gros *et al.*, « Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice », *Blood*, vol. 126, n° 8, p. 1017-1026, août 2015, doi: 10.1182/blood-2014-12-617159.
- [5] C. Hillgruber *et al.*, « Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia », *J. Exp. Med.*, vol. 212, n° 8, p. 1255-1266, juill. 2015, doi: 10.1084/jem.20142076.
- [6] J. Rayes *et al.*, « The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent », *Haematologica*, vol. 103, n° 6, p. e256-e258, 2018, doi: 10.3324/haematol.2017.182162.
- [7] C. Carbo, I. del Conde, et D. Duerschmied, « Petechial bleeding after sunburn in a patient with mild thrombocytopenia », *Am. J. Hematol.*, vol. 84, n° 8, p. 523, août 2009, doi: 10.1002/ajh.21321.

- [8] C. Deppermann *et al.*, « Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice », *Blood*, vol. 129, n° 12, p. 1702-1706, 23 2017, doi: 10.1182/blood-2016-12-750711.
- [9] A. J. Potocnik, C. Brakebusch, et R. Fässler, « Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow », *Immunity*, vol. 12, n° 6, p. 653-663, juin 2000.
- [10] R. Tiedt, T. Schomber, H. Hao-Shen, et R. C. Skoda, « Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo », *Blood*, vol. 109, n° 4, p. 1503-1506, févr. 2007, doi: 10.1182/blood-2006-04-020362.
- [11] P. H. Mangin *et al.*, « A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 341, n° 1, p. 156-163, avr. 2012, doi: 10.1124/jpet.111.189050.
- [12] J. Zhang, F. Varas, M. Stadtfeld, S. Heck, N. Faust, et T. Graf, « CD41-YFP mice allow in vivo labeling of megakaryocytic cells and reveal a subset of platelets hyperreactive to thrombin stimulation », *Exp. Hematol.*, vol. 35, n° 3, p. 490-499, mars 2007, doi: 10.1016/j.exphem.2006.11.011.
- [13] C. Kleinschnitz, M. Pozgajova, M. Pham, M. Bendszus, B. Nieswandt, et G. Stoll, « Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding », *Circulation*, vol. 115, n° 17, p. 2323-2330, mai 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.691279.

[14] P. Kraft *et al.*, « Efficacy and Safety of Platelet Glycoprotein Receptor Blockade in Aged and Comorbid Mice With Acute Experimental Stroke », *Stroke*, vol. 46, n° 12, p. 3502-3506, déc. 2015, doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011114.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Platelet $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins stop cutaneous bleeding under inflammatory conditions. **A**, Representative images of skin lesions 4 hours after induction of an rpA reaction in wild-type (WT) and total $\beta 3$ -deficient mice (total $\beta 3^{-/-}$). **B**, Quantification of the Hb content (mg/cm²) in cutaneous rpA biopsies of WT (n=3) and total $\beta 3^{-/-}$ mice (n=3). **C**, Representative images of skin lesions 4 hours after induction of an rpA reaction in control (Ctrl) and eptifibatide-treated mice. **D**, Quantification of the Hb content (mg/cm²) in cutaneous rpA biopsies of Ctrl (n=5) and eptifibatide-treated mice (n=4). **E**, Representative images of skin lesions 4 hours after induction of an rpA reaction in WT and platelet-specific $\beta 3$ integrin-deficient mice (PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$). **F**, Quantification of the Hb content (mg/cm²) in cutaneous rpA biopsies of WT (n=8) and PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ mice (n=8). **G**, Quantification of the Hb content (mg/cm²) in cutaneous rpA biopsies of WT (n=7) and αIIb integrin-deficient mice ($\alpha IIb^{-/-}$) (n=7). **H**, Representative images of skin lesions before and 3 hours after induction of inflammation in dorsal skinfold chambers of WT and PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ mice. **I**, Representative images of skin lesions 4 hours after induction of an rpA reaction in WT, platelet-specific $\beta 1$ integrin-deficient (PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$), PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ and platelet-specific $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin-deficient mice (PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$). **K**, Quantification of the Hb content (mg/cm²) in cutaneous rpA biopsies of WT (n=17), PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$ (n=8), PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ (n=9) and PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$ mice (n=15). Ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Mann-Whitney test or Bonferroni-corrected 1-way ANOVA.

Figure 2: Platelet integrins arrest bleeding under inflammatory conditions in the brain and lungs. **A**, Representative images of cerebral infarcts (T2WI sequence), cerebral hemorrhages (SWI sequence) and histological coronal brain sections (1 mm thick) 6 hours after

induction of tMCAO in WT, PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$, PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ and PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$ mice. **B**, Quantification of infarct volumes (mm^3) in coronal brain sections 6 hours after induction of cerebral occlusion in WT (n=8), PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$ (n=4), PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ (n=4) and PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$ mice (n=17). **C**, Quantification of hemorrhagic volumes (mm^3) in coronal brain sections 6 hours after induction of cerebral occlusion in WT (n=8), PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$ (n=4), PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ (n=3) and PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$ mice (n=17). **D**, Representative images of BAL fluids 24 hours after induction of lung inflammation in Ctrl, PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$, PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ and PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$ mice. **E**, Quantification of the Hb content (mg/mL) in BAL fluids 24 hours after induction of lung inflammation in Ctrl (n=7), PF4Cre- $\beta 1^{-/-}$ (n=6), PF4Cre- $\beta 3^{-/-}$ (n=5) and PF4Cre- $\beta 1^{-/-}/\beta 3^{-/-}$ mice (n=6). Results are presented as the mean \pm SEM. Ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Dunn-corrected Kruskal-Wallis test (for cerebral data) or Bonferroni-corrected 1-way ANOVA.

Figure 1

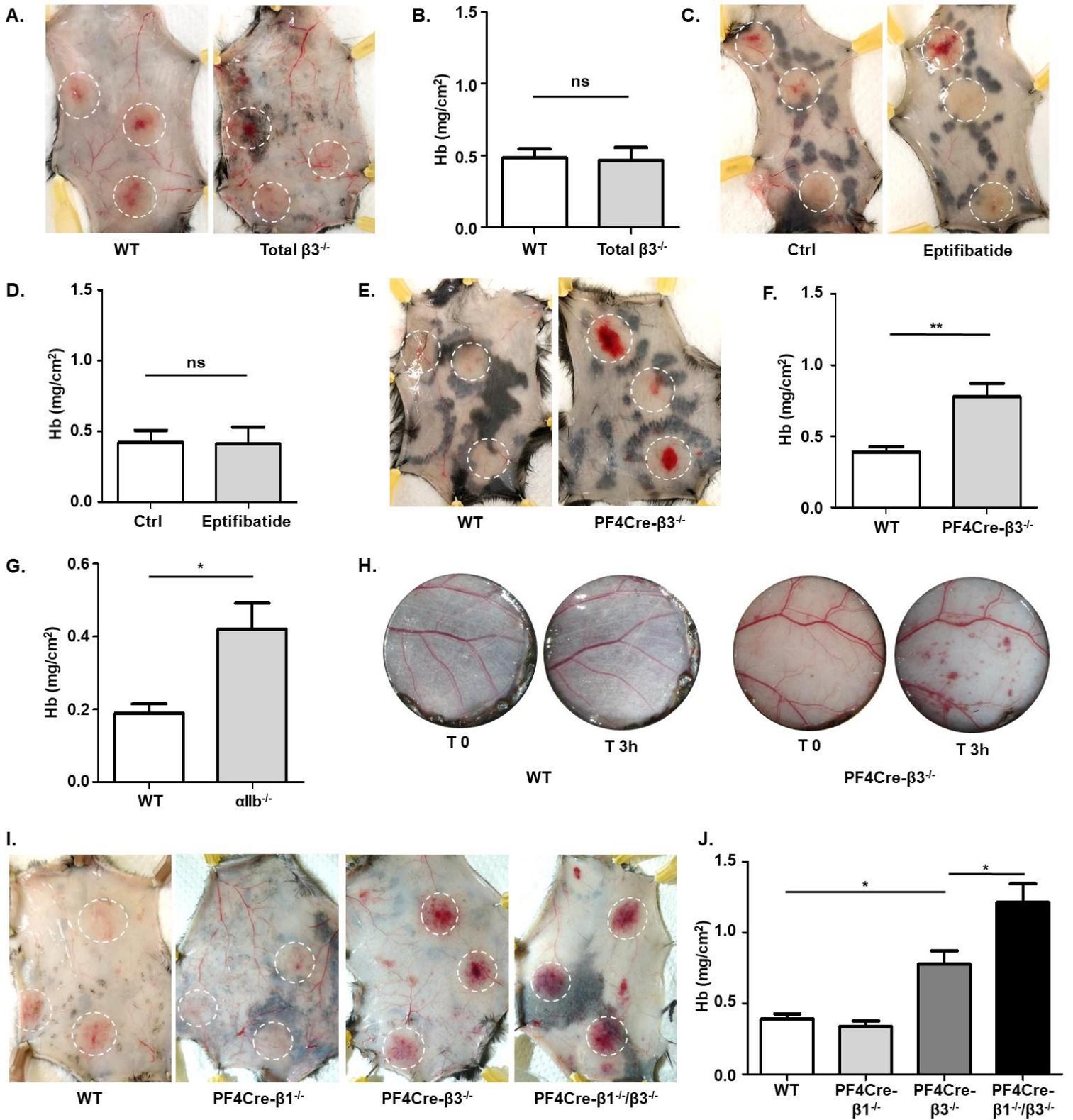
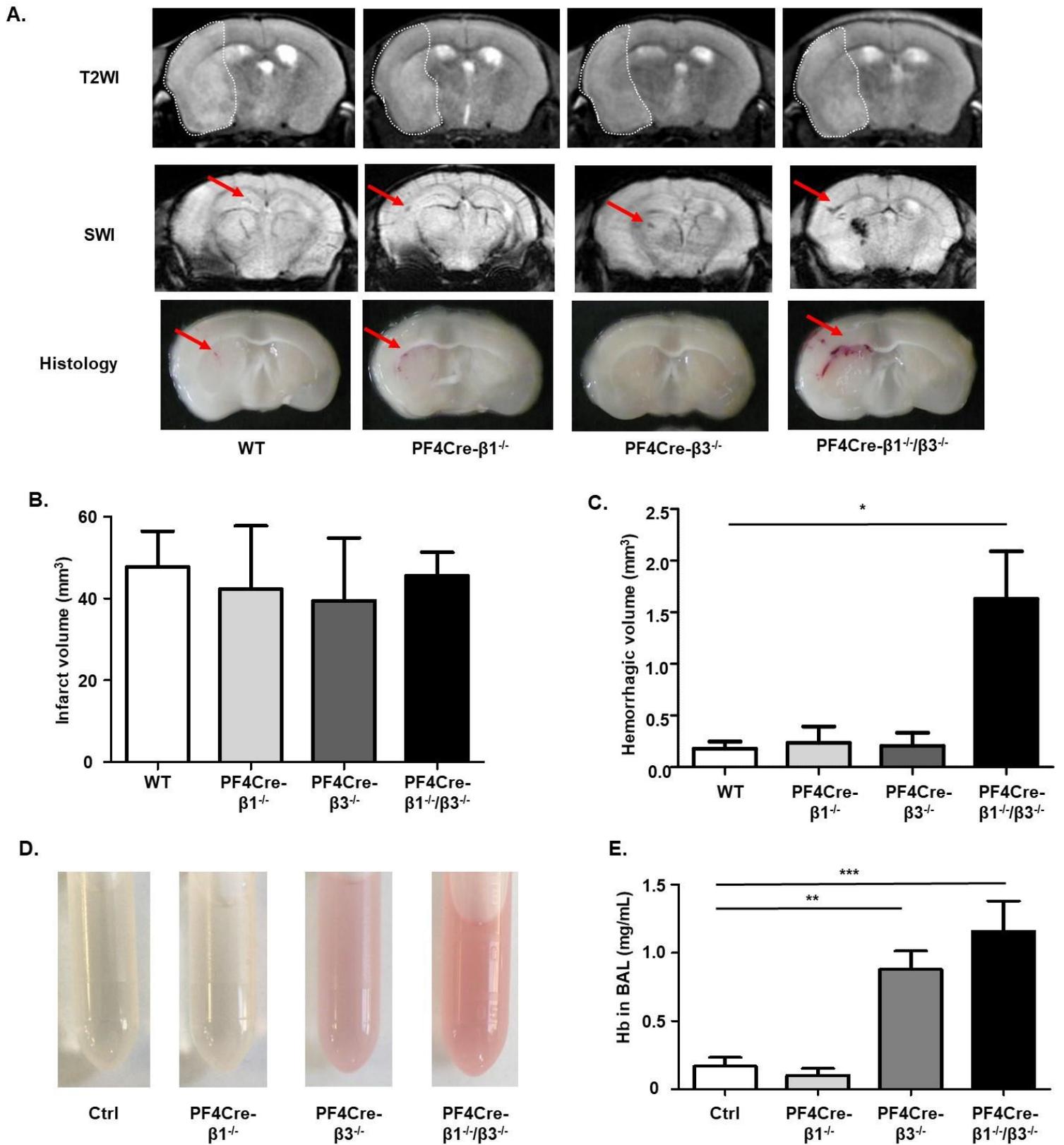


Figure 2



Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence qu'au cours d'une inflammation cutanée induite dans le modèle de la rpA, l'absence d'intégrines $\beta 3$ à la surface des plaquettes, mais pas une absence totale de $\beta 3$ dans toutes les cellules, conduit à des saignements inflammatoires localisés. Ces résultats indiquent un rôle important des intégrines $\beta 3$ plaquettaires dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires au niveau de la peau. Afin de comprendre l'absence de saignements chez les souris totalement déficientes pour les intégrines $\beta 3$, j'ai récemment mis au point une approche de microscopie intravitale permettant d'observer la transmigration des neutrophiles à travers la paroi vasculaire. Ce nouveau modèle, couplé à l'utilisation des deux lignées de souris déficientes pour les intégrines $\beta 3$ citées précédemment, devrait nous permettre d'évaluer le rôle de ces intégrines dans le processus de transmigration. Notre hypothèse est qu'en l'absence d'intégrines $\beta 3$ sur les neutrophiles, ces derniers ne sont pas en mesure de trans migrer à travers l'endothélium vasculaire, et donc qu'ils n'induisent pas de brèches vasculaires, expliquant ainsi l'absence de saignements chez ces souris dans le modèle de rpA classique. Nous avons également identifié une coopération des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ plaquettaires dans l'arrêt des saignements inflammatoires puisque les souris doublement déficientes pour ces intégrines au niveau plaquettaire saignent plus que les PF4Cre- $\beta 3$. En parallèle, l'utilisation d'un modèle d'inflammation pulmonaire induit par l'inoculation intranasale de LPS et d'un modèle d'inflammation cérébrale induit par l'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (tMCAO) nous ont permis d'identifier une coopération des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ plaquettaires dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux indiquent que les intégrines $\beta 3$ plaquettaires sont impliquées dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires au niveau cutané et pulmonaire et qu'il existe une coopération avec les intégrines $\beta 1$ plaquettaires au niveau cutané, pulmonaire et cérébral.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Après une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent, s'activent et agrègent au site de lésion pour former un clou hémostatique qui limite le saignement. Elles sont également impliquées dans la thrombose artérielle, à l'origine de pathologies graves comme l'infarctus du myocarde ou l'AVC ischémique. La thrombose artérielle est aujourd'hui traitée et prévenue par des médicaments antiagrégants plaquettaires qui ont montré leur efficacité pour réduire la mortalité des pathologies thrombotiques. Cependant, la principale limite de ces traitements est l'augmentation du risque de saignement limitant leur utilisation dans certaines situations, comme l'AVC ischémique, pour lequel le risque de transformation hémorragique est élevé et peut avoir de graves conséquences pour le patient. Identifier de nouvelles cibles antiplaquettaires plus sûres pourrait réduire le risque de saignement tout en conservant l'effet antithrombotique.

L'objectif de mon projet de thèse a été de mieux caractériser le rôle de la GPVI et des intégrines plaquettaires en hémostase, en thrombose artérielle et dans l'arrêt de saignements en conditions inflammatoires, avec comme perspective l'identification de nouvelles cibles antithrombotiques potentiellement plus sûres. Les résultats obtenus indiquent : i) l'existence d'une différence d'espèce entre l'Homme et la souris quant au rôle de la GPVI dans la croissance et la stabilité du thrombus ; ii) un rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes en condition de flux sur une surface de fibronectine et de collagène sans rôle majeur de cette intégrine en hémostase et en thrombose artérielle; et iii) un rôle des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ plaquettaires dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires au niveau cutané, pulmonaire et cérébral.

La GPVI est le principal récepteur d'activation des plaquettes au collagène (Nieswandt and Watson, 2003; Nieswandt et al., 2001a). L'identification d'une interaction entre la GPVI et le fibrinogène (Ahmed et al., 2020; Mangin et al., 2018), m'a conduit à évaluer son importance dans la thrombose artérielle *in vivo*. Il a d'abord été entrepris de confirmer les résultats obtenus *in vitro* chez l'Homme. Une retombée inattendue de ce travail a été l'identification d'une différence d'espèce entre l'Homme et la souris quant au rôle de la GPVI dans la croissance et la stabilité des thrombi. En effet, la GPVI de souris ne joue pas, contrairement à la GPVI humaine (Mangin et al., 2018), un rôle clé dans la croissance des thrombi lorsque l'implication du collagène est limitée, puisque la croissance des thrombi se fait sur ceux préformés, sans

interaction avec le collagène sous-jacent. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus *in vivo* quelques années plus tôt dans un modèle de thrombose artérielle induite par une lésion au chlorure de fer de l'artère carotide, que l'on sait ne pas exposer de collagène et qui ne met pas en évidence un rôle de la GPVI (Eckly et al., 2011). En ce qui concerne la stabilité des thrombi, nous avons mis en évidence qu'elle est augmentée chez l'Homme et ce grâce à la GPVI humaine. L'explication de cette différence provient fort probablement de l'incapacité des plaquettes de souris à s'activer *via* l'interaction entre la GPVI et le fibrinogène (Mangin et al., 2018). Nous avons ensuite confirmé que la GPVI de souris ne joue pas de rôle dans la stabilité des thrombi, puisque cette dernière n'est pas réduite chez les souris déficientes pour la GPVI. Chez la souris, une signalisation indépendante de la GPVI permet donc de maintenir un degré d'activation plaquettaire suffisant pour assurer la stabilité du thrombus, notamment par l'intermédiaire des récepteurs P2Y₁₂ et TP.

L'identification d'une différence d'espèce entre l'Homme et la souris liée au rôle de la GPVI dans la formation d'un thrombus est importante car deux agents anti-GPVI sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques. Le premier est un fragment humanisé d'anticorps bloquant la GPVI, ACT017 également appelé Glenzocimab, et le second est une molécule composée de deux domaines extracellulaires de la GPVI reliés au fragment Fc d'un IgG formant une GPVI-Fc, qui mime la GPVI, appelée Revcept. Ces deux molécules sont actuellement en essai de phase 2 chez des patients présentant un AVC ischémique aigu ou une insuffisance coronarienne stable devant subir une intervention percutanée (NCT03803007 ; NCT03312855 ; NCT01645306). La différence d'espèce que j'ai identifiée suggère que le rôle de la GPVI dans la formation d'un thrombus aurait été sous-estimé sur la base des essais réalisés dans la souris où la GPVI ne permet pas l'activation des plaquettes en réponse au fibrinogène. Il est donc envisageable que les nouveaux antiplaquettaires en développement ciblant la GPVI soient plus efficaces chez l'Homme que ce que laissent présumer les études précliniques chez la souris. Cette différence d'espèce s'ajoute à d'autres déjà identifiées au niveau plaquettaire, comme la taille et le compte plaquettaires, leur demi-vie (Schmitt Exp Hematol 2001), l'hétérogénéité du nombre et du contenu des granules plaquettaires (Eckly et al., 2016), et la différence de réponse à certains agonistes comme l'ADP (Ware, 2004). Il est important d'en tenir compte avant toute extrapolation des données chez l'Homme, sachant que les souris sont très largement employées pour étudier le rôle des plaquettes en hémostase et en thrombose.

Quel serait l'intérêt de développer un agent qui cible spécifiquement l'interaction entre la GPVI et le fibrinogène ? Bien que le développement d'un tel antagoniste aurait un intérêt sur le plan cognitif en vue de discriminer l'importance relative de l'interaction entre la GPVI et le collagène *versus* la GPVI et le fibrinogène, son intérêt thérapeutique paraît discutable. En effet, le ciblage sélectif de l'interaction GPVI/fibrinogène a peu de chance de diminuer d'avantage un risque hémorragique qui est déjà minime en absence de ce récepteur. Enfin, sur le plan de l'efficacité antithrombotique, il est probablement plus intéressant de disposer d'un agent qui limite l'interaction avec l'ensemble des ligands de la GPVI, qui pourrait améliorer d'avantage l'effet antithrombotique de ceux bloquant l'interaction de la GPVI avec le collagène, mais il serait intéressant de tester ces hypothèses avec des approches expérimentales.

Les antiagrégants plaquettaires utilisés en clinique ciblent principalement les étapes d'activation et d'agrégation des plaquettes. Une piste poursuivie par plusieurs équipes serait de développer des antiplaquettaires ciblant l'interaction des plaquettes avec la matrice extracellulaire, une étape intervenant tôt dans le processus thrombotique. Ces interactions plaquettes – matrice extracellulaire impliquent en majorité les intégrines de la famille $\beta 1$ (Bergmeier and Hynes, 2012). Parmi celles-ci, on trouve les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ qui jouent un rôle en thrombose artérielle (He et al., 2003a; Kuijpers et al., 2003; Schaff et al., 2013), mais dont l'implication en hémostasie est modeste (Habart et al., 2013; Schaff et al., 2013), en faisant de nouvelles cibles antiplaquettaires potentiellement intéressantes. Pour sa part, l'importance de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en hémostasie et en thrombose artérielle n'avait jamais été évaluée, ce qui a constitué le deuxième axe de mon projet de thèse. J'ai mis en évidence que les souris n'exprimant pas l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ spécifiquement au niveau plaquettaire présentent un temps de saignement qui n'est pas modifié. Cette observation vient compléter celles déjà publiées montrant également des temps de saignement normaux chez les souris déficientes pour l' $\alpha 2\beta 1$ et l' $\alpha 6\beta 1$ au niveau plaquettaire (Habart et al., 2013; Schaff et al., 2013). Etant donné que les souris déficientes pour les trois intégrines $\beta 1$ ont un temps de saignement augmenté, il est fort probable que ces trois récepteurs présentent une compensation fonctionnelle importante permettant de maintenir l'interaction des plaquettes avec la matrice extracellulaire et donc le processus hémostatique même en l'absence de l'un d'entre eux (Petzold et al., 2013).

Dans ce deuxième projet, nous avons mis en évidence que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ plaquettaire est impliquée dans l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes *in vitro* sur une surface de fibronectine cellulaire fibrillaire. Cependant, notre étude n'a pas permis de montrer de rôle majeur de cette intégrine dans des modèles de thrombose artérielle *in vivo*. Cette discordance entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* pourrait s'expliquer par les modèles utilisés. D'une part, le modèle de perfusion *in vitro* évalue l'adhérence et l'activation des plaquettes exclusivement sur une protéine adhésive à la fois, ici la fibronectine, c'est-à-dire le ligand d' $\alpha 5\beta 1$, ce qui maximise les chances d'observer un effet et peut exagérer l'importance du récepteur par rapport à une situation *in vivo* dans laquelle une matrice complexe est exposée. D'un autre côté, une des limites des modèles *in vivo* que j'ai utilisés est que nous n'avons pas vérifié l'exposition de fibronectine au niveau des lésions vasculaires. L'absence d'exposition ou une exposition de faible quantité de cette protéine pourrait expliquer pourquoi aucun effet inhibiteur n'est constaté *in vivo*.

En plus du rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'agrégation des plaquettes sur une surface de fibronectine, nous avons également observé un défaut d'agrégation sur une surface de collagène en flux. Cette observation est surprenante puisque l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ne lie pas directement le collagène. Ceci suggère que le défaut pourrait intervenir dans la phase de croissance du thrombus plutôt que dans l'étape initiale d'adhérence et d'activation sur du collagène. On peut imaginer un rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la croissance du thrombus par sa capacité à interagir avec de la fibronectine plasmatique qui s'incorpore dans le thrombus. Cette hypothèse serait en accord avec le travail de Heyu Ni qui montre que les souris déficientes à la fois pour le FW et pour le fibrinogène, forment des thrombi, probablement *via* la fibronectine (Ni et al., 2000).

Une deuxième limite de mon étude de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est que nous avons réalisé nos modèles de thrombose sur des vaisseaux sains, qui ne reflètent pas parfaitement la situation pathologique retrouvée chez l'Homme. En effet, la thrombose artérielle survient généralement dans un vaisseau malade après érosion ou rupture d'une plaque d'athérosclérose. Ces plaques sont d'ailleurs décrites pour être riches en fibronectine (Rohwedder et al., 2012), qui serait exposée au sang circulant suite à la rupture de la plaque. Pour reproduire au mieux la pathologie, des modèles de thrombose ont été mis au point chez des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}), qui développent des plaques d'athérosclérose (Nakashima et al., 1994), après rupture de plaque par une aiguille ou par des ultrasons (Hechler and Gachet, 2011a; Kuijpers et al., 2009). Avant de conclure sur l'absence de rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ plaquettaire en thrombose

artérielle, il serait nécessaire de réaliser ces modèles de thrombose sur plaque sur une nouvelle lignée après croisement des souris ApoE^{-/-} et déficientes pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ plaquettaire. Cette approche permettrait d'évaluer le rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la thrombose artérielle et d'ouvrir une perspective de développement d'antiplaquettaire ciblant l' $\alpha 5\beta 1$.

Une situation inflammatoire peut induire un risque hémorragique qui peut avoir des conséquences dramatiques si le saignement se développe au niveau cérébral. Au niveau moléculaire, l'arrêt de ces saignements inflammatoires a été décrit pour être indépendant des récepteurs classiquement impliqués en hémostase suite à une lésion traumatique, à savoir le complexe GPIb-IX-V et l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (Goerge et al., 2008). Dans ce contexte, mes travaux de thèse visaient à évaluer l'implication d'autres intégrines plaquettaires dans l'arrêt de ces saignements, en se focalisant notamment sur les intégrines $\beta 1$ qui n'avaient pas été étudiées, et à réviser le rôle des intégrines $\beta 3$ plaquettaires. Ce travail m'a permis d'identifier un rôle des intégrines $\beta 3$ plaquettaires dans l'arrêt des saignements en condition inflammatoire au niveau cutané puisque nous avons mis en évidence dans le modèle de rpA cutané l'apparition de saignements chez les souris déficientes spécifiquement pour les intégrines $\beta 3$ plaquettaires. A priori, ce résultat semble aller à l'encontre de ce qui a été publié en 2008, à savoir que les intégrines $\beta 3$ ne sont pas impliquées dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires (Goerge et al., 2008). Cependant, dans cette étude de 2008, c'est une souris déficiente pour les intégrines $\beta 3$ dans l'ensemble des tissus et cellules qui avait été utilisée, résultat que nous confirmons d'ailleurs en utilisant ces mêmes souris qui ne saignent pas dans le modèle de rpA cutané.

La raison pour laquelle nous observons des saignements chez les souris déficientes pour les intégrines $\beta 3$ spécifiquement au niveau des plaquettes, mais pas chez celles totalement déficientes pour ces intégrines, n'est pas encore tout à fait claire. Nous savons que les neutrophiles expriment des intégrines $\beta 3$ (Janardhan et al., 2012) et que ces dernières sont impliquées dans des fonctions comme la migration et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (Kim et al., 2014; Rainger et al., 1999). Notre hypothèse est que dans un KO total de l'intégrine $\beta 3$, les neutrophiles ne seraient pas capables de transmigrer et n'induiraient donc pas de lésion de la paroi vasculaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé un modèle de chambre d'observation dorsale couplé à de la microscopie intravitale permettant de suivre en temps réel la réaction inflammatoire cutanée, dans le but d'évaluer l'extravasation des

neutrophiles hors du système vasculaire chez les souris PF4Cre- $\beta 3$ et $\beta 3^{-/-}$. Nos premiers résultats semblent mettre en évidence une réduction de la transmigration des neutrophiles chez les souris totalement déficientes pour les intégrines $\beta 3$, venant ainsi conforter notre hypothèse. Ces résultats restent cependant à confirmer sur un nombre de souris plus important. Si cette réduction de transmigration des neutrophiles se confirme, nous ne pourrions cependant pas exclure que ce phénomène soit dû à une modification des interactions des cellules endothéliales entre elles, puisqu'elles expriment également des intégrines $\beta 3$. Pour éliminer cette hypothèse moins probable, nous envisageons d'utiliser des souris déficientes pour les intégrines $\beta 3$ uniquement à la surface des neutrophiles en croisant des souris dont le gène de l'intégrine $\beta 3$ est encadré par des sites lox avec des souris exprimant la Cre-recombinase sous promoteur du gène codant Ly6G, spécifique des neutrophiles.

Au cours de l'évaluation du rôle des intégrines plaquettaires dans l'arrêt des saignements en situation inflammatoire, une question reste en suspens. Nous avons observé des saignements en conditions inflammatoires au niveau de la peau chez les souris PF4Cre- $\beta 3$, mais pas chez celles traitées avec un inhibiteur de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$, appelé eptifibatide (Integrilin[®]), ciblant pourtant spécifiquement les plaquettes. Il est possible que l'inhibition de ce récepteur soit incomplète, en effet chez la souris il faut utiliser des doses importantes de cet inhibiteur pour atteindre une efficacité et une inhibition de l'agrégation plaquettaire. De plus, l'eptifibatide présente une stabilité limitée *in vivo*, alors que nous observons un phénomène évoluant sur 4 heures. Enfin, dans le cas des saignements en conditions inflammatoires, seule une thrombopénie très sévère induit des saignements (Goerge et al., 2008) laissant imaginer que seul un inhibiteur ayant un impact important sur les plaquettes permettrait de mettre en évidence un saignement.

Pour conclure, mes travaux s'inscrivent dans une perspective globale de caractérisation du rôle des récepteurs plaquettaires en hémostase et en thrombose et d'identification de nouvelles cibles antiplaquettaires plus sûres. Le ciblage de la GPVI, pour lequel deux agents sont actuellement en développement, semble prometteur d'autant plus que l'identification d'une différence d'espèces Homme vs souris laisse penser que les effets chez l'Homme pourraient être plus importants que ceux initialement observés en préclinique. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ joue un rôle important dans l'adhérence, l'activation et l'agrégation plaquettaire à la fibronectine, et même si les modèles de thrombose artérielle sur vaisseaux sains n'ont pas conduit à

l'identification d'un rôle majeur dans ce processus, l'identification d'un modèle se rapprochant de la physiopathologie retrouvée chez l'Homme pourrait conduire à l'identification d'un rôle de cette intégrine. Enfin, la mise en évidence d'un rôle des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ plaquettaires dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires confirme que le ciblage des intégrines $\beta 3$ s'accompagne d'un risque de saignement important.

ANNEXE

BASIC SCIENCES

Pharmacological Blockade of Glycoprotein VI Promotes Thrombus Disaggregation in the Absence of Thrombin

Muhammad Usman Ahmed, Valeria Kaneva, Stéphane Loyau¹, Dmitry Nechipurenko, Nicolas Receveur¹, Marion Le Bris, Emily Janus-Bell, Mélusine Didelot, Antoine Rauch¹, Sophie Susen, Nabil Chakfé, François Lanza¹, Elizabeth E. Gardiner¹, Robert K. Andrews¹, Mikhail Panteleev, Christian Gachet¹, Martine Jandrot-Perrus, Pierre H. Mangin

OBJECTIVE: Atherothrombosis occurs upon rupture of an atherosclerotic plaque and leads to the formation of a mural thrombus. Computational fluid dynamics and numerical models indicated that the mechanical stress applied to a thrombus increases dramatically as a thrombus grows, and that strong inter-platelet interactions are essential to maintain its stability. We investigated whether GPVI (glycoprotein VI)-mediated platelet activation helps to maintain thrombus stability by using real-time video-microscopy.

APPROACH AND RESULTS: We showed that GPVI blockade with 2 distinct Fab fragments promoted efficient disaggregation of human thrombi preformed on collagen or on human atherosclerotic plaque material in the absence of thrombin. ACT017-induced disaggregation was achieved under arterial blood flow conditions, and its effect increased with wall shear rate. GPVI regulated platelet activation within a growing thrombus as evidenced by the loss in thrombus contraction when GPVI was blocked, and the absence of the disaggregating effect of an anti-GPVI agent when the thrombi were fully activated with soluble agonists. The GPVI-dependent thrombus stabilizing effect was further supported by the fact that inhibition of any of the 4 key immunoreceptor tyrosine-based motif signalling molecules, src-kinases, Syk, PI3K β , or phospholipase C, resulted in kinetics of thrombus disaggregation similar to ACT017. The absence of ACT017-induced disaggregation of thrombi from 2 afibrinogenemic patients suggests that the role of GPVI requires interaction with fibrinogen. Finally, platelet disaggregation of fibrin-rich thrombi was also promoted by ACT017 in combination with r-tPA (recombinant tissue plasminogen activator).

CONCLUSIONS: This work identifies an unrecognized role for GPVI in maintaining thrombus stability and suggests that targeting GPVI could dissolve platelet aggregates with a poor fibrin content.

GRAPHIC ABSTRACT: A graphic abstract is available for this article.

Key Words: fibrinogen ■ hemostasis ■ platelet ■ rheology ■ thrombosis

Platelets play a central role in hemostasis and in arterial thrombosis. Upon vascular injury platelets adhere, become activated and aggregate to form a hemostatic plug in a healthy vessel and a mural thrombus that can become occlusive, in a diseased artery.¹ It has been reported that the thrombus is heterogeneous in composition with (1) a core, rich in fibrin composed of highly activated platelets located close to the site of injury, in which important amounts of thrombin are generated; (2) a shell, in which

See accompanying editorial on page 1964

platelets are less activated and no significant amounts of thrombin are generated, as evidenced by the absence of fibrin.² From a therapeutic point of view, preventing the shell to grow or dissolving it appear as attractive strategies to prevent arterial occlusion and ischemic pathologies.

Platelets express a repertoire of adhesion receptors that engage with subendothelial adhesive matrix proteins

Correspondence to: Pierre H Mangin, Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMST, F-67065 Strasbourg, France. Email pierre.mangin@efs.sante.fr

The Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/ATVBAHA.120.314301>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 2141.

© 2020 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at www.ahajournals.org/journal/atvb

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

Fc	Fc receptor
GP	glycoprotein
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
r-tPA	recombinant tissue plasminogen activator
VWF	von Willebrand factor
WSR	wall shear rate

Highlights

- GPVI-mediated platelet activation is important to maintain the stability of a thrombus.
- Blocking anti-GPVI Fab fragments, but not dimeric GPVI-Fc, promote platelet disaggregation in a shear-dependent manner.
- The use of anti-GPVI agents which directly target GPVI could promote disaggregation of platelet rich thrombi

after vessel wall injury. Under conditions of elevated blood flow found in arteries, the first step of platelet attachment is initiated by the GP (glycoprotein) Ib-IX-V complex interaction with VWF (von Willebrand factor) present in the subendothelium. Stable adhesion is supported by integrins of the $\beta 1$ and $\beta 3$ family, namely $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 11\beta 3$, and $\alpha v\beta 3$ which bind to collagen, fibronectin, laminins, fibrinogen, and vitronectin, respectively. Concomitantly, these receptors together with the collagen receptor, GPVI (glycoprotein VI) initiate intracellular signals leading to platelet activation.³ Activated platelets release soluble mediators, including thromboxane (Tx)A₂ and ADP which reinforce platelet activation and increase the affinity of integrin $\alpha 11\beta 3$, for its main ligand, fibrinogen, allowing platelet aggregation.⁴ The thrombus composition is heterogeneous with a core containing highly activated platelets and a shell with weakly and reversibly activated platelets.² The specific signaling mechanisms responsible for maintenance of platelets in this state is unclear, potential candidates include GPIb (glycoprotein Ib)-dependent signalling,⁵ soluble agonists,^{2,6} and we recently proposed GPVI.⁷

GPVI is a member of immunoglobulin receptor family which is specifically expressed on megakaryocytes and platelets.³ GPVI is considered as not being critical for hemostasis, based on the fact that GPVI-deficient subjects present a mild bleeding phenotype and GPVI-deficient mice show no spontaneous bleeding and no prolongation in tail-bleeding time.⁸⁻¹⁰ In contrast, it has been reported that absence of GPVI impairs experimental thrombosis in several models of localized vascular injury.^{11,12} Remarkably, GPVI-immunodepleted mice were also protected from thrombosis after ultrasound or mechanical injuries to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice.^{13,14} Together, these observations suggest that GPVI is a particularly promising and potentially safe antithrombotic target.³

GPVI physically associates with the FcR(Fc receptor) γ -chain and the Src family kinases Lyn and Fyn.¹⁵ Ligand binding to GPVI promotes its clustering which results in phosphorylation of the immunoreceptor tyrosine-based motif of the FcR γ -chain by Src family kinases.¹⁶ This leads to the recruitment of Syk and formation of signaling complexes which activate PLC $\gamma 2$ (phospholipase

C $\gamma 2$) resulting in mobilization of intracellular Ca²⁺ stores, a key second messenger of platelets. GPVI engagement efficiently results in the release of soluble agonists such as ADP and TxA₂ which enhance platelet activation.¹⁷ GPVI is best recognized as a platelet activation receptor for fibrillar collagen and supports efficient platelet aggregation in vitro.¹⁷ We and others provided evidence that GPVI participates in platelet activation to laminins.^{18,19} We also reported that GPVI plays an important role in platelet adhesion and activation on fibrin.^{20,21} More recently, we proposed that human GPVI participates in platelet activation on immobilized fibrinogen, which could support a new role for GPVI in thrombus growth.⁷ The primary aim of this study was to investigate the role of GPVI beyond the well-documented initial stages, on the process of thrombus stability. The outcome of this study was to assess the potential of targeting this receptor in the setting of a treatment, when a thrombus had already formed.

We showed that growing thrombi experience elevated mechanical stress, which represents a major challenge to maintain their stability. We developed a numerical model which highlighted the importance of maintaining strong inter-platelet bonds to resist to the increase in mechanical stress when a thrombus grows. Using an experimental approach, we identified a key role of GPVI-mediated platelet activation in maintaining thrombus stability in the absence of thrombin, through its interplay with fibrinogen. These results indicate that targeting GPVI when a platelet-rich aggregate had already formed promotes disaggregation, opening new avenues for the use of anti-GPVI agents to prevent vessel occlusion. In addition, an anti-GPVI agent can also be combined to a thrombolytic agent to dissolve a fibrin-rich thrombus.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Two White patients suffering from congenital afibrinogenemia were collected for the study. The patients were related and expressed the same homozygous mutation c.1001 G>A in exon 5, resulting in a nonsense p.W334X mutation of FGA (fibrinogen A) gene, previously reported to lead to premature termination of translation of fibrinogen α chain.²² For these 2 patients, plasma

fibrinogen was undetectable by antigen and functional assays with unclottable prothrombin, activated partial thromboplastin, thrombin time, and reptilase time tests. Both patients suffered from spontaneous and post-traumatic bleeds but also had a past history of arterial or venous thromboembolism (ischemic stroke in patient 1, 2 episodes of superficial venous thrombosis, and 1 episode of deep venous thrombosis in patient 2; the 3 venous thrombosis events in patient 2 occurred under replacement therapy with fibrinogen concentrate) as reported previously.²³ At the time of the study, the 2 patients were treated on demand with fibrinogen concentrates. No infusion of fibrinogen concentrate was performed in the previous 21 days before blood collection. The collection was approved by the French government under the number: DC-2008-642.

Computational Fluid Dynamics and Fluid-Structure Interaction Analysis

To assess the evolution of mechanical stress during thrombus growth, we used computational fluid dynamics combined with additional fluid-structure interaction analysis. Thrombi were represented as the hemi-spheres protruding into vessels of 600 μm diameter. Constant pressure boundary conditions were chosen for the blood flow corresponding to a wall shear rate (WSR) of 300 s^{-1} . Subendothelial matrix and thrombus were represented as isotropic elastic media with Young modulus value derived from thrombus nanoindentation analysis,²⁴ while blood was considered as a Newtonian fluid. A fluid-structure interaction module of Comsol Multiphysics was used for computation of flow and flow-induced mechanical stress throughout the system. See Figure I and Table I in the Data Supplement for more details.

Computational Model of Thrombus Formation

We developed a 2-dimensional model of thrombus formation with platelets represented by particles of different sizes.²⁵ The model considers 2 types of inter-platelet interaction: (1) a primary GPIIb-VWF-mediated interaction, modelled by stochastically associating and disassociating springs between platelets; the model was validated using experiments addressing platelet interactions with VWF-coated surfaces²⁶; (2) an $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -fibrinogen-mediated interaction modelled by Morse potential. Parameters of potential were acquired using experimental data on forces between single platelets.²⁷ The adhesive force increases with the time platelets spend in the thrombus. To study thrombus dynamics during the initial phase of thrombus growth, we decreased integrin-mediated force between platelets by 10% to 80%. Blood was considered as an incompressible Newtonian fluid described with Navier-Stokes and the continuity equations. The flow field was computed considering the partial vessel blockade by the thrombus. Equations describing both the flow profile and hydrodynamical forces that act on platelets were solved using the Open-FOAM (field operation and manipulation) simpleFoam solver.²⁸ To infer how inter-platelet forces depend on both thrombus size and shear rate, the stationary configuration of tightly (hexagonally) packed equally sized disks under steady flow was analyzed. Disks, which represented platelets, were gathered in a semi-spherically shaped thrombus. To simplify the analysis, only Morse potential was used to describe platelet-platelet attraction. Injury was modelled as the array of adhesive interaction sites localized at the vessel wall.

In Vitro Flow-Based Adhesion Assay

Microfluidic flow chambers or glass microslides (for scanning electron microscopy experiments) were prepared as previously described.²⁹ For most experiments, human hirudinized blood (100 U/mL) was perfused through the microfluidic channels, with the exception of flows on plaque material for which we used nonrecalcified citrated blood. The human atherosclerotic plaque homogenates (1 mg/mL) prepared as previously described.³⁰ To form fibrin-rich clots, citrated blood incubated with DIOC₆ (0.5 $\mu\text{mol/L}$) to label platelets and with DyLight 650-conjugated anti-fibrin (10 $\mu\text{g/mL}$) was recalcified with CaCl_2 (12.5 mmol/L) and MgCl_2 (3.5 mmol/L) immediately before perfusing it through collagen coated microfluidic chambers at 1500 s^{-1} . Disaggregation of a thrombus was defined as the detachment of at least 3 platelets or more in a field.

Light Transmission Aggregometry

Human washed platelets were prepared from ACD-anticoagulated blood by sequential centrifugation as previously described.³¹ The platelets were suspended at a concentration of $3 \times 10^5/\mu\text{L}$ in Tyrode buffer containing 0.35% human serum albumin and 2 $\mu\text{L/mL}$ apyrase. Platelet aggregation was measured turbidimetrically after addition of different agonists, in the presence of human fibrinogen (0.8 mg/mL).

Scanning Electron Microscopy

Adherent platelets in glass microslides were fixed for 45 minutes with 25 mg/mL glutaraldehyde in 0.1 mol/L cacodylate buffer containing 20 mg/mL sucrose (305 mOsm, pH 7.3) and scanning electron microscopy was performed as previously described.⁵

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. All statistical analyses were performed with the GraphPad Prism program, version 5.0 (Prism, GraphPad, LaJolla, CA). Nonparametric Mann-Whitney *U* test was used when applicable, and χ^2 test with CI of 95% was used for categorical variables. One-way ANOVA or 2-way ANOVA followed with a post hoc Bonferroni was used for multiple comparisons. $P < 0.05$ were considered statistically significant. Details are found in the figure legends.

RESULTS

Blood Flow-Induced Mechanical Stress Challenges the Stability of a Growing Thrombus

A mural thrombus in an injured artery experiences forces applied by the flowing blood. Computational fluid dynamics simulations indicated that surface shear stress was maximal at the thrombus apex and increases with thrombus height (Figure 1A through 1C). These external stress acting on the surface is redistributed throughout the thrombus and results in internal mechanical stress. Fluid-structure interaction analysis performed using the continuous 3-dimensional model indicated that internal mechanical stress (von Mises stress) was maximal at the

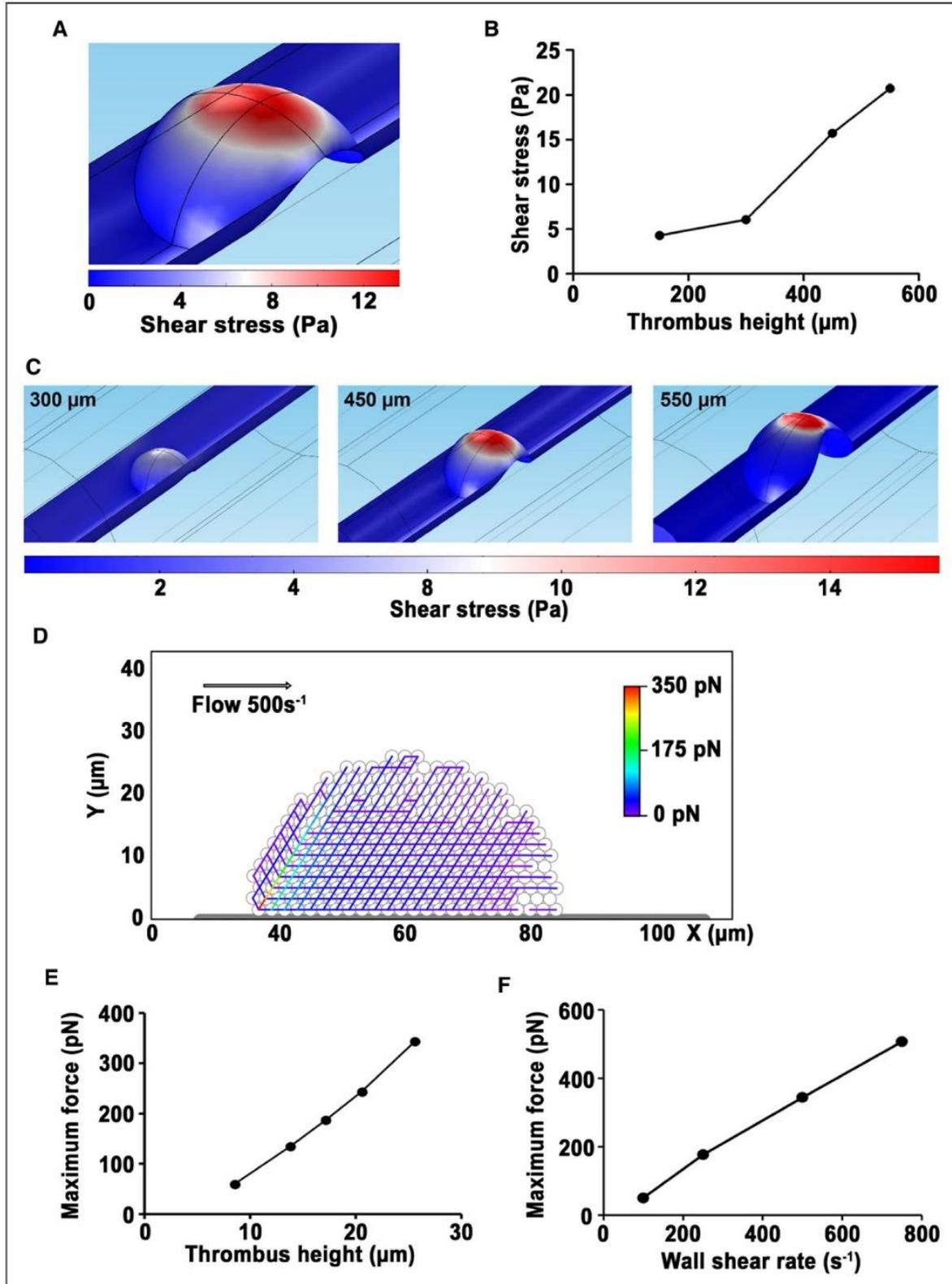


Figure 1. In silico evidence that sustained platelet activation is crucial for the stability of a growing thrombus. **A–C,** Computational fluid dynamics simulations were performed to determine surface shear stress exerted on a semi-spherical thrombi of different sizes. **A,** Image representing the distribution of the shear stress on the surface of thrombi of 450 μm at flow conditions corresponding to wall shear rates of 300 s⁻¹ (at sites distal to thrombus). **B,** Point-connecting line graph represents the shear stress as a function of thrombus height at constant pressure drop boundary conditions. **C,** Images represent the distribution of the shear stress on the surface of thrombi of 300 μm, 450 μm, and 550 μm height in a channel of 600 μm at constant pressure drop boundary conditions. **D,** Distribution of inter-platelet forces in a 2-dimensional (2D) thrombus subjected to the flow corresponding to 500 s⁻¹. (Continued)

Downloaded from <http://ahajournals.org> by on December 24, 2020

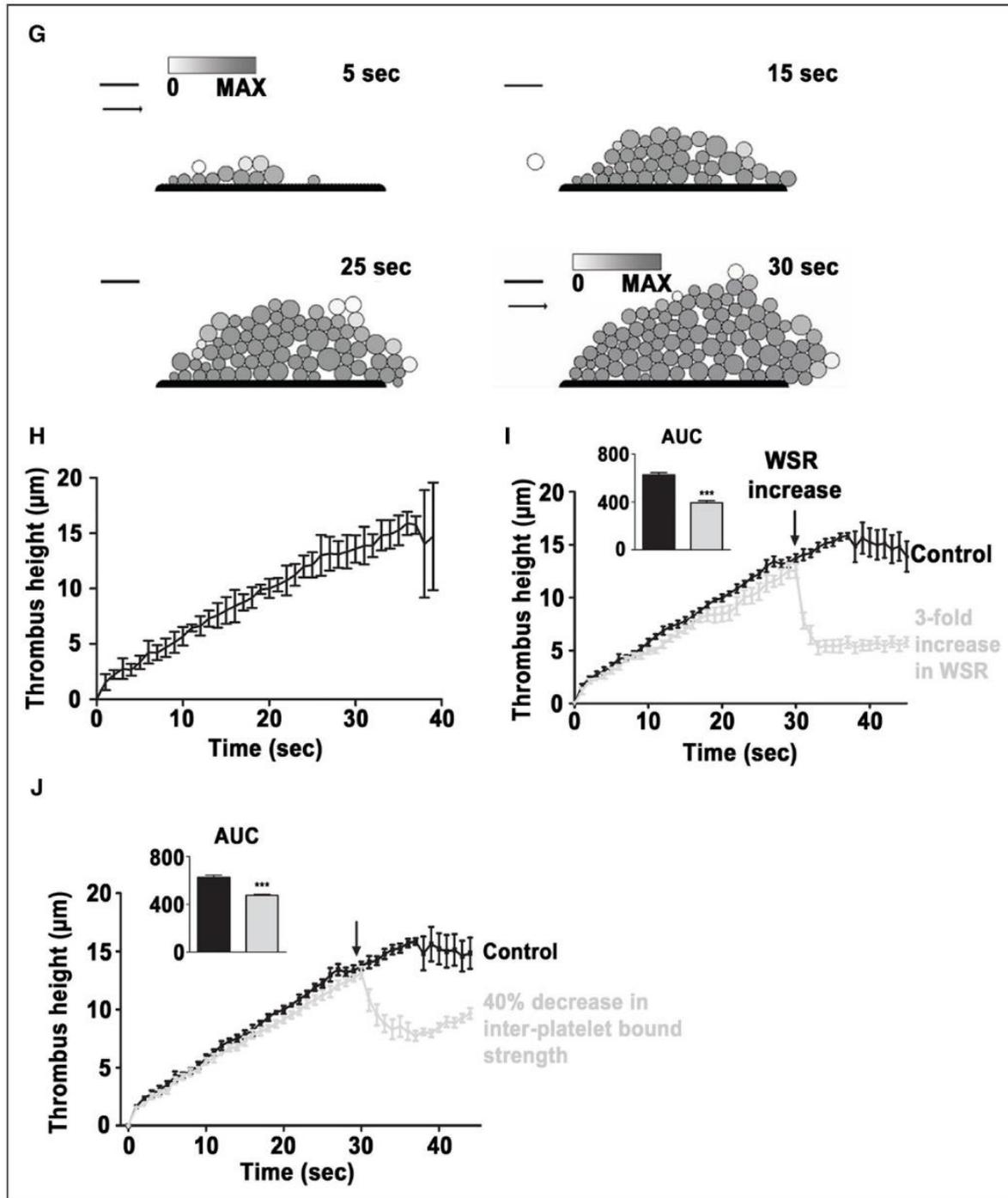


Figure 1 Continued. Each inter-platelet force is shown as a line colored corresponding to the force value. Only forces corresponding to extended inter-platelet bonds are shown. Platelets contours are shown in gray color. **E**, The dependence of maximum inter-platelet bond extension force on thrombus height obtained in a 2D model (wall shear rate [WSR] of 500 s^{-1}). **F**, The dependence of maximum inter-platelet bond extension force on a wall shear rate obtained for 2D thrombus of $26 \mu\text{m}$ height. **G**, Representative images of the dynamics of thrombus formation in silico. The injury region is shown in black; platelets are represented by circles of different colors (darkening color reflects the extent of platelet activation). WSR is 750 s^{-1} ; arrow indicates flow direction. Scale bar represents $5 \mu\text{m}$. **H–J**, The graphs plot thrombus height over time at 750 s^{-1} . **I**, The arrow represents the time at which a 3-fold increase in WSR was applied (**H** and **I**; $n=6$). **J**, The arrow represents the time at which the force between platelets was reduced by 40% ($n=10$). Bar graph represents area under curve (AUC). Nonparametric Mann-Whitney U Test; *** $P < 0.001$.

thrombus base and was also increased with both thrombus height and blood flow velocities (Figure I in the Data Supplement). Similar results were obtained in a particle-based 2-dimensional model showing that inter-platelet

forces within a thrombus were maximal at its base reaching elevated values of 350 pN for a thrombus of $26 \mu\text{m}$ in height and increased with thrombus height and WSR (Figure 1D through 1F). Together, these results indicate

that both flow-dependent surface forces and internal platelet-platelet forces increase as a mural thrombus is growing in the vessel lumen. To assess the impact of flow-induced mechanical forces during thrombus growth, we developed a numerical particle-based model of thrombus formation dynamics which reproduces rheology found in arteries (750 s^{-1}). This model recapitulates the main features of thrombosis with (1) platelet adhesion, (2) platelet activation depicted as they become darker (various levels of activation ranging from white (resting) to grey (activated), and (3) recruitment of circulating platelets which results in linear thrombus growth (Figure 1G and 1H; Movie I in the Data Supplement). The impact of elevated shear on thrombus stability was evidenced by the disruption of the thrombus occurring when a 3-fold increase in shear rate was applied at 30 seconds, (Figure 1I; Movie II in the Data Supplement). The importance of the inter-platelet bond strength in maintaining thrombus stability was shown by disaggregation taking place when the inter-platelet force was reduced by 40% at 30 seconds (Figure 1J; Movie III in the Data Supplement). This disaggregation highlighted the importance of a sustained platelet activation during thrombus growth to maintain its integrity. As GPVI is an activation receptor, we investigated whether it participates in maintaining thrombus ability to resist mechanical stress and whether its targeting could promote disaggregation.

Blockade of GPVI During Thrombus Growth Promotes Disaggregation in the Absence of Thrombin

Hirudinated human whole blood was flowed over collagen to preform aggregates followed by perfusion of $50 \mu\text{g/mL}$ of a blocking humanized anti-GPVI Fab fragment, ACT017, at an arterial WSR of 750 s^{-1} . Real-time video-microscopy showed that numerous individual platelets detached from the top of aggregates treated with ACT017 resulting in a clear disaggregation (Figure 2A; Movie IV in the Data Supplement). Quantification indicated a 4.9-fold increase in the number of platelet thrombi disaggregating after treatment with ACT017 when compared with control buffer (Figure 2B). ACT017 also lowered the time to initiation of disaggregation by 45% (Figure 2C). The disaggregating effect of ACT017 was also evidenced when we maintained whole blood perfusion throughout the experiment (Movie V in the Data Supplement) and was not limited to hirudin as an anticoagulant, as a similar result was obtained with heparin and citrate (data not shown). Similar results were obtained on human atherosclerotic plaque material, where ACT017 promoted efficient disaggregation of platelet thrombi that were formed with citrated blood (Figure 2D). This disaggregation obtained by blocking GPVI was not restricted to ACT017, as another GPVI blocker, the Fab fragment of 1G5 mAb exhibited similar

effects (Figure 2E). In contrast, thrombi did not disaggregate when equivalent concentrations of Fab fragments of the nonblocking anti-GPVI antibody 3J24 were perfused, suggesting that the inhibitory effect of ACT017 and 1G5 is related to their ability to disrupt ligand binding to GPVI (Figure 2F and 2G). Finally, we observed that soluble GPVI-Fc, used at a concentration which inhibits collagen-induced platelet aggregation, did not disaggregate preformed aggregates (Figure 2F and 2G). Together, these results indicate that direct blockade of GPVI ligand binding, but not a competition approach, promotes disaggregation of preformed platelet thrombi, highlighting a novel role of GPVI in maintaining the stability of a thrombus during its build-up when thrombin generation was blocked. In the rest of our study, we have mainly used ACT017 as an agent that directly blocks GPVI.

Shear Forces Promote Disaggregation of Platelet Aggregates When GPVI Is Blocked

We next evaluated whether ACT017 promotes disaggregation in a Born-type aggregometer. Washed human platelets were stimulated with collagen, U46619 or ADP, and ACT017 was added to the suspension once aggregation reached maximal values. We did not observe any disaggregation upon the addition of ACT017 (Figure 3A). Because shear is low in an aggregometer ($<100 \text{ s}^{-1}$), one hypothesis could be that ACT017-induced platelet disaggregation occurring in the blood perfusion assay depends on the presence of elevated shear forces. To examine that, we preformed aggregates in the flow system at 750 s^{-1} for 3 minutes and perfused ACT017 at WSR ranging from 150 s^{-1} up to 750 s^{-1} . In agreement with the result obtained in the light transmission aggregometer, ACT017 did not promote disaggregation of platelet thrombi under venous blood flow conditions (150 s^{-1}), (Figure 3B). In contrast, signs of disaggregation were observed at an arterial WSR of 300 s^{-1} with a maximal number of disaggregating thrombi being achieved at 750 s^{-1} (Figure 3B and 3C). Measuring the initial time of thrombus disaggregation further highlighted the importance of increasing blood flow conditions on ACT017-induced platelet thrombus disaggregation (Figure 3D). These results are in agreement with our observations *in silico* showing that elevated shear forces promote disaggregation when platelet activation is inhibited.

The Disaggregating Effect of GPVI Blockade Relies on the Inhibition of Platelet Activation

As GPVI is an activation receptor, we hypothesized that ACT017-induced disaggregation in the absence of thrombin, is linked to an impairment of GPVI-mediated platelet activation in the growing thrombus. To test this hypothesis,

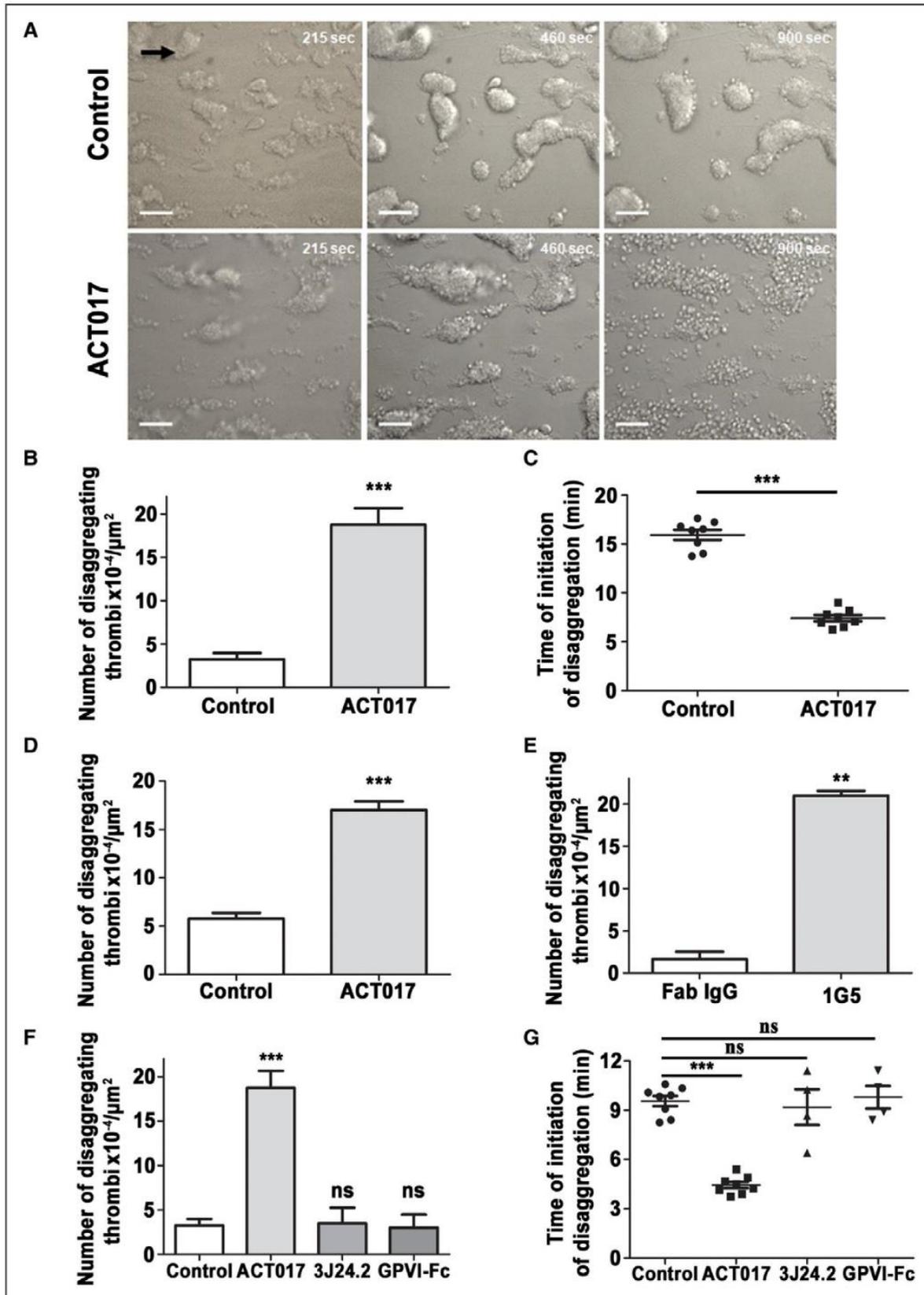


Figure 2. GPVI (glycoprotein VI) blockade promotes disaggregation of preformed thrombi in vitro. A–C and E–G, Hirudinized (100 U/mL) human whole blood was perfused for 3 min at 750 s⁻¹ through microfluidic flow chambers coated with a solution of type I fibrillar collagen (200 μg/mL) to preform aggregates. A–C, ACT017 (50 μg/mL) or control buffer was perfused over the preformed aggregates at 750 s⁻¹ for 12 min. A, Representative differential interference contrast microscopy images of thrombi subjected to ACT017 or control buffer diluted in PBS. The black arrow indicates the flow direction. Scale bars represent 20 μm. (Continued)

we perfused elevated nonphysiological concentrations of soluble agonists (ADP or TRAP [thrombin receptor activator peptide]) over preformed aggregates to maximally activate platelets and overcome the GPVI activatory pathway, before injecting ACT017. We observed that under such conditions ACT017 was less efficient in promoting disaggregation and that the time of disaggregation was delayed, indicating that its effect is linked to the regulation of platelet activation (Figure 4A and 4B). In parallel, we examined thrombus contraction in real-time, as a readout of platelet activation. While thrombi were contracting and appeared more compact over time in the control, a clear loosening and surface expansion was observed when ACT017 was perfused over contracted thrombi (Figure 4C; Movie VI in the Data Supplement). This was confirmed by quantification which showed that the surface occupied by the ACT017-treated thrombi was significantly increased in comparison with untreated control (Figure 4D). Scanning electron microscopy images confirmed the loosening of the aggregates treated with ACT017 and showed that individual platelets were also less contracted when compared with control, confirming that ACT017 impairs platelet activation (Figure 4E). As GPVI promotes platelet activation through a signaling pathway that has been well characterized, we evaluated the effect of inhibitors of several key immunoreceptor tyrosine-based motif signaling proteins such as src-kinase (PP2), Syk (PRT060318), PI3K β (phosphoinositide 3-kinase; TGX-221), and PLC γ 2 (U73122). The inhibitors increased the number of disaggregating thrombi by 3.6-fold, 2.6-fold, 2.2-fold, and 4.4-fold, respectively, to a similar level as the once achieved with ACT017 (Figure 4F). Moreover, the initial time of thrombus disaggregation also showed a significant decrease for all 4 inhibitors when compared with control which was very close to the one of ACT017 (Figure 4G). The number of disaggregating thrombi and time of initiation of disaggregation were very similar between ACT017 and 1G5 (Figure 2) as compared with inhibition of the 4 immunoreceptor tyrosine-based motif signaling molecules, suggesting that disaggregation occurring when GPVI is blocked, relies on an impairment of GPVI-mediated platelet activation.

Disaggregation Induced When GPVI Is Blocked Relies on the Presence of Fibrinogen

We recently proposed that the role of GPVI in thrombus build-up relies on its ability to promote platelet activation on fibrinogen.⁷ To evaluate whether thrombus disaggregation occurring when GPVI is blocked, is linked to this property, we performed experiments with blood of 2 patients with congenital afibrinogenemia. We observed that perfusion of hirudinized whole blood of both patients over immobilized collagen resulted in the formation of thrombi at 750 s⁻¹, even though they appeared smaller than the control (Figure 5A). This was expected since platelet aggregation in the absence of significant levels of fibrinogen has been previously reported and shown to rely on VWF.³² While ACT017-induced thrombus disaggregation in the control, little effect was observed on thrombi of either patient at 750 s⁻¹ (Figure 5B). This result indicates that blockade of GPVI has no impact on thrombus disaggregation in the absence of normal levels of fibrinogen, even though these thrombi appeared looser than normal thrombi in agreement with a previous report.³³ Quantification confirmed the absence of ACT017-induced disaggregation with blood from the patients as compared with controls (Figure 5C). These results propose the existence of a link between fibrinogen and GPVI in allowing the stability of a growing thrombus.

Combination of ACT017 and r-tPA Promotes Disaggregation of Fibrin-Rich Clots In Vitro

So far, we observed that GPVI contributes to the stabilization of a platelet-rich thrombus which contains no fibrin, suggesting that anti-GPVI agents could remove the part of the thrombus corresponding to the shell.³⁴ We next evaluated whether blockade of GPVI has also an impact on a thrombus core in which thrombin is found and which is stabilized by fibrin. Initially, we formed fibrin-rich thrombi by perfusing recalcified citrated human blood over collagen at 1500 s⁻¹. The high fibrin content of the thrombi was evidenced on 3-dimensional reconstructed images obtained with a fluorescently conjugated anti-fibrin antibody (Figure 6A). ACT017 had a minor effect on thrombus disaggregation with detaching platelets being mainly localized

Figure 2 Continued. B, Bar graphs represent the number of disaggregating thrombi ($\times 10^{-4}$)/ μm^2 ; control: $3.2 \times 10^{-4} \pm 0.7 \times 10^{-4}$ disaggregating thrombi/ μm^2 ; ACT017: $18.7 \times 10^{-4} \pm 1.9 \times 10^{-4}$ disaggregating thrombi/ μm^2 ; *** $P < 0.001$, n=8. **C,** Scatter plots represent the time at which disaggregation was initiated, expressed in minutes; mean \pm SEM; nonparametric Mann-Whitney *U* Test; control: 9.6 ± 0.3 min; ACT017: 4.4 ± 0.1 min; *** $P < 0.001$, n=8. **(D)** Citrated (3.2%) human whole blood was perfused for 4 min at 300 s⁻¹ through glass microslides coated with a solution of human atherosclerotic plaque homogenates (1 mg/mL) to preform aggregates, before perfusing ACT017 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or control buffer in the same blood at 300 s⁻¹ for 12 min. Bar graphs represent the number of disaggregating thrombi ($\times 10^{-4}$)/ μm^2 (n=4), mean \pm SEM; nonparametric Mann-Whitney *U* Test; *** $P < 0.001$. **E,** 1G5 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or Fab IgG diluted in PBS was perfused over preform aggregates at 750 s⁻¹ for 12 min. Bar graphs represent the number of disaggregating thrombi ($\times 10^{-4}$)/ μm^2 (n=3). Two-tailed paired *t* test; ** $P < 0.01$. **F,** ACT017 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 3J24.2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), GPVI-Fc (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or control buffer diluted in PBS were perfused over the preformed aggregates at 750 s⁻¹ for 12 min. Bar graphs represent the number of disaggregating thrombi ($\times 10^{-4}$)/ μm^2 ; control: $3.7 \times 10^{-4} \pm 0.9 \times 10^{-4}$ disaggregating thrombi/ μm^2 ; 3J24.2: $3.5 \times 10^{-4} \pm 1.7 \times 10^{-4}$ disaggregating thrombi/ μm^2 ; ns, $P > 0.5$, n=4–8. **G,** Scatter plots represent time to initiation of disaggregation, expressed in minutes; $3.0 \times 10^{-4} \pm 1.4 \times 10^{-4}$ disaggregating thrombi/ μm^2 ; non significant (ns); $P > 0.5$, n=4–8. Bar is the mean \pm SEM; Bonferroni multiple comparison test; *** $P < 0.001$.

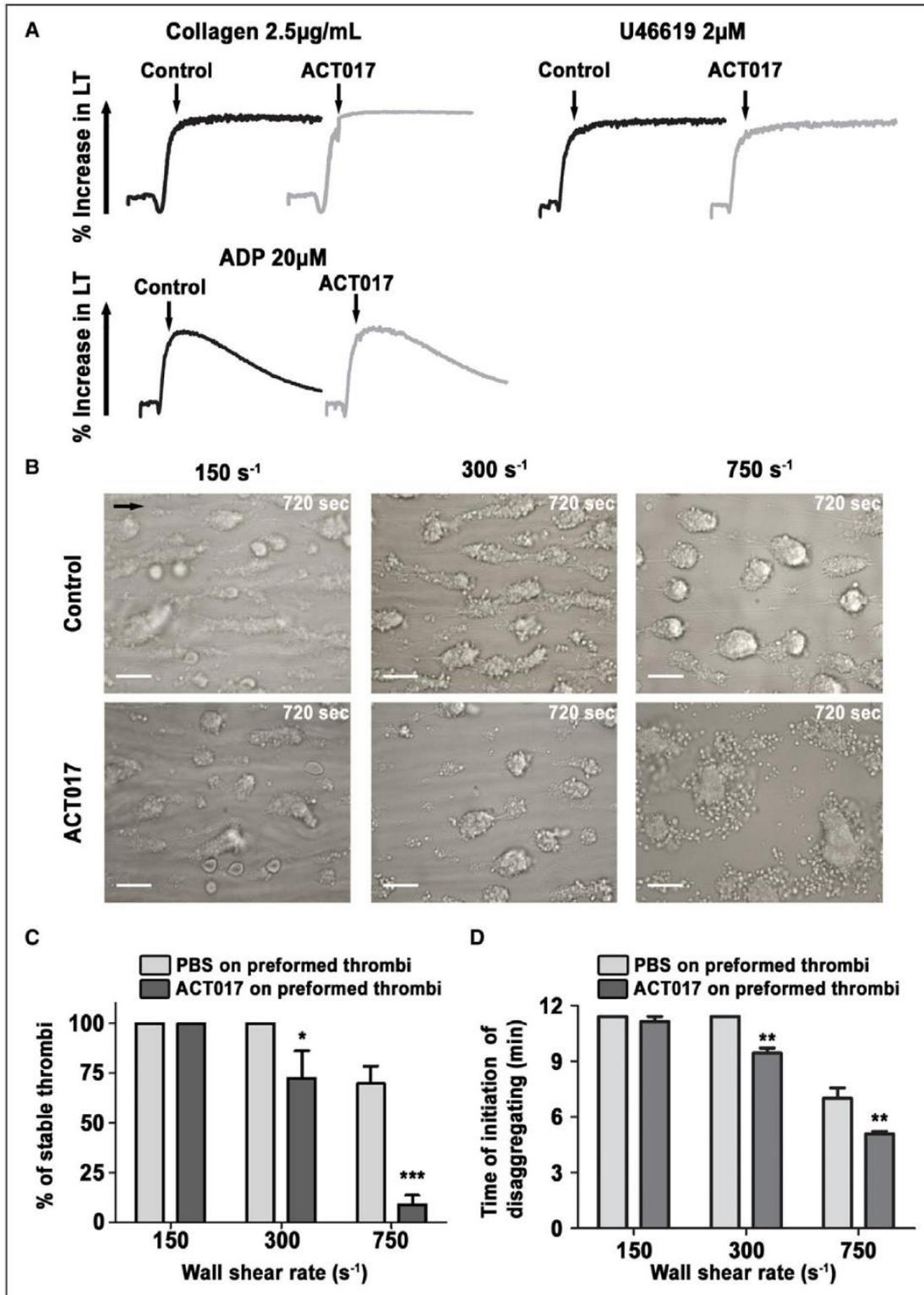


Figure 3. Shear regulates ACT017-induced disaggregation of preformed thrombi.

A, Human washed platelets ($3.0 \times 10^5/\mu\text{L}$) were stimulated with collagen ($2.5 \mu\text{g/mL}$), U46619 ($2 \mu\text{mol/L}$) or ADP ($20 \mu\text{mol/L}$) in the presence of fibrinogen ($64 \mu\text{g/mL}$). ACT017 ($50 \mu\text{g/mL}$) or control buffer was added at maximal aggregation (indicated by an arrow). Aggregation profiles are representative of 3 separate experiments ($n=3$). **B–D**, Hirudinized (100 U/mL) human whole blood was perfused over immobilized collagen ($200 \mu\text{g/mL}$) for 3 min at 750 s^{-1} to preform aggregates. Then, ACT017 ($50 \mu\text{g/mL}$) diluted in PBS was perfused over preformed aggregates at different wall shear rate (WSR; 150 s^{-1} , 300 s^{-1} , and 750 s^{-1}) for 12 min. **B**, Representative differential interference contrast microscopy images of thrombi subjected to ACT017 or control buffer diluted in PBS at indicated WSR. The black arrow indicates the flow direction. Scale bars represent $20 \mu\text{m}$. **C**, Bar graph represents the percentage of stable thrombi ($n=3$). χ^2 test with CI of 95%; * $P<0.05$ and *** $P<0.001$. **D**, Interleaved bars represent time to initiation of disaggregation after perfusion of ACT017 or control buffer diluted in PBS over human aggregates, expressed in minutes ($n=3$); mean \pm SEM. Bonferroni multiple comparison test; *** $P<0.001$.

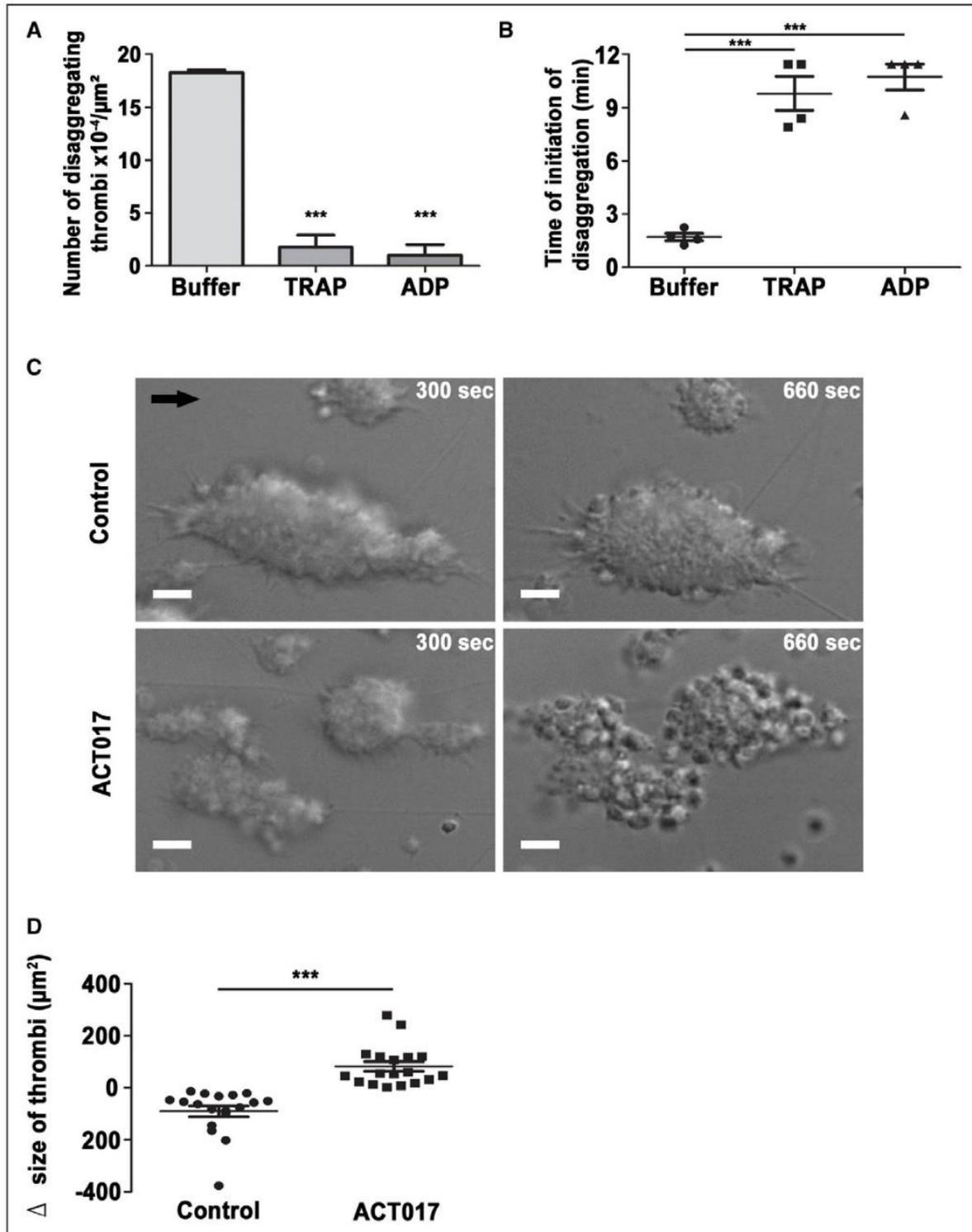


Figure 4. The disaggregating effect of ACT017 relies on impairment of GPVI (glycoprotein VI)-mediated platelet activation.

A–B, Hirudinized (100 U/mL) human whole blood was perfused for 3 min at 750 s^{-1} through microfluidic flow chambers coated with a solution of type I fibrillar collagen (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to preform aggregates, before perfusing buffer containing or not ADP (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) or TRAP (thrombin receptor activator peptide; 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) at 750 s^{-1} for 2 min and then at 150 s^{-1} for 3 min, followed by ACT017 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or control buffer diluted in PBS at 750 s^{-1} for 12 min. **A**, Bar graphs represent the number of disaggregating thrombi ($\times 10^{-4}/\mu\text{m}^2$) ($n=4$). **B**, Scatter plot represents the time at which disaggregation was initiated, expressed in minutes ($n=4$). mean \pm SEM; Bonferroni multiple comparison test; $***P<0.001$. **C–D**, Hirudinized (100 U/mL) human whole blood was perfused for 3 min at 750 s^{-1} through microfluidic flow chambers coated with a solution of type I fibrillar collagen (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to preform aggregates, before perfusing ACT017 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or control buffer diluted in PBS at 750 s^{-1} for 12 min. **C**, Representative differential interference contrast microscopy images of thrombi subjected to ACT017 or control buffer at 5 and 11 min. The black arrow indicates the flow direction. Scale bars represent 5 μm . **D**, Scatter plot represents the variation in thrombi size measured between 5 and 11 min ($n=3$). Mean \pm SEM; nonparametric Mann-Whitney U test; Δ size: control: $-90.2\pm 20.7\text{ }\mu\text{m}^2$; ACT017: $82.0\pm 18.3\text{ }\mu\text{m}^2$; $***P<0.001$; $n=3$. (Continued)

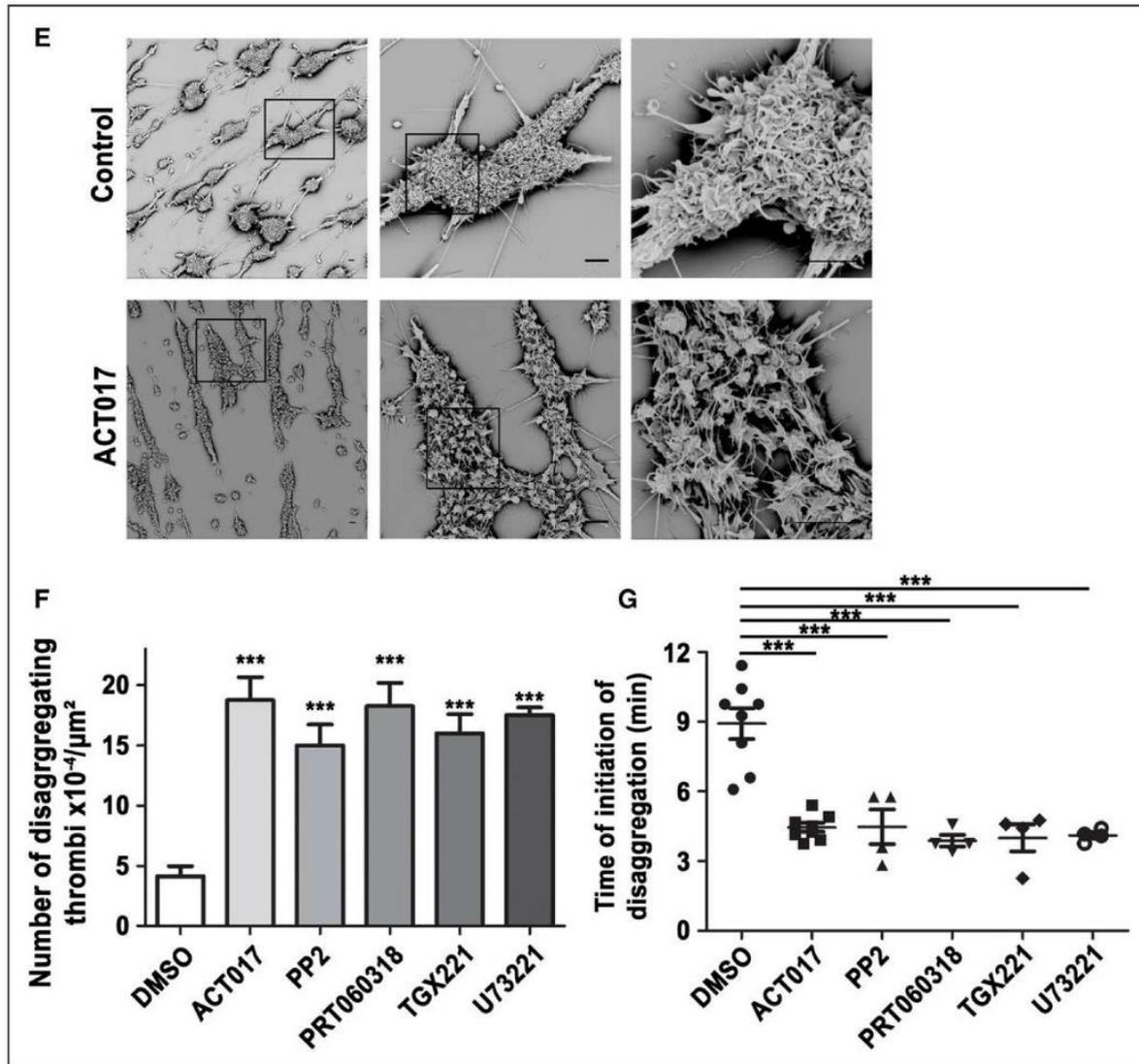


Figure 4 Continued. E, Representative scanning electron microscopy images of thrombi subjected to ACT017 or control buffer at 15 min. Scale bars represent 5 μm . **F–G,** Hirudinized (100 U/mL) human whole blood was perfused for 3 min at 750 s^{-1} through microfluidic flow chambers coated with a solution of type I fibrillar collagen (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to preform aggregates, before perfusing ACT017 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PP2 (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$), PRT060318 (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$), TGX-221 (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$), and U73122 (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) or DMSO diluted in PBS at 750 s^{-1} for 12 min. **F,** Bar graphs represent the number of disintegrating thrombi ($\times 10^{-4}/\mu\text{m}^2$); control: $4.1 \times 10^{-4} \pm 0.8 \times 10^{-4}$ disintegrating thrombi/ μm^2 ; ACT017: $18.7 \times 10^{-4} \pm 1.9 \times 10^{-4}$ disintegrating thrombi/ μm^2 ; PP2: $15 \times 10^{-4} \pm 1.7 \times 10^{-4}$ disintegrating thrombi/ μm^2 ; PRT060318: $18.2 \times 10^{-4} \pm 1.9 \times 10^{-4}$ disintegrating thrombi/ μm^2 ; TGX-221: $16 \times 10^{-4} \pm 1.5 \times 10^{-4}$ disintegrating thrombi/ μm^2 ; U73122: $17.5 \times 10^{-4} \pm 0.6 \times 10^{-4}$ disintegrating thrombi/ μm^2 ; *** $P < 0.001$; $n = 4–8$. **G,** Scatter plot represents the time at which disaggregation was initiated, expressed in minutes ($n = 4–8$). Mean \pm SEM; Bonferroni multiple comparison test; control: 8.9 ± 0.6 min; PP2: 4.5 ± 0.7 min; PRT060318: 3.8 ± 0.2 min; TGX-221: 4.0 ± 0.5 min; U73122: 4.1 ± 0.1 min; *** $P < 0.001$; $n = 4$; *** $P < 0.001$.

at the thrombus edge where less fibrin was present, which is explained by the ability of fibrin to entrap platelets and thereby stabilize the thrombus (Figure 6B; Movie VII in the Data Supplement). This result is in agreement with the view that fibrin stabilizes the clot. We next wondered whether ACT017 would cooperate with a thrombolytic approach based on r-tPA (recombinant tissue plasminogen activator) to enhance thrombus disaggregation. We showed that perfusion of r-tPA in platelet-poor plasma efficiently reduced the fibrin signal over time confirming its thrombolytic effect (Figure 6C and 6D). We observed that r-tPA alone promoted thrombus disaggregation which

was probably linked to its ability to lyse fibrin and lower the stability of the thrombus (Figure 6E). Interestingly, combining r-tPA with ACT017 significantly increased thrombus disaggregation as compared with r-tPA alone, highlighting the potential of an anti-GPVI agent combined with a thrombolytic reagent to promote thrombus disaggregation (Figure 6E). Similar results were obtained when a combination of ACT017 and r-tPA was perfused over thrombi formed on a tissue factor-collagen coated surface with a clear loosening of platelet aggregates being evidenced by a marked increase in surface occupied by the thrombi (Figure 6F and 6G). Together, these results suggest that

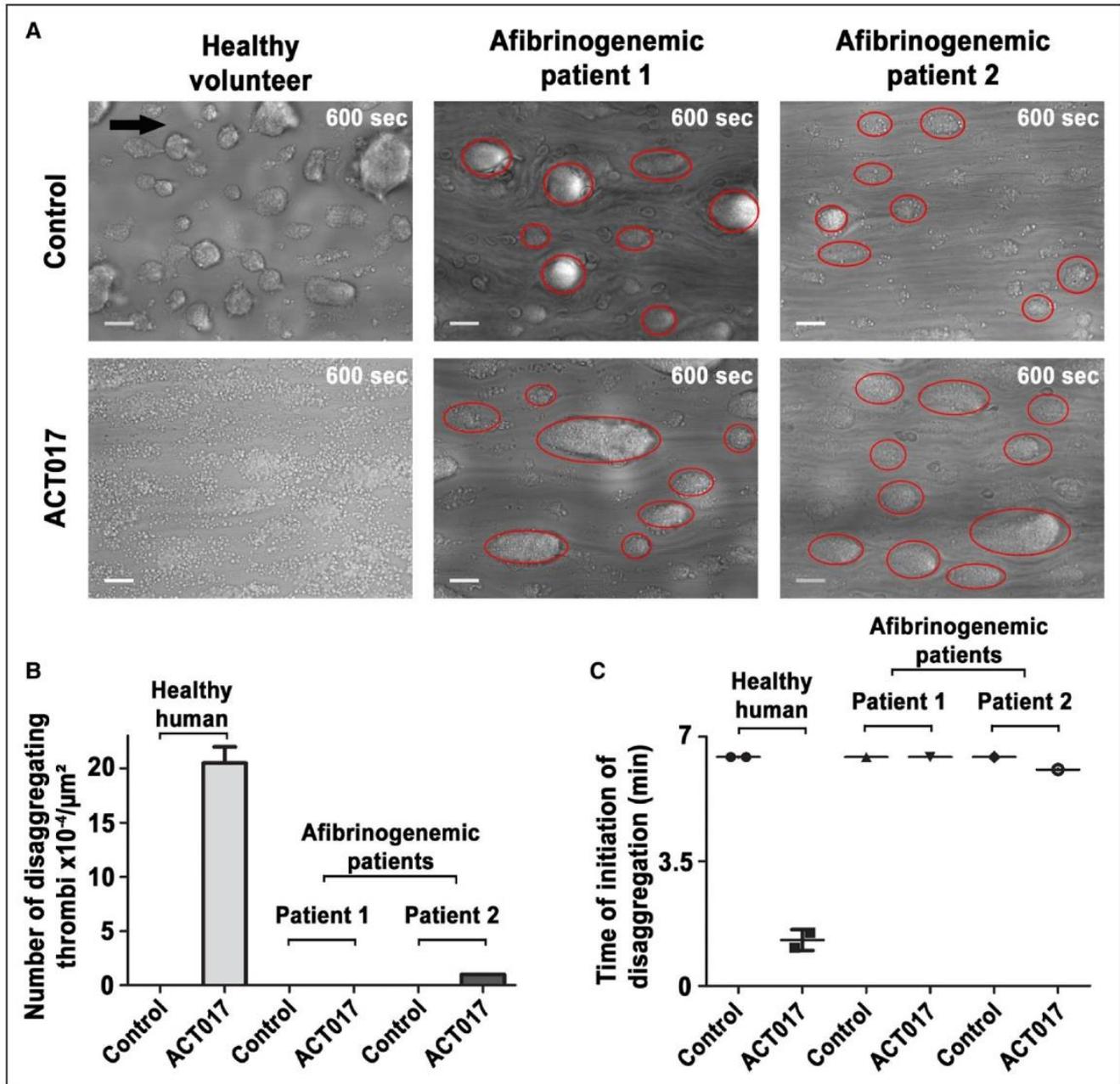


Figure 5. ACT017-induced thrombus disaggregation depends on fibrinogen.

Hirudinized (100 U/mL) human whole blood from healthy volunteers or patients suffering from afibrinogenemia was perfused for 3 min at 750 s^{-1} through microfluidic flow chambers coated with a solution of type I fibrillar collagen (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to preform aggregates, before perfusing blood containing ACT017 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or control buffer for 7 min. **A**, Representative differential interference contrast microscopy images of thrombi subjected to ACT017 or control buffer. The black arrow indicates the flow direction. Scale bars represent 20 μm . **B**, Bar graphs represent the number of disaggregating thrombi ($\times 10^{-4}/\mu\text{m}^2$) ($n=2$). **C**, Scatter plots represent the time at which disaggregation was initiated, expressed in minutes; ACT017: healthy human: $20.5 \times 10^{-4} \pm 1.5 \times 10^{-4}$ disaggregating thrombi/ μm^2 ; afibrinogenemic patient-1 and 2: $0.0 \times 10^{-4} \pm 0.0 \times 10^{-4}$ disaggregating thrombi/ μm^2 ; ($n=2$).

combining a thrombolytic strategy with a blockade of GPVI could dissolve mural thrombi lodged in the vascular bed.

DISCUSSION

In this study, based on the *in silico* model of thrombus dynamics, we propose that under conditions of arterial

blood flow, thrombus dynamics is sensitive to platelet activation state which determines the critical platelet-platelet forces within the thrombus. A decrease in platelet activation level or an increase in the blood flow, result in platelet disaggregation in the numerical model. This *in silico* result is perfectly in line with the disaggregating effect of ACT017 observed *in vitro*, which is expected to lower platelet activation state within the thrombi and

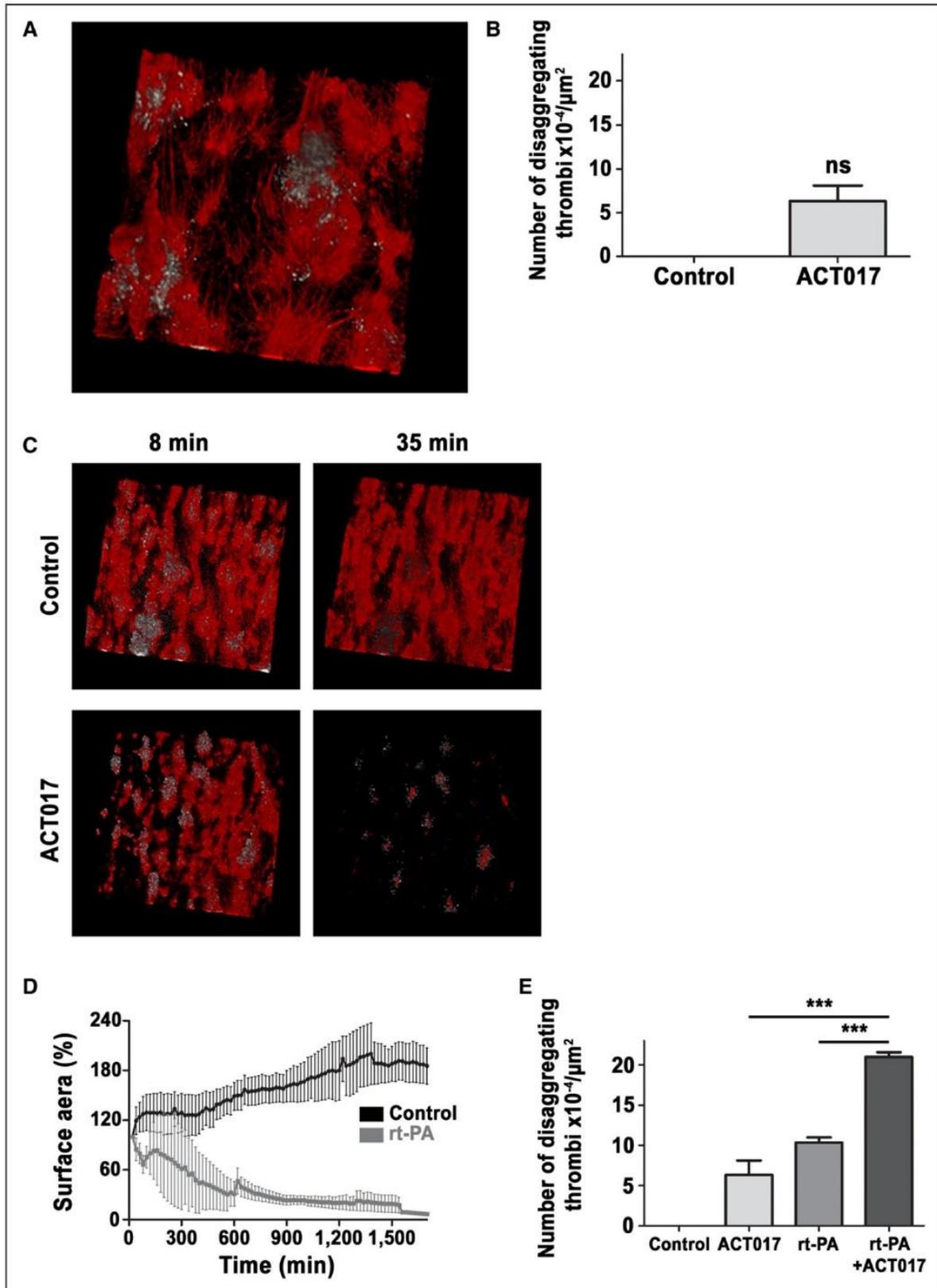


Figure 6. Effect of ACT017 and r-tPA (recombinant tissue plasminogen activator) on disaggregation of fibrin-rich clots. Citrated (3.2%) human whole blood was labelled with a DyLight 650-coupled anti-fibrin antibody (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and was recalcified by adding CaCl_2 (12.5 mmol/L) and MgCl_2 (3.5 mmol/L) just before perfusing it through collagen coated microfluidic flow chambers at 1500 s^{-1} . Once platelet-rich thrombi were formed, a brief washing step was performed to rinse the thrombi before perfusing platelet-poor plasma (PPP) obtained from the same donor (hirudinized blood) in the presence of ACT017 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or r-tPA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) alone or in combination, at 3000 s^{-1} for 35 min. **A**, Representative 3-dimensional (3D) reconstructed confocal microscopy image of thrombi. Fibrin is stained in red and platelets in gray. (Continued)

Downloaded from <http://ahajournals.org> by on December 24, 2020

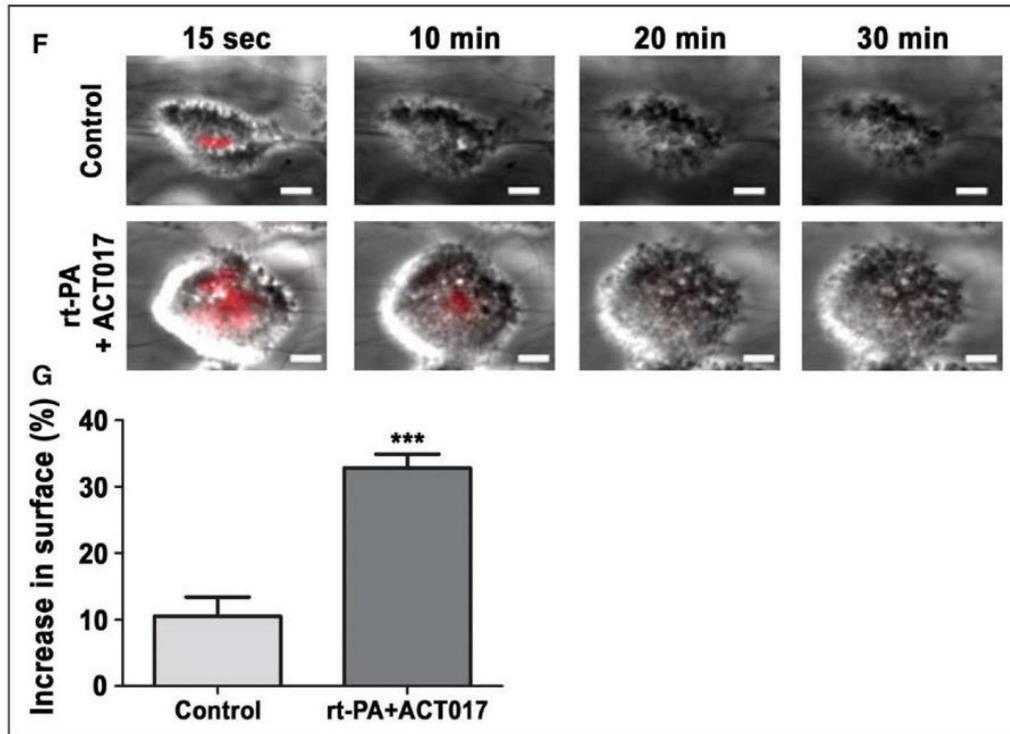


Figure 6 Continued. **B**, Bar graphs represent the number of disaggregating thrombi ($\times 10^{-4}$)/ μm^2 ($n=3$). Mean \pm SEM; nonparametric Mann-Whitney *U* test; ns denotes not significant. **C**, Representative 3D reconstructed confocal microscopy image of thrombi subjected to r-tPA or control buffer diluted in PPP. **D**, Connecting line graphs represent the surface area coverage of fibrin (expressed as percentage of control) over time ($n=3$); mean \pm SEM. **E**, Bar graphs represent the number of disaggregating thrombi ($\times 10^{-4}$)/ μm^2 ($n=3$). Mean \pm SEM; Bonferroni multiple comparison test; $***P<0.001$. **F** and **G**, Citrated (3.2%) human whole blood was labelled with a DyLight 650-coupled anti-fibrin antibody (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and was recalcified by adding CaCl_2 (12.5 mmol/L) and MgCl_2 (3.5 mmol/L) just before perfusing it through collagen and TF-coated microfluidic flow chambers at 1500 s^{-1} . **F**, Representative bright field/epifluorescence microscopy images of r-tPA pretreated thrombi subjected to ACT017 or control buffer diluted in PPP. Fibrin appears in red. **G**, Bar graphs represent increase in surface occupied (expressed in percentage) by the disaggregating thrombi ($n=3$). Mean \pm SEM; χ^2 test with CI of 95%; control: $10.5\pm 2.9\%$ increase in surface area; ACT017: $32.5\pm 2.0\%$ increase in surface area $***P<0.01$; $n=3$.

with the fact that this disaggregating effect increases with the higher values of blood flow (WSR). This study demonstrates that platelet activation is not a short-lived process which aims only to activate integrins to allow bond formation, but represents a long-lasting process that maintains strong inter-platelet bonds.

Most of the experiments performed in this study have been based on perfusions of anticoagulated blood in flow chambers which represents a limitation, as no thrombin is generated under such conditions and, therefore, differs from an *in vivo* situation. On the contrary, such a situation could mimic the part of the thrombus named the shell, in which it has been reported that no significant amount of thrombin is found based on the absence of fibrin.

We have recently reported that blockade of GPVI impairs the growth of a thrombus that had already formed most likely by preventing platelet activation and, therefore, aggregation.⁷ We proposed that this effect was linked to an inhibition of GPVI/fibrinogen-mediated platelet activation, as platelets from GPVI-deficient patients were unable to spread on fibrinogen. The importance of GPVI/fibrinogen interaction in thrombus formation is further evidenced in the present article

through the use of blood from afibrinogenemic patients. First, we confirmed that perfusing fibrinogen-poor blood over collagen formed thrombi, through a mechanism proposed to rely on VWF/ $\alpha\text{IIb}\beta_3$ interaction.³² We observed that while ACT017-induced disaggregation of control thrombi, it had little effect on thrombi formed with blood from 2 afibrinogenemic patients. Importantly, ACT017 exhibited almost no effect despite the fact that such thrombi were looser than control and, therefore, more prone to disaggregate.³³ This result suggests that the effect of GPVI blockade on thrombus disaggregation could be linked to its interplay with fibrinogen. Moreover, observation of thrombus disaggregation in real-time clearly shows that platelets detaching are the one on the top of the thrombus, that is, those interacting with fibrinogen, and never those attached to the surface through strong interaction with collagen.

It is well accepted that absence or blockade of GPVI prevents thrombus formation *in vitro* and in several *in vivo* models of experimental thrombosis.^{11,12} These results underscore a potential beneficial role of anti-GPVI agents in preventing arterial thrombosis, notably during percutaneous coronary intervention. Indeed, this procedure leads

to exposure of highly reactive fibrillar collagen which initiates platelet activation and thrombus formation through GPVI. Therefore, blocking GPVI in such a setting now stands as a very promising antithrombotic strategy. Anti-GPVI agents could also be beneficial in patients with an ongoing thrombosis in addition to their use in prevention since we recently reported that an anti-GPVI blocking agent, ACT017, limits thrombus growth once a thrombus had already formed.⁷ The results presented in this article extend these findings, showing that anti-GPVI agents promote disaggregation of thrombi, which was unexpected. This disaggregating effect was observed on fibrin-poor thrombi, which mimic the thrombus shell, representing the prominent part of the thrombus. This suggests that anti-GPVI agents could destabilize the shell, thereby preventing vessel occlusion. Additionally, we showed that thrombi rich in fibrin, a condition that mimics the core of the thrombus, are also destabilized by ACT017 when used in combination with r-tPA. The disaggregating effects of anti-GPVI agents used in combination with r-tPA on fibrin-rich thrombi opens new avenues for the use of such agents in clinical settings where a thrombus had already formed, such as during acute phases of myocardial infarction or stroke. This adds new arguments to previous observations that mice immunodepleted for GPVI were protected in a stroke model, in favor of a beneficial effect of anti-GPVI antibodies in stroke.³⁵

This study presented the results obtained exclusively from experiments in vitro with human blood. In this model, human whole blood is perfused over fibrillar collagen and forms a mural thrombus which is likely to mimic a pathological situation encountered during arterial thrombosis. We aimed to confirm these observations in vivo. As ACT017 blocks human but not mouse GPVI, we used a mouse strain in which murine GPVI was genetically replaced by its human counterpart.³⁶ To our surprise, ACT017 did not promote disaggregation of preformed mouse platelet thrombi in vitro, indicating that GPVI is not important to maintain the integrity of mouse thrombi (article in preparation). For these reasons, evaluating the effect of blocking human GPVI on thrombus stability during the initial phase of thrombus growth could not be achieved in a mouse. This is not the only example of major differences between platelets of the 2 species, other being related to the thrombin receptors and the presence of the immunoreceptor tyrosine-based motif receptor, FcγRIIa (Fc gamma receptor IIA).

Dimeric GPVI-Fc, unlike the 2 distinct blocking anti-GPVI Fab fragments ACT017 and 1G5, did not promote thrombus disaggregation. There is strong experimental evidence that dimeric GPVI-Fc inhibits collagen-induced platelet aggregation in vitro and ex vivo. GPVI-Fc also reduces experimental thrombosis probably through impairing GPVI interaction with collagen exposed at site of injury.^{37,38} The reason why GPVI-Fc has no effect on

thrombus disaggregation could have 2 explanations. First, direct blockade of GPVI with an antibody has been proposed to be more efficient than using a competition approach based on GPVI-Fc in static and flow experiments.^{34,35} Second, we reported that dimeric GPVI-Fc does not bind fibrinogen, which is the ligand of GPVI in a growing thrombus,⁷ and therefore, it is expected that such an agent would have no effect. This observation has important clinical implications as ACT017 and GPVI-Fc have both successfully completed phase I and are currently being evaluated in phase II clinical trials.^{39,40} Here we describe that direct blockade of GPVI with Fab fragments, but not with GPVI-Fc, promotes disaggregation of both fibrin-poor and fibrin-rich thrombi. Our data suggests that such agents should be evaluated in trials of patients with ischemic stroke treated with r-tPA. This is especially relevant since anti-GPVI agents do not appear to impact hemostasis and so carry a reduced bleeding risk when compared with other antiplatelet agents.³

ARTICLE INFORMATION

Received March 19, 2020; accepted July 6, 2020.

Affiliations

From the Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France (M.U.A., N.R., M.L.B., E.J.-B., F.L., C.G., P.H.M.); Faculty of Physics, Moscow State University, Russia (V.K., D.N., M.P.); Federal Research and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Russia (V.K., D.N., M.P.); Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russia (V.K., D.M., M.P.); Université de Paris, INSERM, Hôpital Bichat, UMR-S1148, France (S.L., M.J.-P.); CHU Lille, Université de Lille, INSERM UMR-SU1011-EGID, Institut Pasteur de Lille, France (M.D., A.R., S.S.); Université de Strasbourg, Department of Vascular Surgery and Kidney Transplantation, France (N.C.); The Australian National University, The John Curtin School of Medical Research, ACRF Department of Cancer Biology and Therapeutics, Canberra, Australia (E.E.G.); Australian Centre for Blood Diseases, Monash University, Australia (R.K.A.); and Acticor Biotech, France (M.J.-P.).

Acknowledgments

We thank Wolfgang Siess for providing atherosclerotic plaque material as a control.

Sources of Funding

This work was supported by ARMESA (Association Recherche et Développement Médical en santé publique) and by a grant from Concours mondial de l'innovation: TherAVC 2.0 (BPI France). M.U. Ahmed was supported by PhD fellowship from HEC (Higher Education Commission) Pakistan.

Disclosures

M. Jandrot-Perrus is the founder of Acticor Biotech. C. Gachet is the cofounder of Acticor Biotech. The other authors report no conflicts.

REFERENCES

1. Jackson SP. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011;17:1423–1436. doi: 10.1038/nm.2515
2. Welsh JD, Stalker TJ, Voronov R, Muthard RW, Tomaiuolo M, Diamond SL, Brass LF. A systems approach to hemostasis: 1. The interdependence of thrombus architecture and agonist movements in the gaps between platelets. *Blood*. 2014;124:1808–1815. doi: 10.1182/blood-2014-01-550335
3. Zahid M, Mangin P, Loyau S, Hechler B, Billiald P, Gachet C, Jandrot-Perrus M. The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target. *J Thromb Haemost*. 2012;10:2418–2427. doi: 10.1111/jth.12009

4. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013;93:327–358. doi: 10.1152/physrev.00016.2011
5. Mangin P, Yuan Y, Goncalves I, Eckly A, Freund M, Cazenave JP, Gachet C, Jackson SP, Lanza F. Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA. *J Biol Chem*. 2003;278:32880–32891. doi: 10.1074/jbc.M302333200
6. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost*. 2001;86:222–232.
7. Mangin PH, Onselae MB, Receveur N, Le Lay N, Hardy AT, Wilson C, Sanchez X, Loyau S, Dupuis A, Babar AK, et al. Immobilized fibrinogen activates human platelets through glycoprotein VI. *Haematologica*. 2018;103:898–907. doi: 10.3324/haematol.2017.182972
8. Dumont B, Lasne D, Rothschild C, Bouabdelli M, Ollivier V, Oudin C, Ajzenberg N, Grandchamp B, Jandrot-Perrus M. Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations. *Blood*. 2009;114:1900–1903. doi: 10.1182/blood-2009-03-213504
9. Hermans C, Wittevrongel C, Thys C, Smethurst PA, Van Geet C, Freson K. A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1356–1363. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03520.x
10. Matus V, Valenzuela G, Sáez CG, Hidalgo P, Lagos M, Aranda E, Panes O, Pereira J, Pillois X, Nurdan AT, et al. An adenine insertion in exon 6 of human GP6 generates a truncated protein associated with a bleeding disorder in four Chilean families. *J Thromb Haemost*. 2013;11:1751–1759. doi: 10.1111/jth.12334
11. 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;9:1423–1426. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04328.x
12. Mangin P, Yap CL, Nonne C, Sturgeon SA, Goncalves I, Yuan Y, Schoenwaelder SM, Wright CE, Lanza F, Jackson SP. Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcRgamma deficiency. *Blood*. 2006;107:4346–4353. doi: 10.1182/blood-2005-10-4244
13. Hechler B, Nonne C, Eckly A, Magnenat S, Rinckel JY, Denis CV, Freund M, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C. Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb Haemost*. 2010;8:173–184. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03666.x
14. Kuijpers MJ, Gilio K, Reitsma S, Nergiz-Unal R, Prinzen L, Heeneman S, Lutgens E, van Zandvoort MA, Nieswandt B, Egbrink MG, et al. Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model. *J Thromb Haemost*. 2009;7:152–161. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03186.x
15. Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Borri-Sanz T, Inoue O, Jung SM, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC, Watson SP. Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J Biol Chem*. 2002;277:21561–21566. doi: 10.1074/jbc.M201012200
16. Quek LS, Pasquet JM, Hers I, Cornall R, Knight G, Barnes M, Hibbs ML, Dunn AR, Lowell CA, Watson SP. Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway. *Blood*. 2000;96:4246–4253.
17. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102:449–461. doi: 10.1182/blood-2002-12-3882
18. Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJ, Moroi M, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, Ozaki Y, Watson SP. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood*. 2006;107:1405–1412. doi: 10.1182/blood-2005-06-2406
19. Schaff M, Tang C, Maurer E, Bourdon C, Receveur N, Eckly A, Hechler B, Arnold C, de Arcangelis A, Nieswandt B, et al. Integrin alpha6beta1 is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation*. 2013;128:541–552. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000799
20. Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, Watson SK, Frampton J, Bender M, Watson SP. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood*. 2015;126:1601–1608. doi: 10.1182/blood-2015-04-641654
21. Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, Freyburger G, Latger-Cannard V, Nieswandt B, Gachet C, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood*. 2015;126:683–691. doi: 10.1182/blood-2015-02-629717
22. Neerman-Arbez M, de Moerloose P, Bridel C, Honsberger A, Schönbornner A, Rossier C, Peerlinck K, Claeysyssens S, Di Michele D, d'Oiron R, et al. Mutations in the fibrinogen alpha gene account for the majority of cases of congenital afibrinogenemia. *Blood*. 2000;96:149–152.
23. Simsek I, de Mazancourt P, Horellou MH, Erdem H, Pay S, Dinc A, Samama MM. Afibrinogenemia resulting from homozygous nonsense mutation in A alpha chain gene associated with multiple thrombotic episodes. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2008;19:247–253. doi: 10.1097/MBC.0b013e3282f564fd
24. Swieringa F, Baaten CC, Verdoold R, Mastenbroek TG, Rijnveld N, van der Laan KO, Breeel EJ, Collins PW, Lancé MD, Henskens YM, et al. Platelet control of fibrin distribution and microelasticity in thrombus formation under flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:692–699. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306537
25. Paulus JM. Platelet size in man. *Blood*. 1975;46:321–336.
26. Coburn LA, Damaraju VS, Dozic S, Eskin SG, Cruz MA, McIntire LV. GPIIb-IIIa rolling under shear stress shows differences between type 2B and 2M von Willebrand disease. *Biophys J*. 2011;100:304–312. doi: 10.1016/j.bpj.2010.11.084
27. Nguyen TH, Palankar R, Bui VC, Medvedev N, Greinacher A, Delcea M. Rupture forces among human blood platelets at different degrees of activation. *Sci Rep*. 2016;6:25402. doi: 10.1038/srep25402
28. Trifanov PV, Kaneva VN, Strijhak SV, Pantelev MA, Ataullakhanov FI, Dunster J, Voevodin VV, Nechipurenko DY. Developing quasi-steady model for studying hemostatic response using supercomputer technologies. *Supercomput Front Innov*. 2018;5:67–72.
29. Maurer E, Schaff M, Receveur N, Bourdon C, Mercier L, Nieswandt B, Dubois C, Jandrot-Perrus M, Goetz JG, Lanza F, et al. Fibrillar cellular fibronectin supports efficient platelet aggregation and procoagulant activity. *Thromb Haemost*. 2015;114:1175–1188. doi: 10.1160/TH14-11-0958
30. Penz SM, Reininger AJ, Toth O, Deckmyn H, Brandl R, Siess W. Glycoprotein Ibalph inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*. 2007;97:435–443.
31. Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol*. 2004;272:13–28. doi: 10.1385/1-59259-782-3:013
32. De Marco L, Girolami A, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. von Willebrand factor interaction with the glycoprotein IIb/IIIa complex. Its role in platelet function as demonstrated in patients with congenital afibrinogenemia. *J Clin Invest*. 1986;77:1272–1277. doi: 10.1172/JCI112430
33. Remijn JA, Wu YP, Ijsseldijk MJ, Zwaginga JJ, Sixma JJ, de Groot PG. Absence of fibrinogen in afibrinogenemia results in large but loosely packed thrombi under flow conditions. *Thromb Haemost*. 2001;85:736–742.
34. Jamasbi J, Megens RT, Bianchini M, Münch G, Ungerer M, Faussner A, Sherman S, Walker A, Goyal P, Jung S, et al. Differential inhibition of human atherosclerotic plaque-induced platelet activation by dimeric GPVI-Fc and Anti-GPVI antibodies: functional and imaging studies. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:2404–2415. doi: 10.1016/j.jacc.2015.03.573
35. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G. Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation*. 2007;115:2323–2330. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.691279
36. Mangin PH, Tang C, Bourdon C, Loyau S, Freund M, Hechler B, Gachet C, Jandrot-Perrus M. A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;341:156–163. doi: 10.1124/jpet.111.189050
37. Bültmann A, Herdeg C, Li Z, Münch G, Baumgartner C, Langer H, Kremmer E, Geisler T, May A, Ungerer M, et al. Local delivery of soluble platelet collagen receptor glycoprotein VI inhibits thrombus formation in vivo. *Thromb Haemost*. 2006;95:763–766.
38. Massberg S, Konrad I, Bültmann A, Schulz C, Münch G, Peluso M, Lorenz M, Schneider S, Besta F, Müller I, et al. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J*. 2004;18:397–399. doi: 10.1096/fj.03-0464fje
39. Lebozec K, Jandrot-Perrus M, Avenard G, Favre-Bulle O, Billiald P. Design, development and characterization of ACTO17, a humanized Fab that blocks platelet's glycoprotein VI function without causing bleeding risks. *MAbs*. 2017;9:945–958. doi: 10.1080/19420862.2017.1336592
40. Ungerer M, Rosport K, Bültmann A, Piechatek R, Uhland K, Schlieper P, Gawaz M, Münch G. Novel antiplatelet drug recept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation*. 2011;123:1891–1899. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.980623

BIBLIOGRAPHIE

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.-M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., et al. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 281–341.
- Adair, B.D., Xiong, J.-P., Maddock, C., Goodman, S.L., Arnaout, M.A., and Yeager, M. (2005). Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin α V β 3 in a complex with fibronectin. *J. Cell Biol.* 168, 1109–1118.
- Adams, J.C., and Lawler, J. (2011). The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a009712.
- AdvanceCOR GmbH (2020). Pressemitteilung: AdvanceCOR GmbH berichtet den erfolgreichen Abschluss und positive Ergebnisse der ersten Phase II-Studie mit Revacept® in Patienten mit Verengung der Halsschlagader (Karotisstenose) und nachfolgendem Schlaganfall (Apoplex)/TIA.
- Agbanyo, F.R., Sixma, J.J., de Groot, P.G., Languino, L.R., and Plow, E.F. (1993). Thrombospondin-platelet interactions. Role of divalent cations, wall shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *J. Clin. Invest.* 92, 288–296.
- Ahmed, M.U., Kaneva, V., Loyau, S., Nechipurenko, D., Receveur, N., Le Bris, M., Janus-Bell, E., Didelot, M., Rauch, A., Susen, S., et al. (2020). Pharmacological Blockade of Glycoprotein VI Promotes Thrombus Disaggregation in the Absence of Thrombin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 40, 2127–2142.
- Aird, W.C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res.* 100, 174–190.
- Aisiku, O., Peters, C.G., De Ceunynck, K., Ghosh, C.C., Dilks, J.R., Fustolo-Gunnink, S.F., Huang, M., Dockendorff, C., Parikh, S.M., and Flaumenhaft, R. (2015). Parmodulins inhibit thrombus formation without inducing endothelial injury caused by vorapaxar. *Blood* 125, 1976–1985.
- Akuta, K., Kiyomizu, K., Kashiwagi, H., Kunishima, S., Nishiura, N., Banno, F., Kokame, K., Kato, H., Kanakura, Y., Miyata, T., et al. (2020). Knock-in mice bearing constitutively active α IIb(R990W) mutation develop macrothrombocytopenia with severe platelet dysfunction. *J. Thromb. Haemost.* 18, 497–509.
- Allingham, M.J., van Buul, J.D., and Burridge, K. (2007). ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J. Immunol.* 179, 4053–4064.
- Allport, J.R., Muller, W.A., and Luscinskas, F.W. (2000). Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow. *J. Cell Biol.* 148, 203–216.
- Alshehri, O.M., Hughes, C.E., Montague, S., Watson, S.K., Frampton, J., Bender, M., and Watson, S.P. (2015). Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood* 126, 1601–1608.

- Altroff, H., van der Walle, C.F., Asselin, J., Fairless, R., Campbell, I.D., and Mardon, H.J. (2001). The eighth FIII domain of human fibronectin promotes integrin alpha5beta1 binding via stabilization of the ninth FIII domain. *J. Biol. Chem.* 276, 38885–38892.
- Andersen, H., Greenberg, D.L., Fujikawa, K., Xu, W., Chung, D.W., and Davie, E.W. (1999). Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11189–11193.
- André, P., Prasad, K.S.S., Denis, C.V., He, M., Papalia, J.M., Hynes, R.O., Phillips, D.R., and Wagner, D.D. (2002). CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat. Med.* 8, 247–252.
- Andre, P., Delaney, S.M., LaRocca, T., Vincent, D., DeGuzman, F., Jurek, M., Koller, B., Phillips, D.R., and Conley, P.B. (2003). P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J. Clin. Invest.* 112, 398–406.
- Andrews, R.K., and Berndt, M.C. (2008). Platelet adhesion: a game of catch and release. *J. Clin. Invest.* 118, 3009–3011.
- Andrews, R.K., Gardiner, E.E., Asazuma, N., Berlanga, O., Tulasne, D., Nieswandt, B., Smith, A.I., Berndt, M.C., and Watson, S.P. (2001). A novel viper venom metalloproteinase, alborhagin, is an agonist at the platelet collagen receptor GPVI. *J. Biol. Chem.* 276, 28092–28097.
- Andrews, R.K., Suzuki-Inoue, K., Shen, Y., Tulasne, D., Watson, S.P., and Berndt, M.C. (2002). Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of platelet glycoprotein VI. *Blood* 99, 4219–4221.
- Antithrombotic Trialists' Collaboration (2002). Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 324, 71–86.
- Arman, M., and Krauel, K. (2015). Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 13, 893–908.
- Arner, M., and Högestätt, E.D. (1991). Endothelium-dependent relaxation and effects of prostacyclin, endothelin and platelet-activating factor in human hand veins and arteries. *Acta Physiol. Scand.* 142, 165–172.
- Asai, J., Hirakawa, S., Sakabe, J., Kishida, T., Wada, M., Nakamura, N., Takenaka, H., Mazda, O., Urano, T., Suzuki-Inoue, K., et al. (2016). Platelets Regulate the Migration of Keratinocytes via Podoplanin/CLEC-2 Signaling during Cutaneous Wound Healing in Mice. *Am. J. Pathol.* 186, 101–108.
- Asch, E., and Podack, E. (1990). Vitronectin binds to activated human platelets and plays a role in platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* 85, 1372–1378.
- Asselin, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J., and Watson, S.P. (1999). Monomeric (glycine-proline-hydroxyproline)₁₀ repeat sequence is a partial agonist of the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *Biochem. J.* 339 (Pt 2), 413–418.

- Aster, R.H. (1966). Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of “hypersplenic” thrombocytopenia. *J. Clin. Invest.* *45*, 645–657.
- Astrof, S., and Hynes, R.O. (2009). Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* *12*, 165–175.
- Aumailley, M., Wiedemann, H., Mann, K., and Timpl, R. (1989). Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* *184*, 241–248.
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W.G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J.C.R., et al. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* *24*, 326–332.
- Awtry, E.H., and Loscalzo, J. (2000). Aspirin. *Circulation* *101*, 1206–1218.
- Baneyx, G., Baugh, L., and Vogel, V. (2001). Coexisting conformations of fibronectin in cell culture imaged using fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 14464–14468.
- Baqi, Y., and Müller, C.E. (2019). Antithrombotic P2Y₁₂ receptor antagonists: recent developments in drug discovery. *Drug Discov. Today* *24*, 325–333.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res.* *339*, 269–280.
- Barreiro, O., Zamai, M., Yáñez-Mó, M., Tejera, E., López-Romero, P., Monk, P.N., Gratton, E., Caiolfa, V.R., and Sánchez-Madrid, F. (2008). Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *J. Cell Biol.* *183*, 527–542.
- Bartunek, J., Barbato, E., Heyndrickx, G., Vanderheyden, M., Wijns, W., and Holz, J.-B. (2013). Novel antiplatelet agents: ALX-0081, a Nanobody directed towards von Willebrand factor. *J Cardiovasc Transl Res* *6*, 355–363.
- Bauer, M., Retzer, M., Wilde, J.I., Maschberger, P., Essler, M., Aepfelbacher, M., Watson, S.P., and Siess, W. (1999). Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood* *94*, 1665–1672.
- Bellucci, S., Huisse, M.G., Boval, B., Hainaud, P., Robert, A., Fauvel-Lafève, F., and Jandrot-Perrus, M. (2005). Defective collagen-induced platelet activation in two patients with malignant haemopathies is related to a defect in the GPVI-coupled signalling pathway. *Thromb. Haemost.* *93*, 130–138.
- Ben Addi, A., Cammarata, D., Conley, P.B., Boeynaems, J.-M., and Robaye, B. (2010). Role of the P2Y₁₂ receptor in the modulation of murine dendritic cell function by ADP. *J. Immunol.* *185*, 5900–5906.
- Bender, M., Hagedorn, I., and Nieswandt, B. (2011). Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl₃ - induced thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* *9*, 1423–1426.

- Bender, M., May, F., Lorenz, V., Thielmann, I., Hagedorn, I., Finney, B.A., Vögtle, T., Remer, K., Braun, A., Bösl, M., et al. (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*, 926–934.
- Bennett, J.S., Chan, C., Vilaire, G., Mousa, S.A., and DeGrado, W.F. (1997). Agonist-activated alphavbeta3 on platelets and lymphocytes binds to the matrix protein osteopontin. *J. Biol. Chem.* *272*, 8137–8140.
- Bergmeier, W., and Hynes, R.O. (2012). Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *4*.
- Bergmeier, W., Piffath, C.L., Goerge, T., Cifuni, S.M., Ruggeri, Z.M., Ware, J., and Wagner, D.D. (2006). The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 16900–16905.
- Berrou, E., Adam, F., Lebret, M., Planche, V., Fergelot, P., Issertial, O., Coupry, I., Bordet, J.-C., Nurden, P., Bonneau, D., et al. (2017). Gain-of-Function Mutation in Filamin A Potentiates Platelet Integrin α IIb β 3 Activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *37*, 1087–1097.
- Bertozzi, C.C., Schmaier, A.A., Mericko, P., Hess, P.R., Zou, Z., Chen, M., Chen, C.-Y., Xu, B., Lu, M., Zhou, D., et al. (2010). Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood* *116*, 661–670.
- Best, D., Senis, Y.A., Jarvis, G.E., Eagleton, H.J., Roberts, D.J., Saito, T., Jung, S.M., Moroi, M., Harrison, P., Green, F.R., et al. (2003). GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood* *102*, 2811–2818.
- Beumer, S., IJsseldijk, M.J., de Groot, P.G., and Sixma, J.J. (1994). Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood* *84*, 3724–3733.
- Bhatt, D.L., Fox, K.A.A., Hacke, W., Berger, P.B., Black, H.R., Boden, W.E., Cacoub, P., Cohen, E.A., Creager, M.A., Easton, J.D., et al. (2006). Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* *354*, 1706–1717.
- Bitterman, A.D., and Sponseller, P.D. (2017). Marfan Syndrome: A Clinical Update. *J Am Acad Orthop Surg* *25*, 603–609.
- Bix, G., Fu, J., Gonzalez, E.M., Macro, L., Barker, A., Campbell, S., Zutter, M.M., Santoro, S.A., Kim, J.K., Höök, M., et al. (2004). Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through alpha2beta1 integrin. *J. Cell Biol.* *166*, 97–109.
- Bix, G., Iozzo, R.A., Woodall, B., Burrows, M., McQuillan, A., Campbell, S., Fields, G.B., and Iozzo, R.V. (2007). Endorepellin, the C-terminal angiostatic module of perlecan, enhances collagen-platelet responses via the alpha2beta1-integrin receptor. *Blood* *109*, 3745–3748.

- Bohnsack, J.F. (1992). CD11/CD18-independent neutrophil adherence to laminin is mediated by the integrin VLA-6. *Blood* 79, 1545–1552.
- Boilard, E., Nigrovic, P.A., Larabee, K., Watts, G.F.M., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R.W., Ware, J., et al. (2010). Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 327, 580–583.
- Bonnefoy, A., Daenens, K., Feys, H.B., De Vos, R., Vandervoort, P., Vermeylen, J., Lawler, J., and Hoylaerts, M.F. (2006). Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting (sub)endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13. *Blood* 107, 955–964.
- Bori-Sanz, T., Inoue, K.S., Berndt, M.C., Watson, S.P., and Tulasne, D. (2003). Delineation of the region in the glycoprotein VI tail required for association with the Fc receptor gamma-chain. *J. Biol. Chem.* 278, 35914–35922.
- Borriello, F., Iannone, R., and Marone, G. (2017). Histamine Release from Mast Cells and Basophils. *Handb Exp Pharmacol* 241, 121–139.
- Boukerche, H., and McGregor, J.L. (1988). Characterization of an anti-thrombospondin monoclonal antibody (P8) that inhibits human blood platelet functions. Normal binding of P8 to thrombin-activated Glanzmann thrombasthenic platelets. *Eur. J. Biochem.* 171, 383–392.
- Boulaftali, Y., Hess, P.R., Getz, T.M., Cholka, A., Stolla, M., Mackman, N., Owens, A.P., Ware, J., Kahn, M.L., and Bergmeier, W. (2013). Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J. Clin. Invest.* 123, 908–916.
- Boylan, B., Chen, H., Rathore, V., Paddock, C., Salacz, M., Friedman, K.D., Curtis, B.R., Stapleton, M., Newman, D.K., Kahn, M.L., et al. (2004). Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcRgamma-chain complex from the human platelet surface. *Blood* 104, 1350–1355.
- Boylan, B., Gao, C., Rathore, V., Gill, J.C., Newman, D.K., and Newman, P.J. (2008). Identification of FcgammaRIIIa as the ITAM-bearing receptor mediating alphaIIb beta3 outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood* 112, 2780–2786.
- Bradford, H.N., Dela Cadena, R.A., Kunapuli, S.P., Dong, J.F., López, J.A., and Colman, R.W. (1997). Human kininogens regulate thrombin binding to platelets through the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* 90, 1508–1515.
- Bradford, H.N., Pixley, R.A., and Colman, R.W. (2000). Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* 275, 22756–22763.
- Brehm, M.A. (2017). Von Willebrand factor processing. *Hamostaseologie* 37, 59–72.
- Breiteneder-Geleff, S., Matsui, K., Soleiman, A., Meraner, P., Poczewski, H., Kalt, R., Schaffner, G., and Kerjaschki, D. (1997). Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of

- glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am. J. Pathol.* *151*, 1141–1152.
- Broermann, A., Winderlich, M., Block, H., Frye, M., Rossaint, J., Zarbock, A., Cagna, G., Linnepe, R., Schulte, D., Nottebaum, A.F., et al. (2011). Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *J. Exp. Med.* *208*, 2393–2401.
- Bromberger, T., Klapproth, S., Rohwedder, I., Zhu, L., Mittmann, L., Reichel, C.A., Sperandio, M., Qin, J., and Moser, M. (2018). Direct Rap1/Talin1 interaction regulates platelet and neutrophil integrin activity in mice. *Blood* *132*, 2754–2762.
- Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* *119*, 5640–5649.
- Buensuceso, C., de Virgilio, M., and Shattil, S.J. (2003). Detection of integrin alpha IIb beta 3 clustering in living cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 15217–15224.
- Bültmann, A., Li, Z., Wagner, S., Peluso, M., Schönberger, T., Weis, C., Konrad, I., Stellos, K., Massberg, S., Nieswandt, B., et al. (2010). Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis--a possible role of fibronectin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *49*, 532–542.
- Bultmann, H., Santas, A.J., and Peters, D.M. (1998). Fibronectin fibrillogenesis involves the heparin II binding domain of fibronectin. *J. Biol. Chem.* *273*, 2601–2609.
- Burkhart, J.M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., Sickmann, A., and Zahedi, R.P. (2012). The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* *120*, e73-82.
- Buschmann, M.D., and Grodzinsky, A.J. (1995). A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics. *J Biomech Eng* *117*, 179–192.
- Calverley, D.C., Brass, E., Hacker, M.R., Tsao-Wei, D.D., Espina, B.M., Pullarkat, V.A., Hodis, H.N., and Groshen, S. (2002). Potential role of platelet Fc gamma RIIA in collagen-mediated platelet activation associated with atherothrombosis. *Atherosclerosis* *164*, 261–267.
- Calzada, M.J., Sipes, J.M., Krutzsch, H.C., Yurchenco, P.D., Annis, D.S., Mosher, D.F., and Roberts, D.D. (2003). Recognition of the N-terminal modules of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 by alpha6beta1 integrin. *J. Biol. Chem.* *278*, 40679–40687.
- Campbell, I.D., and Humphries, M.J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.
- Canobbio, I., Bertoni, A., Lova, P., Paganini, S., Hirsch, E., Sinigaglia, F., Balduini, C., and Torti, M. (2001). Platelet activation by von Willebrand factor requires coordinated signaling through thromboxane A2 and Fc gamma IIA receptor. *J. Biol. Chem.* *276*, 26022–26029.

- Carbo, C., del Conde, I., and Duerschmied, D. (2009). Petechial bleeding after sunburn in a patient with mild thrombocytopenia. *Am. J. Hematol.* *84*, 523.
- Carman, C.V. (2009). Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by “invadosome-like protrusions.” *J. Cell. Sci.* *122*, 3025–3035.
- Carman, C.V., and Springer, T.A. (2003). Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 547–556.
- Carman, C.V., and Springer, T.A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.* *167*, 377–388.
- Carman, C.V., Sage, P.T., Sciuto, T.E., de la Fuente, M.A., Geha, R.S., Ochs, H.D., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., and Springer, T.A. (2007). Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* *26*, 784–797.
- Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysen, B., Dewerchin, M., et al. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* *98*, 147–157.
- Castaing-Berthou, A., Malet, N., Radojkovic, C., Cabou, C., Gayral, S., Martinez, L.O., and Laffargue, M. (2017). PI3K β Plays a Key Role in Apolipoprotein A-I-Induced Endothelial Cell Proliferation Through Activation of the Ecto-F1-ATPase/P2Y1 Receptors. *Cell. Physiol. Biochem.* *42*, 579–593.
- Cathcart, M.-C., Tamosiuniene, R., Chen, G., Neilan, T.G., Bradford, A., O’Byrne, K.J., Fitzgerald, D.J., and Pidgeon, G.P. (2008). Cyclooxygenase-2-linked attenuation of hypoxia-induced pulmonary hypertension and intravascular thrombosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *326*, 51–58.
- Cattaneo, M., Zighetti, M.L., Lombardi, R., Martinez, C., Lecchi, A., Conley, P.B., Ware, J., and Ruggeri, Z.M. (2003). Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 1978–1983.
- Cazenave, J.-P., Ohlmann, P., Cassel, D., Eckly, A., Hechler, B., and Gachet, C. (2004). Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol* *272*, 13–28.
- Cepinskas, G., Sandig, M., and Kvietys, P.R. (1999). PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. *J. Cell. Sci.* *112 (Pt 12)*, 1937–1945.
- Chakraborty, K., Khan, G.A., Banerjee, P., Ray, U., and Sinha, A.K. (2003). Inhibition of human blood platelet aggregation and the stimulation of nitric oxide synthesis by aspirin. *Platelets* *14*, 421–427.
- Chan, J.R., Hyduk, S.J., and Cybulsky, M.I. (2001). Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte α 4 integrin affinity for vascular cell adhesion

- molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J Exp Med* *193*, 1149–1158.
- Chauhan, A.K., Kisucka, J., Cozzi, M.R., Walsh, M.T., Moretti, F.A., Battiston, M., Mazzucato, M., De Marco, L., Baralle, F.E., Wagner, D.D., et al. (2008). Prothrombotic effects of fibronectin isoforms containing the EDA domain. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 296–301.
- Chen, C.H., Lo, R.W., Urban, D., Pluthero, F.G., and Kahr, W.H.A. (2017a). α -granule biogenesis: from disease to discovery. *Platelets* *28*, 147–154.
- Chen, J., Diacovo, T.G., Grenache, D.G., Santoro, S.A., and Zutter, M.M. (2002). The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am. J. Pathol.* *161*, 337–344.
- Chen, J., Luo, Y., Hui, H., Cai, T., Huang, H., Yang, F., Feng, J., Zhang, J., and Yan, X. (2017b). CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, E7622–E7631.
- Chew, D.P., Bhatt, D.L., Sapp, S., and Topol, E.J. (2001). Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation* *103*, 201–206.
- Chintala, M., Strony, J., Yang, B., Kurowski, S., and Li, Q. (2010). SCH 602539, a protease-activated receptor-1 antagonist, inhibits thrombosis alone and in combination with cangrelor in a Folts model of arterial thrombosis in cynomolgus monkeys. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 2143–2149.
- Cho, J., and Mosher, D.F. (2006). Impact of fibronectin assembly on platelet thrombus formation in response to type I collagen and von Willebrand factor. *Blood* *108*, 2229–2236.
- Chorawala, M.R., Prakash, P., Doddapattar, P., Jain, M., Dhanesha, N., and Chauhan, A.K. (2018). Deletion of Extra Domain A of Fibronectin Reduces Acute Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury in Hyperlipidaemic Mice by Limiting Thrombo-Inflammation. *Thromb. Haemost.* *118*, 1450–1460.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., Smyth, S.S., Schoenwaelder, S.M., Fischer, T.H., and White, G.C. (2005). Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *J. Clin. Invest.* *115*, 680–687.
- 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., et al. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* *13*, 463–469.
- Cleator, J.H., Zhu, W.Q., Vaughan, D.E., and Hamm, H.E. (2006). Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood* *107*, 2736–2744.
- Clemetson, J.M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T.N., and Clemetson, K.J. (1999). The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily

- closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J. Biol. Chem.* *274*, 29019–29024.
- Colonna, M., Samaridis, J., and Angman, L. (2000). Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *30*, 697–704.
- Consonni, A., Cipolla, L., Guidetti, G., Canobbio, I., Ciruolo, E., Hirsch, E., Falasca, M., Okigaki, M., Balduini, C., and Torti, M. (2012). Role and regulation of phosphatidylinositol 3-kinase β in platelet integrin $\alpha 2\beta 1$ signaling. *Blood* *119*, 847–856.
- Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, M.G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., et al. (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 9815–9820.
- Cornelissen, I., Palmer, D., David, T., Wilsbacher, L., Concengco, C., Conley, P., Pandey, A., and Coughlin, S.R. (2010). Roles and interactions among protease-activated receptors and P2ry12 in hemostasis and thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 18605–18610.
- Cosemans, J.M.E.M., Munnix, I.C.A., Wetzker, R., Heller, R., Jackson, S.P., and Heemskerk, J.W.M. (2006). Continuous signaling via PI3K isoforms beta and gamma is required for platelet ADP receptor function in dynamic thrombus stabilization. *Blood* *108*, 3045–3052.
- Coughlin, S.R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J. Thromb. Haemost.* *3*, 1800–1814.
- Cramer, E.M., Meyer, D., le Menn, R., and Breton-Gorius, J. (1985). Eccentric localization of von Willebrand factor in an internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-Palade bodies. *Blood* *66*, 710–713.
- Cramer, E.M., Debili, N., Martin, J.F., Gladwin, A.M., Breton-Gorius, J., Harrison, P., Savidge, G.F., and Vainchenker, W. (1989). Uncoordinated expression of fibrinogen compared with thrombospondin and von Willebrand factor in maturing human megakaryocytes. *Blood* *73*, 1123–1129.
- Daëron, M. (1997). Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 203–234.
- Dale, C., and Hurley, J.V. (1977). An electron-microscope study of the mechanism of bleeding in experimental thrombocytopenia. *J. Pathol.* *121*, 193–204.
- Dangelmaier, C., Jin, J., Smith, J.B., and Kunapuli, S.P. (2001). Potentiation of thromboxane A2-induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway. *Thromb. Haemost.* *85*, 341–348.
- Danielli, J.F. (1940). Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *J. Physiol. (Lond.)* *98*, 109–129.
- Das, J., Sharma, A., Jindal, A., Aggarwal, V., and Rawat, A. (2020). Leukocyte adhesion defect: Where do we stand circa 2019? *Genes Dis* *7*, 107–114.

- Davel, A.P., Wenceslau, C.F., Akamine, E.H., Xavier, F.E., Couto, G.K., Oliveira, H.T., and Rossoni, L.V. (2011). Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res* 44, 920–932.
- Davì, G., Santilli, F., and Vazzana, N. (2012). Thromboxane receptors antagonists and/or synthase inhibitors. *Handb Exp Pharmacol* 261–286.
- De Meyer, S.F., Denorme, F., Langhauser, F., Geuss, E., Fluri, F., and Kleinschnitz, C. (2016). Thromboinflammation in Stroke Brain Damage. *Stroke* 47, 1165–1172.
- Defreyn, G., Machin, S.J., Carreras, L.O., Dauden, M.V., Chamone, D.A., and Vermynen, J. (1981). Familial bleeding tendency with partial platelet thromboxane synthetase deficiency: reorientation of cyclic endoperoxide metabolism. *Br. J. Haematol.* 49, 29–41.
- Degen, H., Borst, O., Ziegler, M., Mojica Munoz, A.-K., Jamasbi, J., Walker, B., Göbel, S., Fassbender, J., Adler, K., Brandl, R., et al. (2017). ADPase CD39 Fused to Glycoprotein VI-Fc Boosts Local Antithrombotic Effects at Vascular Lesions. *J Am Heart Assoc* 6.
- Delclaux, C., Delacourt, C., D’Ortho, M.P., Boyer, V., Lafuma, C., and Harf, A. (1996). Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14, 288–295.
- Demers, M., Ho-Tin-Noé, B., Schatzberg, D., Yang, J.J., and Wagner, D.D. (2011). Increased efficacy of breast cancer chemotherapy in thrombocytopenic mice. *Cancer Res.* 71, 1540–1549.
- Deng, W., Xu, Y., Chen, W., Paul, D.S., Syed, A.K., Dragovich, M.A., Liang, X., Zakas, P., Berndt, M.C., Di Paola, J., et al. (2016). Platelet clearance via shear-induced unfolding of a membrane mechanoreceptor. *Nat Commun* 7, 12863.
- Deppermann, C., Kraft, P., Volz, J., Schuhmann, M.K., Beck, S., Wolf, K., Stegner, D., Stoll, G., and Nieswandt, B. (2017). Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice. *Blood* 129, 1702–1706.
- Derian, C.K., Damiano, B.P., Addo, M.F., Darrow, A.L., D’Andrea, M.R., Nedelman, M., Zhang, H.-C., Maryanoff, B.E., and Andrade-Gordon, P. (2003). Blockade of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 with a small-molecule antagonist prevents thrombus formation and vascular occlusion in nonhuman primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 855–861.
- Dhanesha, N., Ahmad, A., Prakash, P., Doddapattar, P., Lentz, S.R., and Chauhan, A.K. (2015). Genetic Ablation of Extra Domain A of Fibronectin in Hypercholesterolemic Mice Improves Stroke Outcome by Reducing Thrombo-Inflammation. *Circulation* 132, 2237–2247.
- Dhanesha, N., Chorawala, M.R., Jain, M., Bhalla, A., Thedens, D., Nayak, M., Doddapattar, P., and Chauhan, A.K. (2019). Fn-EDA (Fibronectin Containing Extra Domain A) in the Plasma, but Not Endothelial Cells, Exacerbates Stroke Outcome by Promoting Thrombo-Inflammation. *Stroke* 50, 1201–1209.
- Di Paola, J., Jugessur, A., Goldman, T., Reiland, J., Tallman, D., Sayago, C., and Murray, J.C. (2005). Platelet glycoprotein I(b)alpha and integrin alpha2 beta1 polymorphisms: gene

- frequencies and linkage disequilibrium in a population diversity panel. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1511–1521.
- Doddapattar, P., Gandhi, C., Prakash, P., Dhanesha, N., Grumbach, I.M., Dailey, M.E., Lentz, S.R., and Chauhan, A.K. (2015). Fibronectin Splicing Variants Containing Extra Domain A Promote Atherosclerosis in Mice Through Toll-Like Receptor 4. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 2391–2400.
- Doddapattar, P., Jain, M., Dhanesha, N., Lentz, S.R., and Chauhan, A.K. (2018). Fibronectin Containing Extra Domain A Induces Plaque Destabilization in the Innominate Artery of Aged Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 500–508.
- Drury, D.R., and McMaster, P.D. (1929). THE LIVER AS THE SOURCE OF FIBRINOGEN. *J. Exp. Med.* 50, 569–578.
- Du, X., Beutler, L., Ruan, C., Castaldi, P.A., and Berndt, M.C. (1987). Glycoprotein Ib and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane. *Blood* 69, 1524–1527.
- Du, X.-Y., Clemetson, J.M., Navdaev, A., Magnenat, E.M., Wells, T.N.C., and Clemetson, K.J. (2002). Ophioluxin, a convulxin-like C-type lectin from *Ophiophagus hannah* (King cobra) is a powerful platelet activator via glycoprotein VI. *J. Biol. Chem.* 277, 35124–35132.
- Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Merrill-Skoloff, G., Furie, B., and Furie, B.C. (2006). Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* 107, 3902–3906.
- Duffau, P., Seneschal, J., Nicco, C., Richez, C., Lazaro, E., Douchet, I., Bordes, C., Viillard, J.-F., Goulvestre, C., Pellegrin, J.-L., et al. (2010). Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2, 47ra63.
- Dumont, B., Lasne, D., Rothschild, C., Bouabdelli, M., Ollivier, V., Oudin, C., Ajzenberg, N., Grandchamp, B., and Jandrot-Perrus, M. (2009). Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations. *Blood* 114, 1900–1903.
- Dupuy, E., Soria, C., Molho, P., Zini, J.M., Rosenstingl, S., Laurian, C., Bruneval, P., and Tobelem, G. (2001). Embolized ischemic lesions of toes in an afibrinogenemic patient: possible relevance to in vivo circulating thrombin. *Thromb Res* 102, 211–219.
- Earwood, J.S., and Thompson, T.D. (2015). Hemoptysis: evaluation and management. *Am Fam Physician* 91, 243–249.
- Eckly, A., Hechler, B., Freund, M., Zerr, M., Cazenave, J.-P., Lanza, F., Mangin, P.H., and Gachet, C. (2011). Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 9, 779–789.
- Eckly, A., Rinckel, J.-Y., Proamer, F., Ulas, N., Joshi, S., Whiteheart, S.W., and Gachet, C. (2016). Respective contributions of single and compound granule fusion to secretion by activated platelets. *Blood* 128, 2538–2549.

- Edelson, B.T., Stricker, T.P., Li, Z., Dickeson, S.K., Shepherd, V.L., Santoro, S.A., and Zutter, M.M. (2006). Novel collectin/C1q receptor mediates mast cell activation and innate immunity. *Blood* 107, 143–150.
- Eitzman, D.T., Westrick, R.J., Nabel, E.G., and Ginsburg, D. (2000). Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice. *Blood* 95, 577–580.
- Elices, M.J., and Hemler, M.E. (1989). The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9906–9910.
- Erhardt, J.A., Toomey, J.R., Douglas, S.A., and Johns, D.G. (2006). P2X1 stimulation promotes thrombin receptor-mediated platelet aggregation. *J. Thromb. Haemost.* 4, 882–890.
- Escolar, G., Leistikow, E., and White, J.G. (1989). The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets. *Blood* 74, 1983–1988.
- Ezumi, Y., Shindoh, K., Tsuji, M., and Takayama, H. (1998). Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets. *J. Exp. Med.* 188, 267–276.
- Fabre, J.E., Nguyen, M., Latour, A., Keifer, J.A., Audoly, L.P., Coffman, T.M., and Koller, B.H. (1999). Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat. Med.* 5, 1199–1202.
- Fay, P.J., Coumans, J.V., and Walker, F.J. (1991). von Willebrand factor mediates protection of factor VIII from activated protein C-catalyzed inactivation. *J. Biol. Chem.* 266, 2172–2177.
- Felding-Habermann, B. (2001). Tumor cell-platelet interaction in metastatic disease. *Haemostasis* 31 Suppl 1, 55–58.
- Felding-Habermann, B., and Cheresch, D.A. (1993). Vitronectin and its receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 864–868.
- Ffrench-Constant, C. (1995). Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions. *Exp. Cell Res.* 221, 261–271.
- Finney, B.A., Schweighoffer, E., Navarro-Núñez, L., Bénézech, C., Barone, F., Hughes, C.E., Langan, S.A., Lowe, K.L., Pollitt, A.Y., Mourao-Sa, D., et al. (2012). CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood* 119, 1747–1756.
- Fogerty, F.J., Akiyama, S.K., Yamada, K.M., and Mosher, D.F. (1990). Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by anti-integrin (alpha 5 beta 1) antibodies. *J. Cell Biol.* 111, 699–708.
- Fontana, P., Zufferey, A., Daali, Y., and Reny, J.-L. (2014). Antiplatelet therapy: targeting the TxA2 pathway. *J Cardiovasc Transl Res* 7, 29–38.
- Fontayne, A., Meiring, M., Lamprecht, S., Roodt, J., Demarsin, E., Barbeaux, P., and Deckmyn, H. (2008). The humanized anti-glycoprotein Ib monoclonal antibody h6B4-Fab is a

- potent and safe antithrombotic in a high shear arterial thrombosis model in baboons. *Thromb Haemost* 100, 670–677.
- Francis, S.E., Goh, K.L., Hodivala-Dilke, K., Bader, B.L., Stark, M., Davidson, D., and Hynes, R.O. (2002). Central roles of alpha5beta1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 927–933.
- Frismantiene, A., Philippova, M., Erne, P., and Resink, T.J. (2018). Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cell. Signal.* 52, 48–64.
- Fuller, G.L.J., Williams, J.A.E., Tomlinson, M.G., Eble, J.A., Hanna, S.L., Pöhlmann, S., Suzuki-Inoue, K., Ozaki, Y., Watson, S.P., and Pearce, A.C. (2007). The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 282, 12397–12409.
- Fung, C.Y.E., Cendana, C., Farndale, R.W., and Mahaut-Smith, M.P. (2007). Primary and secondary agonists can use P2X(1) receptors as a major pathway to increase intracellular Ca(2+) in the human platelet. *J. Thromb. Haemost.* 5, 910–917.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788.
- Gachet, C. (2005). The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacol Ther* 108, 180–192.
- Gachet, C. (2006). Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46, 277–300.
- Gachet, C. (2008). P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb. Haemost.* 99, 466–472.
- Gachet, C. (2015). Antiplatelet drugs: which targets for which treatments? *J. Thromb. Haemost.* 13 Suppl 1, S313-322.
- Gachet, C., Léon, C., and Hechler, B. (2006). The platelet P2 receptors in arterial thrombosis. *Blood Cells Mol Dis* 36, 223–227.
- van Galen, K.P.M., Mauser-Bunschoten, E.P., and Leebeek, F.W.G. (2012). Hemophilic arthropathy in patients with von Willebrand disease. *Blood Rev* 26, 261–266.
- Gao, J., Huang, M., Lai, J., Mao, K., Sun, P., Cao, Z., Hu, Y., Zhang, Y., Schulte, M.L., Jin, C., et al. (2017). Kindlin supports platelet integrin α IIb β 3 activation by interacting with paxillin. *J. Cell. Sci.* 130, 3764–3775.
- Garcia, J.G., Davis, H.W., and Patterson, C.E. (1995). Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J. Cell. Physiol.* 163, 510–522.

- García Rodríguez, L.A., Martín-Pérez, M., Hennekens, C.H., Rothwell, P.M., and Lanas, A. (2016). Bleeding Risk with Long-Term Low-Dose Aspirin: A Systematic Review of Observational Studies. *PLoS One* *11*, e0160046.
- Gardiner, E.E., Arthur, J.F., Kahn, M.L., Berndt, M.C., and Andrews, R.K. (2004). Regulation of platelet membrane levels of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase. *Blood* *104*, 3611–3617.
- Gasic, G.J., Gasic, T.B., and Stewart, C.C. (1968). Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *61*, 46–52.
- Georas, S.N., McIntyre, B.W., Ebisawa, M., Bednarczyk, J.L., Sterbinsky, S.A., Schleimer, R.P., and Bochner, B.S. (1993). Expression of a functional laminin receptor (alpha 6 beta 1, very late activation antigen-6) on human eosinophils. *Blood* *82*, 2872–2879.
- George, E.L., Georges-Labouesse, E.N., Patel-King, R.S., Rayburn, H., and Hynes, R.O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* *119*, 1079–1091.
- van Gestel, M.A., Heemskerk, J.W.M., Slaaf, D.W., Heijnen, V.V.T., Reneman, R.S., and oude Egbrink, M.G.A. (2003). In vivo blockade of platelet ADP receptor P2Y12 reduces embolus and thrombus formation but not thrombus stability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 518–523.
- Getz, T.M., Dangelmaier, C.A., Jin, J., Daniel, J.L., and Kunapuli, S.P. (2010). Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional implications in platelets. *J. Thromb. Haemost.* *8*, 2283–2293.
- Giblin, J.P., Hewlett, L.J., and Hannah, M.J. (2008). Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood* *112*, 957–964.
- Gilbert, J.C., DeFeo-Fraulini, T., Hutabarat, R.M., Horvath, C.J., Merlino, P.G., Marsh, H.N., Healy, J.M., Boufakhreddine, S., Holohan, T.V., and Schaub, R.G. (2007). First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation* *116*, 2678–2686.
- Gimbrone, M.A., and García-Cardena, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* *118*, 620–636.
- Gimbrone, M.A., Aster, R.H., Cotran, R.S., Corkery, J., Jandl, J.H., and Folkman, J. (1969). Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. *Nature* *222*, 33–36.
- Giordano, A., Musumeci, G., D'Angelillo, A., Rossini, R., Zoccai, G.B., Messina, S., Coscioni, E., Romano, S., and Romano, M.F. (2016). Effects Of Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists: Anti Platelet Aggregation And Beyond. *Curr. Drug Metab.* *17*, 194–203.
- Gitz, E., Pollitt, A.Y., Gitz-Francois, J.J., Alshehri, O., Mori, J., Montague, S., Nash, G.B., Douglas, M.R., Gardiner, E.E., Andrews, R.K., et al. (2014). CLEC-2 expression is maintained on activated platelets and on platelet microparticles. *Blood* *124*, 2262–2270.

- Giuliano, S., Nesbitt, W.S., Rooney, M., and Jackson, S.P. (2003). Bidirectional integrin alphaIIb beta3 signalling regulating platelet adhesion under flow: contribution of protein kinase C. *Biochem. J.* *372*, 163–172.
- Goerge, T., Ho-Tin-Noe, B., Carbo, C., Benarafa, C., Remold-O'Donnell, E., Zhao, B.-Q., Cifuni, S.M., and Wagner, D.D. (2008). Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* *111*, 4958–4964.
- Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S.C.-T., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Kozasa, T., and Du, X. (2010). G protein subunit G α 13 binds to integrin alphaIIb beta3 and mediates integrin “outside-in” signaling. *Science* *327*, 340–343.
- Goschnick, M.W., Lau, L.-M., Wee, J.L., Liu, Y.S., Hogarth, P.M., Robb, L.M., Hickey, M.J., Wright, M.D., and Jackson, D.E. (2006). Impaired “outside-in” integrin alphaIIb beta3 signaling and thrombus stability in TSSC6-deficient mice. *Blood* *108*, 1911–1918.
- Gospodarowicz, D., Greenburg, G., Foidart, J.M., and Savion, N. (1981). The production and localization of laminin in cultured vascular and corneal endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* *107*, 171–183.
- Goto, S., Salomon, D.R., Ikeda, Y., and Ruggeri, Z.M. (1995). Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. *J. Biol. Chem.* *270*, 23352–23361.
- Gratacap, M.P., Payrastre, B., Viala, C., Mauco, G., Plantavid, M., and Chap, H. (1998). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C-gamma2 is an early key event in Fc gamma RIIA-mediated activation of human platelets. *J. Biol. Chem.* *273*, 24314–24321.
- Gratacap, M.-P., Guillermet-Guibert, J., Martin, V., Chicanne, G., Tronchère, H., Gaits-Iacovoni, F., and Payrastre, B. (2011). Regulation and roles of PI3K β , a major actor in platelet signaling and functions. *Adv. Enzyme Regul.* *51*, 106–116.
- Gremmel, T., Frelinger, A.L., and Michelson, A.D. (2016). Platelet Physiology. *Semin. Thromb. Hemost.* *42*, 191–204.
- Gröger, M., Niederleithner, H., Kerjaschki, D., and Petzelbauer, P. (2007). A previously unknown dermal blood vessel phenotype in skin inflammation. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 2893–2900.
- Gros, A., Ollivier, V., and Ho-Tin-Noé, B. (2014). Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair. *Front Immunol* *5*, 678.
- Gros, A., Syvannarath, V., Lamrani, L., Ollivier, V., Loyau, S., Goerge, T., Nieswandt, B., Jandrot-Perrus, M., and Ho-Tin-Noé, B. (2015). Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood* *126*, 1017–1026.
- Gross, B.S., Lee, J.R., Clements, J.L., Turner, M., Tybulewicz, V.L., Findell, P.R., Koretzky, G.A., and Watson, S.P. (1999). Tyrosine phosphorylation of SLP-76 is downstream of Syk following stimulation of the collagen receptor in platelets. *J. Biol. Chem.* *274*, 5963–5971.

- Gubbiotti, M.A., Neill, T., and Iozzo, R.V. (2017). A current view of perlecan in physiology and pathology: A mosaic of functions. *Matrix Biol.* 57–58, 285–298.
- Guidetti, G., Bertoni, A., Viola, M., Tira, E., Balduini, C., and Torti, M. (2002). The small proteoglycan decorin supports adhesion and activation of human platelets. *Blood* 100, 1707–1714.
- Guidetti, G.F., Lova, P., Bernardi, B., Campus, F., Baldanzi, G., Graziani, A., Balduini, C., and Torti, M. (2008). The Gi-coupled P2Y₁₂ receptor regulates diacylglycerol-mediated signaling in human platelets. *J. Biol. Chem.* 283, 28795–28805.
- Gupta, S., Konradt, C., Corken, A., Ware, J., Nieswandt, B., Di Paola, J., Yu, M., Wang, D., Nieman, M.T., Whiteheart, S.W., et al. (2020). Hemostasis vs. homeostasis: Platelets are essential for preserving vascular barrier function in the absence of injury or inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 24316–24325.
- Habart, D., Cheli, Y., Nugent, D.J., Ruggeri, Z.M., and Kunicki, T.J. (2013). Conditional knockout of integrin $\alpha 2\beta 1$ in murine megakaryocytes leads to reduced mean platelet volume. *PLoS ONE* 8, e55094.
- Hägg, P., Rehn, M., Huhtala, P., Väisänen, T., Tamminen, M., and Pihlajaniemi, T. (1998). Type XIII collagen is identified as a plasma membrane protein. *J. Biol. Chem.* 273, 15590–15597.
- Haining, E.J., Cherpokova, D., Wolf, K., Becker, I.C., Beck, S., Eble, J.A., Stegner, D., Watson, S.P., and Nieswandt, B. (2017). CLEC-2 contributes to hemostasis independently of classical hemITAM signaling in mice. *Blood* 130, 2224–2228.
- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F., and Sorokin, L.M. (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol. Rev.* 85, 979–1000.
- Halushka, P.V., Mais, D.E., and Garvin, M. (1986). Binding of a thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor antagonist to guinea-pig platelets. *Eur. J. Pharmacol.* 131, 49–54.
- Hamberg, M., Svensson, J., and Samuelsson, B. (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2994–2998.
- Hamilton, J.R., Cornelissen, I., and Coughlin, S.R. (2004). Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 2, 1429–1435.
- Handt, S., Jerome, W.G., Tietze, L., and Hantgan, R.R. (1996). Plasminogen activator inhibitor-1 secretion of endothelial cells increases fibrinolytic resistance of an in vitro fibrin clot: evidence for a key role of endothelial cells in thrombolytic resistance. *Blood* 87, 4204–4213.
- Hara, T., Shimizu, K., Ogawa, F., Yanaba, K., Iwata, Y., Muroi, E., Takenaka, M., Komura, K., Hasegawa, M., Fujimoto, M., et al. (2010). Platelets control leukocyte recruitment in a murine model of cutaneous arthus reaction. *Am. J. Pathol.* 176, 259–269.

- Harburger, D.S., Bouaouina, M., and Calderwood, D.A. (2009). Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects. *J Biol Chem* 284, 11485–11497.
- Harrison, P., and Cramer, E.M. (1993). Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 7, 52–62.
- Harrison, P., Savidge, G.F., and Cramer, E.M. (1990). The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. *Br. J. Haematol.* 74, 125–130.
- Hawiger, J., and Zienkiewicz, J. (2019). Decoding inflammation, its causes, genomic responses, and emerging countermeasures. *Scand. J. Immunol.* 90, e12812.
- Haydari, Z., Shams, H., Jahed, Z., and Mofrad, M.R.K. (2020). Kindlin Assists Talin to Promote Integrin Activation. *Biophys. J.*
- He, L., Pappan, L.K., Grenache, D.G., Li, Z., Tollefsen, D.M., Santoro, S.A., and Zutter, M.M. (2003a). The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood* 102, 3652–3657.
- He, L., Pappan, L.K., Grenache, D.G., Li, Z., Tollefsen, D.M., Santoro, S.A., and Zutter, M.M. (2003b). The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood* 102, 3652–3657.
- Hechler, B., and Gachet, C. (2011a). Comparison of two murine models of thrombosis induced by atherosclerotic plaque injury. *Thromb. Haemost.* 105 Suppl 1, S3-12.
- Hechler, B., and Gachet, C. (2011b). P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal.* 7, 293–303.
- Hechler, B., Léon, C., Vial, C., Vigne, P., Frelin, C., Cazenave, J.P., and Gachet, C. (1998). The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 92, 152–159.
- Hechler, B., Lenain, N., Marchese, P., Vial, C., Heim, V., Freund, M., Cazenave, J.-P., Cattaneo, M., Ruggeri, Z.M., Evans, R., et al. (2003). A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *J. Exp. Med.* 198, 661–667.
- Hechler, B., Magnenat, S., Zighetti, M.L., Kassack, M.U., Ullmann, H., Cazenave, J.-P., Evans, R., Cattaneo, M., and Gachet, C. (2005). Inhibition of platelet functions and thrombosis through selective or nonselective inhibition of the platelet P2 receptors with increasing doses of NF449 [4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis-(carbonylimino)))tetrakis-benzene-1,3-disulfonic acid octasodium salt]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 232–243.
- Hechler, B., Nonne, C., Roh, E.J., Cattaneo, M., Cazenave, J.-P., Lanza, F., Jacobson, K.A., and Gachet, C. (2006). MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 556–563.
- Hechler, B., Nonne, C., Eckly, A., Magnenat, S., Rinckel, J.-Y., Denis, C.V., Freund, M., Cazenave, J.-P., Lanza, F., and Gachet, C. (2010). Arterial thrombosis: relevance of a

- model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J. Thromb. Haemost.* 8, 173–184.
- Heemskerk, J.W.M., Kuijpers, M.J.E., Munnix, I.C.A., and Siljander, P.R.M. (2005). Platelet collagen receptors and coagulation. A characteristic platelet response as possible target for antithrombotic treatment. *Trends Cardiovasc. Med.* 15, 86–92.
- Heino, J. (2007). The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays* 29, 1001–1010.
- Heltianu, C., Simionescu, M., and Simionescu, N. (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, 357–364.
- Hemler, M.E., Huang, C., and Schwarz, L. (1987). The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight beta subunit. *J. Biol. Chem.* 262, 3300–3309.
- Hemler, M.E., Crouse, C., Takada, Y., and Sonnenberg, A. (1988). Multiple very late antigen (VLA) heterodimers on platelets. Evidence for distinct VLA-2, VLA-5 (fibronectin receptor), and VLA-6 structures. *J. Biol. Chem.* 263, 7660–7665.
- Henriksen, R.A., and Hanks, V.K. (2002). PAR-4 agonist AYPGKF stimulates thromboxane production by human platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 861–866.
- Hermans, C., Wittevrongel, C., Thys, C., Smethurst, P.A., Van Geet, C., and Freson, K. (2009). A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder. *J. Thromb. Haemost.* 7, 1356–1363.
- Herzog, B.H., Fu, J., Wilson, S.J., Hess, P.R., Sen, A., McDaniel, J.M., Pan, Y., Sheng, M., Yago, T., Silasi-Mansat, R., et al. (2013). Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature* 502, 105–109.
- Hickey, M.J., Williams, S.A., and Roth, G.J. (1989). Human platelet glycoprotein IX: an adhesive prototype of leucine-rich glycoproteins with flank-center-flank structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6773–6777.
- Hidalgo, A., Peired, A.J., Wild, M., Vestweber, D., and Frenette, P.S. (2007). Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* 26, 477–489.
- Hildebrand, A., Romarís, M., Rasmussen, L.M., Heinegård, D., Twardzik, D.R., Border, W.A., and Ruoslahti, E. (1994). Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem. J.* 302 (Pt 2), 527–534.
- Hillgruber, C., Pöppelmann, B., Weishaupt, C., Steingraber, A.K., Wessel, F., Berdel, W.E., Gessner, J.E., Ho-Tin-Noé, B., Vestweber, D., and Goerge, T. (2015). Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia. *J. Exp. Med.* 212, 1255–1266.

- Hindriks, G., Ijsseldijk, M.J., Sonnenberg, A., Sixma, J.J., and de Groot, P.G. (1992). Platelet adhesion to laminin: role of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions, shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *Blood* 79, 928–935.
- Hinze, A.V., Mayer, P., Harst, A., and von Kügelgen, I. (2013). P2X1 receptor-mediated inhibition of the proliferation of human coronary smooth muscle cells involving the transcription factor NR4A1. *Purinergic Signal*. 9, 677–686.
- Hirahashi, J., Hishikawa, K., Kaname, S., Tsuboi, N., Wang, Y., Simon, D.I., Stavrakis, G., Shimosawa, T., Xiao, L., Nagahama, Y., et al. (2009). Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation* 120, 1255–1265.
- Hocking, D.C., Sottile, J., and McKeown-Longo, P.J. (1994). Fibronectin's III-1 module contains a conformation-dependent binding site for the amino-terminal region of fibronectin. *J. Biol. Chem.* 269, 19183–19187.
- Hodivala-Dilke, K.M., McHugh, K.P., Tsakiris, D.A., Rayburn, H., Crowley, D., Ullman-Culleré, M., Ross, F.P., Collier, B.S., Teitelbaum, S., and Hynes, R.O. (1999). Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J. Clin. Invest.* 103, 229–238.
- Hohmann, J.D., Wang, X., Krajewski, S., Selan, C., Haller, C.A., Straub, A., Chaikof, E.L., Nandurkar, H.H., Hagemeyer, C.E., and Peter, K. (2013). Delayed targeting of CD39 to activated platelet GPIIb/IIIa via a single-chain antibody: breaking the link between antithrombotic potency and bleeding? *Blood* 121, 3067–3075.
- Holmbäck, K., Danton, M.J., Suh, T.T., Daugherty, C.C., and Degen, J.L. (1996). Impaired platelet aggregation and sustained bleeding in mice lacking the fibrinogen motif bound by integrin alpha IIb beta 3. *EMBO J.* 15, 5760–5771.
- Holtkötter, O., Nieswandt, B., Smyth, N., Müller, W., Hafner, M., Schulte, V., Krieg, T., and Eckes, B. (2002). Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J. Biol. Chem.* 277, 10789–10794.
- Ho-Tin-Noé, B., Goerge, T., Cifuni, S.M., Duerschmied, D., and Wagner, D.D. (2008). Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res.* 68, 6851–6858.
- Ho-Tin-Noé, B., Carbo, C., Demers, M., Cifuni, S.M., Goerge, T., and Wagner, D.D. (2009). Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *Am. J. Pathol.* 175, 1699–1708.
- Hu, P., and Luo, B.-H. (2015). Integrin α IIb β 3 transmembrane domain separation mediates bi-directional signaling across the plasma membrane. *PLoS ONE* 10, e0116208.
- Huang, A.J., Manning, J.E., Bandak, T.M., Ratau, M.C., Hanser, K.R., and Silverstein, S.C. (1993). Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J. Cell Biol.* 120, 1371–1380.
- Huang, J., Shi, X., Xi, W., Liu, P., Long, Z., and Xi, X. (2015). Evaluation of targeting c-Src by the RGT-containing peptide as a novel antithrombotic strategy. *J Hematol Oncol* 8, 62.

- Huang, J., Li, X., Shi, X., Zhu, M., Wang, J., Huang, S., Huang, X., Wang, H., Li, L., Deng, H., et al. (2019). Platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *J Hematol Oncol* *12*, 26.
- Hughan, S.C., and Watson, S.P. (2007). Differential regulation of adapter proteins Dok2 and Dok1 in platelets, leading to an association of Dok2 with integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *J. Thromb. Haemost.* *5*, 387–394.
- Hughes, C.E., Navarro-Núñez, L., Finney, B.A., Mourão-Sá, D., Pollitt, A.Y., and Watson, S.P. (2010). CLEC-2 is not required for platelet aggregation at arteriolar shear. *J. Thromb. Haemost.* *8*, 2328–2332.
- Hung, D.T., Vu, T.K., Wheaton, V.I., Ishii, K., and Coughlin, S.R. (1992). Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. *J. Clin. Invest.* *89*, 1350–1353.
- Hurskainen, M., Ruggiero, F., Hägg, P., Pihlajaniemi, T., and Huhtala, P. (2010). Recombinant human collagen XV regulates cell adhesion and migration. *J. Biol. Chem.* *285*, 5258–5265.
- Hutchinson, R.M., Davis, P., and Jayson, M.I. (1976). Thrombocytosis in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* *35*, 138–142.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673–687.
- Iannacone, M., Sitia, G., Isogawa, M., Whitmire, J.K., Marchese, P., Chisari, F.V., Ruggeri, Z.M., and Guidotti, L.G. (2008). Platelets prevent IFN- α / β -induced lethal hemorrhage promoting CTL-dependent clearance of lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 629–634.
- Ilkan, Z., Watson, S., Watson, S.P., and Mahaut-Smith, M.P. (2018). P2X1 Receptors Amplify Fc γ RIIa-Induced Ca $^{2+}$ Increases and Functional Responses in Human Platelets. *Thromb. Haemost.* *118*, 369–380.
- Ill, C.R., and Ruoslahti, E. (1985). Association of thrombin-antithrombin III complex with vitronectin in serum. *J. Biol. Chem.* *260*, 15610–15615.
- Ill, C.R., Engvall, E., and Ruoslahti, E. (1984). Adhesion of platelets to laminin in the absence of activation. *J. Cell Biol.* *99*, 2140–2145.
- Induruwa, I., Moroi, M., Bonna, A., Malcor, J.-D., Howes, J.-M., Warburton, E.A., Farndale, R.W., and Jung, S.M. (2018). Platelet collagen receptor Glycoprotein VI-dimer recognizes fibrinogen and fibrin through their D-domains, contributing to platelet adhesion and activation during thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* *16*, 389–404.
- Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., Dean, W.L., Frampton, J., and Watson, S.P. (2003). Integrin $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLC γ2 . *J. Cell Biol.* *160*, 769–780.
- Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., McCarty, O.J.T., Moroi, M., Ruggeri, Z.M., Kunicki, T.J., Ozaki, Y., and Watson, S.P. (2006). Laminin stimulates spreading of platelets through integrin $\alpha\text{6}\beta\text{1}$ -dependent activation of GPVI. *Blood* *107*, 1405–1412.

- Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., and Ozaki, Y. (2008). Redundant mechanism of platelet adhesion to laminin and collagen under flow: involvement of von Willebrand factor and glycoprotein Ib-IX-V. *J. Biol. Chem.* *283*, 16279–16282.
- Inoue, O., Hokamura, K., Shirai, T., Osada, M., Tsukiji, N., Hatakeyama, K., Umemura, K., Asada, Y., Suzuki-Inoue, K., and Ozaki, Y. (2015). Vascular Smooth Muscle Cells Stimulate Platelets and Facilitate Thrombus Formation through Platelet CLEC-2: Implications in Atherothrombosis. *PLoS ONE* *10*, e0139357.
- Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* *42*, 11–55.
- Isenberg, J.S., Romeo, M.J., Yu, C., Yu, C.K., Nghiem, K., Monsale, J., Rick, M.E., Wink, D.A., Frazier, W.A., and Roberts, D.D. (2008). Thrombospondin-1 stimulates platelet aggregation by blocking the antithrombotic activity of nitric oxide/cGMP signaling. *Blood* *111*, 613–623.
- Ishihara, H., Connolly, A.J., Zeng, D., Kahn, M.L., Zheng, Y.W., Timmons, C., Tram, T., and Coughlin, S.R. (1997). Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* *386*, 502–506.
- Jackson, S.P. (2011). Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat. Med.* *17*, 1423–1436.
- Jaffe, E.A., and Mosher, D.F. (1978). Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. *J. Exp. Med.* *147*, 1779–1791.
- Jaffe, E.A., Hoyer, L.W., and Nachman, R.L. (1974). Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *71*, 1906–1909.
- Jaffe, E.A., Minick, C.R., Adelman, B., Becker, C.G., and Nachman, R. (1976). Synthesis of basement membrane collagen by cultured human endothelial cells. *J. Exp. Med.* *144*, 209–225.
- Jaffe, E.A., Ruggiero, J.T., Leung, L.K., Doyle, M.J., McKeown-Longo, P.J., and Mosher, D.F. (1983). Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *80*, 998–1002.
- Jamasbi, J., Ayabe, K., Goto, S., Nieswandt, B., Peter, K., and Siess, W. (2017). Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future. *Thromb. Haemost.* *117*, 1249–1257.
- Janardhan, K.S., Charavaryamath, C., Aulakh, G.K., and Singh, B. (2012). Integrin $\beta 3$ is not critical for neutrophil recruitment in a mouse model of pneumococcal pneumonia. *Cell Tissue Res* *348*, 177–187.
- Jandrot-Perrus, M., Lagrue, A.H., Okuma, M., and Bon, C. (1997). Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin $\alpha 2\beta 1$. *J. Biol. Chem.* *272*, 27035–27041.
- Jandrot-Perrus, M., Busfield, S., Lagrue, A.H., Xiong, X., Debili, N., Chickering, T., Le Couedic, J.P., Goodearl, A., Dussault, B., Fraser, C., et al. (2000). Cloning,

- characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 96, 1798–1807.
- Jandrot-Perrus, M., Hermans, C., and Mezzano, D. (2019). Platelet glycoprotein VI genetic quantitative and qualitative defects. *Platelets* 30, 708–713.
- Jenkins, A.L., Nannizzi-Alaimo, L., Silver, D., Sellers, J.R., Ginsberg, M.H., Law, D.A., and Phillips, D.R. (1998). Tyrosine phosphorylation of the beta3 cytoplasmic domain mediates integrin-cytoskeletal interactions. *J. Biol. Chem.* 273, 13878–13885.
- Jennings, L.K., and Phillips, D.R. (1982). Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex. *J. Biol. Chem.* 257, 10458–10466.
- Jessica, M.-O., Fiorella, R., Ocatavio, S., Linnette, R., Nahomy, L., Kanth, M.B., Bismarck, M., Rondina, M.T., and Valance, W.A. (2018). TLT-1-CONTROLS EARLY THROMBUS FORMATION AND STABILITY BY FACILITATING AIIBB3 OUTSIDE-IN SIGNALING IN MICE. *International Journal of Advanced Research* 6, 1143–1149.
- Jones, P.A., Scott-Burden, T., and Gevers, W. (1979). Glycoprotein, elastin, and collagen secretion by rat smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 353–357.
- Jung, S.M., Moroi, M., Soejima, K., Nakagaki, T., Miura, Y., Berndt, M.C., Gardiner, E.E., Howes, J.-M., Pugh, N., Bihan, D., et al. (2012). Constitutive dimerization of glycoprotein VI (GPVI) in resting platelets is essential for binding to collagen and activation in flowing blood. *J. Biol. Chem.* 287, 30000–30013.
- Jurk, K., Clemetson, K.J., de Groot, P.G., Brodde, M.F., Steiner, M., Savion, N., Varon, D., Sixma, J.J., Van Aken, H., and Kehrel, B.E. (2003). Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *FASEB J.* 17, 1490–1492.
- Kahn, M.L., Zheng, Y.W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., Farese, R.V., Tam, C., and Coughlin, S.R. (1998). A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394, 690–694.
- Kahn, M.L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M.J., Ishihara, H., and Coughlin, S.R. (1999). Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest.* 103, 879–887.
- Kappert, K., Blaschke, F., Meehan, W.P., Kawano, H., Grill, M., Fleck, E., Hsueh, W.A., Law, R.E., and Graf, K. (2001). Integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 mediate VSMC migration and are elevated during neointima formation in the rat aorta. *Basic Res. Cardiol.* 96, 42–49.
- Karas, S.P., Rosse, W.F., and Kurlander, R.J. (1982). Characterization of the IgG-Fc receptor on human platelets. *Blood* 60, 1277–1282.
- Kashiwagi, H., Schwartz, M.A., Eigenthaler, M., Davis, K.A., Ginsberg, M.H., and Shattil, S.J. (1997). Affinity modulation of platelet integrin alphaIIb beta3 by beta3-endonexin, a

- selective binding partner of the beta3 integrin cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* *137*, 1433–1443.
- Kasirer-Friede, A., Kang, J., Kahner, B., Ye, F., Ginsberg, M.H., and Shattil, S.J. (2014). ADAP interactions with talin and kindlin promote platelet integrin α IIb β 3 activation and stable fibrinogen binding. *Blood* *123*, 3156–3165.
- Kato, H. (2002). Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor: basic and clinical aspects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *22*, 539–548.
- Kato, K., Kanaji, T., Russell, S., Kunicki, T.J., Furihata, K., Kanaji, S., Marchese, P., Reininger, A., Ruggeri, Z.M., and Ware, J. (2003). The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* *102*, 1701–1707.
- Kato, K., Martinez, C., Russell, S., Nurden, P., Nurden, A., Fiering, S., and Ware, J. (2004). Genetic deletion of mouse platelet glycoprotein Ibbeta produces a Bernard-Soulier phenotype with increased alpha-granule size. *Blood* *104*, 2339–2344.
- Kattula, S., Byrnes, J.R., and Wolberg, A.S. (2017). Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *37*, e13–e21.
- Kawecki, C., Hézard, N., Bocquet, O., Poitevin, G., Rabenoelina, F., Kauskot, A., Duca, L., Blaise, S., Romier, B., Martiny, L., et al. (2014). Elastin-derived peptides are new regulators of thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *34*, 2570–2578.
- Kazuya Sakai, null, Tatsuhiko Someya, null, Kaori Harada, null, Hideo Yagi, null, Taei Matsui, null, and Masanori Matsumoto, null (2019). Novel aptamer to von Willebrand factor A1 domain (TAGX-0004) shows total inhibition of thrombus formation superior to ARC1779 and comparable to caplacizumab. *Haematologica* *105*, 2631–2638.
- Keck, T., Balcom, J.H., Fernández-del Castillo, C., Antoniu, B.A., and Warshaw, A.L. (2002). Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology* *122*, 188–201.
- Kim, H.-Y., Skokos, E.A., Myer, D.J., Agaba, P., and Gonzalez, A.L. (2014). α V β 3 Integrin Regulation of Respiratory Burst in Fibrinogen Adherent Human Neutrophils. *Cell Mol Bioeng* *7*, 231–242.
- Kim, S., Foster, C., Lecchi, A., Quinton, T.M., Prosser, D.M., Jin, J., Cattaneo, M., and Kunapuli, S.P. (2002). Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G(i) signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G(i) signaling. *Blood* *99*, 3629–3636.
- Kim, S., Jin, J., and Kunapuli, S.P. (2004). Akt activation in platelets depends on Gi signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *279*, 4186–4195.
- Kim-Kaneyama, J.R., Miyauchi, A., Lei, X.F., Arita, S., Mino, T., Takeda, N., Kou, K., Eto, K., Yoshida, T., Miyazaki, T., et al. (2012). Identification of Hic-5 as a novel regulatory factor for integrin α IIb β 3 activation and platelet aggregation in mice. *J. Thromb. Haemost.* *10*, 1867–1874.

- Kita, D., Takino, T., Nakada, M., Takahashi, T., Yamashita, J., and Sato, H. (2001). Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line. *Cancer Res.* *61*, 7985–7991.
- Kitchens, C.S. (1977). Amelioration of endothelial abnormalities by prednisone in experimental thrombocytopenia in the rabbit. *J. Clin. Invest.* *60*, 1129–1134.
- Kitchens, C.S., and Pendergast, J.F. (1986). Human thrombocytopenia is associated with structural abnormalities of the endothelium that are ameliorated by glucocorticosteroid administration. *Blood* *67*, 203–206.
- Kitchens, C.S., and Weiss, L. (1975). Ultrastructural changes of endothelium associated with thrombocytopenia. *Blood* *46*, 567–578.
- Kittelberger, R., Davis, P.F., Flynn, D.W., and Greenhill, N.S. (1990). Distribution of type VIII collagen in tissues: an immunohistochemical study. *Connect. Tissue Res.* *24*, 303–318.
- Klages, B., Brandt, U., Simon, M.I., Schultz, G., and Offermanns, S. (1999). Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J. Cell Biol.* *144*, 745–754.
- Kleinschnitz, C., Pozgajova, M., Pham, M., Bendszus, M., Nieswandt, B., and Stoll, G. (2007). Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation* *115*, 2323–2330.
- Knight, C.G., Morton, L.F., Onley, D.J., Peachey, A.R., Ichinohe, T., Okuma, M., Farndale, R.W., and Barnes, M.J. (1999). Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc. Res.* *41*, 450–457.
- Knight, C.G., Morton, L.F., Peachey, A.R., Tuckwell, D.S., Farndale, R.W., and Barnes, M.J. (2000). The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J. Biol. Chem.* *275*, 35–40.
- Kobayashi, J., Yamada, S., and Kawasaki, H. (1994). Distribution of vitronectin in plasma and liver tissue: relationship to chronic liver disease. *Hepatology* *20*, 1412–1417.
- Komarova, Y., and Malik, A.B. (2010). Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 463–493.
- Konstantinides, S., Schäfer, K., Thinner, T., and Loskutoff, D.J. (2001). Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation* *103*, 576–583.
- Konstantinides, S., Ware, J., Marchese, P., Almus-Jacobs, F., Loskutoff, D.J., and Ruggeri, Z.M. (2006). Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Ibalpha and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* *4*, 2014–2021.

- Kornerup, K.N., Salmon, G.P., Pitchford, S.C., Liu, W.L., and Page, C.P. (2010). Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration. *J. Appl. Physiol.* *109*, 758–767.
- Koyama, H., Raines, E.W., Bornfeldt, K.E., Roberts, J.M., and Ross, R. (1996). Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell* *87*, 1069–1078.
- Kraft, P., Schuhmann, M.K., Fluri, F., Lorenz, K., Zerneck, A., Stoll, G., Nieswandt, B., and Kleinschnitz, C. (2015). Efficacy and Safety of Platelet Glycoprotein Receptor Blockade in Aged and Comorbid Mice With Acute Experimental Stroke. *Stroke* *46*, 3502–3506.
- Kramer, R.H., Fuh, G.M., and Karasek, M.A. (1985). Type IV collagen synthesis by cultured human microvascular endothelial cells and its deposition into the subendothelial basement membrane. *Biochemistry* *24*, 7423–7430.
- Krishnaswamy, G., Smith, J.K., Mukkamala, R., Hall, K., Joyner, W., Yerra, L., and Chi, D.S. (1998). Multifunctional cytokine expression by human coronary endothelium and regulation by monokines and glucocorticoids. *Microvasc. Res.* *55*, 189–200.
- Kroupis, C., Theodorou, M., Chaidaroglou, A., Dalamaga, M., Oliveira, S.C., Cokkinos, D.V., Degiannis, D., and Manginas, A. (2010). The association between a common FCGR2A polymorphism and C-reactive protein and coronary artery disease revisited. *Genet Test Mol Biomarkers* *14*, 839–846.
- Krug, S.M., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2014). Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* *36*, 166–176.
- Kühn, K. (1995). Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biol.* *14*, 439–445.
- Kühn, K., Wiedemann, H., Timpl, R., Risteli, J., Dieringer, H., Voss, T., and Glanville, R.W. (1981). Macromolecular structure of basement membrane collagens. *FEBS Lett.* *125*, 123–128.
- Kuijpers, M.J.E., Schulte, V., Bergmeier, W., Lindhout, T., Brakebusch, C., Offermanns, S., Fässler, R., Heemskerk, J.W.M., and Nieswandt, B. (2003). Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *FASEB J.* *17*, 685–687.
- Kuijpers, M.J.E., Pozgajova, M., Cosemans, J.M.E.M., Munnix, I.C.A., Eckes, B., Nieswandt, B., and Heemskerk, J.W.M. (2007). Role of murine integrin alpha2beta1 in thrombus stabilization and embolization: contribution of thromboxane A2. *Thromb. Haemost.* *98*, 1072–1080.
- Kuijpers, M.J.E., Gilio, K., Reitsma, S., Nergiz-Unal, R., Prinzen, L., Heeneman, S., Lutgens, E., van Zandvoort, M. a. M.J., Nieswandt, B., Egbrink, M.G.A.O., et al. (2009). Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model. *J. Thromb. Haemost.* *7*, 152–161.

- Kulkarni, S., Dopheide, S.M., Yap, C.L., Ravanat, C., Freund, M., Mangin, P., Heel, K.A., Street, A., Harper, I.S., Lanza, F., et al. (2000). A revised model of platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* *105*, 783–791.
- Kurozumi, T., Imamura, T., Tanaka, K., Yae, Y., and Koga, S. (1984). Permeation and deposition of fibrinogen and low-density lipoprotein in the aorta and cerebral artery of rabbits--immuno-electron microscopic study. *Br J Exp Pathol* *65*, 355–364.
- Lages, B., Malmsten, C., Weiss, H.J., and Samuelsson, B. (1981). Impaired platelet response to thromboxane-A₂ and defective calcium mobilization in a patient with a bleeding disorder. *Blood* *57*, 545–552.
- Lammerding, J., Kazarov, A.R., Huang, H., Lee, R.T., and Hemler, M.E. (2003). Tetraspanin CD151 regulates alpha6beta1 integrin adhesion strengthening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 7616–7621.
- Languino, L.R., Gehlsen, K.R., Wayner, E., Carter, W.G., Engvall, E., and Ruoslahti, E. (1989). Endothelial cells use alpha 2 beta 1 integrin as a laminin receptor. *J. Cell Biol.* *109*, 2455–2462.
- Lanza, F. (2006). Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagic thrombocytic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis* *1*, 46.
- Larrieu-Lahargue, F., Welm, A.L., Thomas, K.R., and Li, D.Y. (2011). Netrin-4 activates endothelial integrin {alpha}6{beta}1. *Circ. Res.* *109*, 770–774.
- Law, D.A., Nannizzi-Alaimo, L., and Phillips, D.R. (1996). Outside-in integrin signal transduction. Alpha IIb beta 3-(GP IIb IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* *271*, 10811–10815.
- Lax, S., Rayes, J., Wichaiyo, S., Haining, E.J., Lowe, K., Grygielska, B., Laloo, R., Flodby, P., Borok, Z., Crandall, E.D., et al. (2017). Platelet CLEC-2 protects against lung injury via effects of its ligand podoplanin on inflammatory alveolar macrophages in the mouse. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *313*, L1016–L1029.
- LeBleu, V.S., Macdonald, B., and Kalluri, R. (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* *232*, 1121–1129.
- Lebozec, K., Jandrot-Perrus, M., Avenard, G., Favre-Bulle, O., and Billiald, P. (2017). Design, development and characterization of ACT017, a humanized Fab that blocks platelet's glycoprotein VI function without causing bleeding risks. *MAbs* *9*, 945–958.
- Lecchi, A., Razzari, C., Paoletta, S., Dupuis, A., Nakamura, L., Ohlmann, P., Gachet, C., Jacobson, K.A., Zieger, B., and Cattaneo, M. (2015). Identification of a new dysfunctional platelet P2Y₁₂ receptor variant associated with bleeding diathesis. *Blood* *125*, 1006–1013.
- Lecut, C., Feeney, L.A., Kingsbury, G., Hopkins, J., Lanza, F., Gachet, C., Villeval, J.-L., and Jandrot-Perrus, M. (2003). Human platelet glycoprotein VI function is antagonized by monoclonal antibody-derived Fab fragments. *J. Thromb. Haemost.* *1*, 2653–2662.

- Lecut, C., Frederix, K., Johnson, D.M., Deroanne, C., Thiry, M., Faccinetto, C., Marée, R., Evans, R.J., Volders, P.G.A., Bours, V., et al. (2009). P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation. *J. Immunol.* *183*, 2801–2809.
- Lee, R.H., Piatt, R., Conley, P.B., and Bergmeier, W. (2017). Effects of ibrutinib treatment on murine platelet function during inflammation and in primary hemostasis. *Haematologica* *102*, e89–e92.
- Leebeek, F.W.G., and Eikenboom, J.C.J. (2016). Von Willebrand's Disease. *N. Engl. J. Med.* *375*, 2067–2080.
- Lei, X., Reheman, A., Hou, Y., Zhou, H., Wang, Y., Marshall, A.H., Liang, C., Dai, X., Li, B.X., Vanhoorelbeke, K., et al. (2014). Anfibatide, a novel GPIb complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo in murine models of thrombosis. *Thromb. Haemost.* *111*, 279–289.
- Lenain, N., Freund, M., Léon, C., Cazenave, J.-P., and Gachet, C. (2003). Inhibition of localized thrombosis in P2Y1-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *J. Thromb. Haemost.* *1*, 1144–1149.
- Léon, C., Hechler, B., Vial, C., Leray, C., Cazenave, J.P., and Gachet, C. (1997). The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Lett.* *403*, 26–30.
- Léon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J.P., and Gachet, C. (1999). Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J. Clin. Invest.* *104*, 1731–1737.
- Léon, C., Freund, M., Ravanat, C., Baurand, A., Cazenave, J.P., and Gachet, C. (2001). Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation* *103*, 718–723.
- Leon, C., Ravanat, C., Freund, M., Cazenave, J.-P., and Gachet, C. (2003). Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 1941–1947.
- Leon, C., Alex, M., Klocke, A., Morgenstern, E., Moosbauer, C., Eckly, A., Spannagl, M., Gachet, C., and Engelmann, B. (2004). Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood* *103*, 594–600.
- Léon, C., Eckly, A., Hechler, B., Aleil, B., Freund, M., Ravanat, C., Jourdain, M., Nonne, C., Weber, J., Tiedt, R., et al. (2007). Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood* *110*, 3183–3191.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 678–689.
- Li, R., and Emsley, J. (2013). The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *J. Thromb. Haemost.* *11*, 605–614.

- Li, J., Vootukuri, S., Shang, Y., Negri, A., Jiang, J.-K., Nedelman, M., Diacovo, T.G., Filizola, M., Thomas, C.J., and Coller, B.S. (2014). RUC-4: a novel α IIb β 3 antagonist for prehospital therapy of myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *34*, 2321–2329.
- Li, T.-T., Fan, M.-L., Hou, S.-X., Li, X.-Y., Barry, D.M., Jin, H., Luo, S.-Y., Kong, F., Lau, L.-F., Dai, X.-R., et al. (2015). A novel snake venom-derived GPIb antagonist, anfibatide, protects mice from acute experimental ischaemic stroke and reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 3904–3916.
- Li, Z., Delaney, M.K., O'Brien, K.A., and Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 2341–2349.
- Libby, P., Ridker, P.M., and Hansson, G.K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* *473*, 317–325.
- Litvinov, R.I., Gorkun, O.V., Owen, S.F., Shuman, H., and Weisel, J.W. (2005). Polymerization of fibrin: specificity, strength, and stability of knob-hole interactions studied at the single-molecule level. *Blood* *106*, 2944–2951.
- Liu, X., Long, X., Liu, W., Zhao, Y., Hayashi, T., Yamato, M., Mizuno, K., Fujisaki, H., Hattori, S., Tashiro, S.-I., et al. (2018). Type I collagen induces mesenchymal cell differentiation into myofibroblasts through YAP-induced TGF- β 1 activation. *Biochimie* *150*, 110–130.
- Loghmani, H., and Conway, E.M. (2018). Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. *Blood* *132*, 148–158.
- Lombard, S.E., Pollitt, A.Y., Hughes, C.E., Di, Y., Mckinnon, T., O'callaghan, C.A., and Watson, S.P. (2018). Mouse podoplanin supports adhesion and aggregation of platelets under arterial shear: A novel mechanism of haemostasis. *Platelets* *29*, 716–722.
- Lonsdorf, A.S., Krämer, B.F., Fahrleitner, M., Schönberger, T., Gnerlich, S., Ring, S., Gehring, S., Schneider, S.W., Kruhlak, M.J., Meuth, S.G., et al. (2012). Engagement of α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) with α v β 3 integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: a connection to hematogenous metastasis. *J. Biol. Chem.* *287*, 2168–2178.
- Lopez, J.A., Chung, D.W., Fujikawa, K., Hagen, F.S., Davie, E.W., and Roth, G.J. (1988). The alpha and beta chains of human platelet glycoprotein Ib are both transmembrane proteins containing a leucine-rich amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *85*, 2135–2139.
- Lou, O., Alcaide, P., Luscinskas, F.W., and Muller, W.A. (2007). CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *J. Immunol.* *178*, 1136–1143.
- Lowe, G.D., Rumley, A., Woodward, M., Morrison, C.E., Philippou, H., Lane, D.A., and Tunstall-Pedoe, H. (1997). Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the Third Glasgow MONICA Survey. I. Illustrative reference ranges by age, sex and hormone use. *Br. J. Haematol.* *97*, 775–784.
- Loyau, S., Dumont, B., Ollivier, V., Boulaftali, Y., Feldman, L., Ajzenberg, N., and Jandrot-Perrus, M. (2012). Platelet glycoprotein VI dimerization, an active process inducing

- receptor competence, is an indicator of platelet reactivity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *32*, 778–785.
- Luo, B.-H., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 619–647.
- Lyons-Giordano, B., Conaway, H., and Kefalides, N.A. (1987). The effect of heparin on fibronectin and thrombospondin synthesis by human smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *148*, 1264–1269.
- MacKenzie, A.B., Mahaut-Smith, M.P., and Sage, S.O. (1996). Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *J. Biol. Chem.* *271*, 2879–2881.
- Magnusson, M.K., and Mosher, D.F. (1998). Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *18*, 1363–1370.
- Majithia, A., and Bhatt, D.L. (2019). Novel Antiplatelet Therapies for Atherothrombotic Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *39*, 546–557.
- Malinin, N.L., Zhang, L., Choi, J., Ciocea, A., Razorenova, O., Ma, Y.-Q., Podrez, E.A., Tosi, M., Lennon, D.P., Caplan, A.I., et al. (2009). A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans. *Nat. Med.* *15*, 313–318.
- Mammadova-Bach, E., Ollivier, V., Loyau, S., Schaff, M., Dumont, B., Favier, R., Freyburger, G., Latger-Cannard, V., Nieswandt, B., Gachet, C., et al. (2015). Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood* *126*, 683–691.
- Mammadova-Bach, E., Zigrino, P., Brucker, C., Bourdon, C., Freund, M., De Arcangelis, A., Abrams, S.I., Orend, G., Gachet, C., and Mangin, P.H. (2016). Platelet integrin $\alpha 6\beta 1$ controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI Insight* *1*, e88245.
- Mandarino, L.J., Sundarraj, N., Finlayson, J., and Hassell, H.R. (1993). Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp. Eye Res.* *57*, 609–621.
- Mangin, P., Yuan, Y., Goncalves, I., Eckly, A., Freund, M., Cazenave, J.-P., Gachet, C., Jackson, S.P., and Lanza, F. (2003). Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA. *J. Biol. Chem.* *278*, 32880–32891.
- Mangin, P.H., Tang, C., Bourdon, C., Loyau, S., Freund, M., Hechler, B., Gachet, C., and Jandrot-Perrus, M. (2012). A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *341*, 156–163.
- Mangin, P.H., Onselaer, M.-B., Receveur, N., Le Lay, N., Hardy, A.T., Wilson, C., Sanchez, X., Loyau, S., Dupuis, A., Babar, A.K., et al. (2018). Immobilized fibrinogen activates human platelets through GPVI. *Haematologica*.

- Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H., Islam, N., Alyonycheva, T.N., Safier, L.B., Hajjar, K.A., Posnett, D.N., Schoenborn, M.A., Schooley, K.A., et al. (1997). The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J. Clin. Invest.* *99*, 1351–1360.
- Mardon, H.J., and Grant, K.E. (1994). The role of the ninth and tenth type III domains of human fibronectin in cell adhesion. *FEBS Lett.* *340*, 197–201.
- Marguerie, G.A., Plow, E.F., and Edgington, T.S. (1979). Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J. Biol. Chem.* *254*, 5357–5363.
- von der Mark, H., Aumailley, M., Wick, G., Fleischmajer, R., and Timpl, R. (1984). Immunochemistry, genuine size and tissue localization of collagen VI. *Eur. J. Biochem.* *142*, 493–502.
- Markus, H.S., McCollum, C., Imray, C., Goulder, M.A., Gilbert, J., and King, A. (2011). The von Willebrand inhibitor ARC1779 reduces cerebral embolization after carotid endarterectomy: a randomized trial. *Stroke* *42*, 2149–2153.
- Masliyah-Planchon, J., Darnige, L., and Bellucci, S. (2013). Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update. *Br. J. Haematol.* *160*, 5–11.
- Massberg, S., Gawaz, M., Grüner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zöhlhöfer, D., Heinzmann, U., and Nieswandt, B. (2003). A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J. Exp. Med.* *197*, 41–49.
- Massena, S., Christoffersson, G., Hjertström, E., Zcharia, E., Vlodavsky, I., Ausmees, N., Rolny, C., Li, J.-P., and Phillipson, M. (2010). A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* *116*, 1924–1931.
- Matsubara, Y., Murata, M., Maruyama, T., Handa, M., Yamagata, N., Watanabe, G., Saruta, T., and Ikeda, Y. (2000). Association between diabetic retinopathy and genetic variations in alpha2beta1 integrin, a platelet receptor for collagen. *Blood* *95*, 1560–1564.
- Matter, C.M., Schuler, P.K., Alessi, P., Meier, P., Ricci, R., Zhang, D., Halin, C., Castellani, P., Zardi, L., Hofer, C.K., et al. (2004). Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin. *Circ Res* *95*, 1225–1233.
- Matus, V., Valenzuela, G., Sáez, C.G., Hidalgo, P., Lagos, M., Aranda, E., Panes, O., Pereira, J., Pillois, X., Nurden, A.T., et al. (2013). An adenine insertion in exon 6 of human GP6 generates a truncated protein associated with a bleeding disorder in four Chilean families. *J. Thromb. Haemost.* *11*, 1751–1759.
- Matuskova, J., Chauhan, A.K., Cambien, B., Astrof, S., Dole, V.S., Piffath, C.L., Hynes, R.O., and Wagner, D.D. (2006). Decreased plasma fibronectin leads to delayed thrombus growth in injured arterioles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 1391–1396.
- Maurer, E., Tang, C., Schaff, M., Bourdon, C., Receveur, N., Ravanat, C., Eckly, A., Hechler, B., Gachet, C., Lanza, F., et al. (2013). Targeting platelet GPIIb β reduces platelet

- adhesion, GPIb signaling and thrombin generation and prevents arterial thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1221–1229.
- Maurer, E., Schaff, M., Receveur, N., Bourdon, C., Mercier, L., Nieswandt, B., Dubois, C., Jandrot-Perrus, M., Goetz, J.G., Lanza, F., et al. (2015a). Fibrillar cellular fibronectin supports efficient platelet aggregation and procoagulant activity. *Thromb. Haemost.* 114, 1175–1188.
- Maurer, L.M., Ma, W., and Mosher, D.F. (2015b). Dynamic structure of plasma fibronectin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 51, 213–227.
- Maxwell, K.F., Powell, M.S., Hulett, M.D., Barton, P.A., McKenzie, I.F., Garrett, T.P., and Hogarth, P.M. (1999). Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, Fc gammaRIIa. *Nat. Struct. Biol.* 6, 437–442.
- May, F., Hagedorn, I., Pleines, I., Bender, M., Vögtle, T., Eble, J., Elvers, M., and Nieswandt, B. (2009). CLEC-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. *Blood* 114, 3464–3472.
- Mazurek, R., Dave, J.M., Chandran, R.R., Misra, A., Sheikh, A.Q., and Greif, D.M. (2017). Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease. *Adv Pharmacol* 78, 323–350.
- Mazzucato, M., Cozzi, M.R., Pradella, P., Perissinotto, D., Malmstrom, A., Morgelin, M., Spessotto, P., Colombatti, A., De Marco, L., and Perris, R. (2002). Vascular PG-M/versican variants promote platelet adhesion at low shear rates and cooperate with collagens to induce aggregation. *FASEB J.* 16, 1903–1916.
- McCabe, D.J.H., Harrison, P., Mackie, I.J., Sidhu, P.S., Purdy, G., Lawrie, A.S., Watt, H., Machin, S.J., and Brown, M.M. (2005). Increased platelet count and leucocyte-platelet complex formation in acute symptomatic compared with asymptomatic severe carotid stenosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 1249–1254.
- McCarty, O.J.T., Zhao, Y., Andrew, N., Machesky, L.M., Staunton, D., Frampton, J., and Watson, S.P. (2004). Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion. *J. Thromb. Haemost.* 2, 1823–1833.
- McCleverty, C.J., Lin, D.C., and Liddington, R.C. (2007). Structure of the PTB domain of tensin1 and a model for its recruitment to fibrillar adhesions. *Protein Sci.* 16, 1223–1229.
- McCrohan, M.B., Huang, S.W., Sleasman, J.W., Klein, P.A., and Kao, K.J. (1987). Plasma thrombospondin as an indicator of intravascular platelet activation in patients with vasculitis. *Thromb. Haemost.* 58, 850–852.
- McDonagh, P.F. (1986). Platelets reduce coronary microvascular permeability to macromolecules. *Am. J. Physiol.* 251, H581–587.
- McDonald, J.A., Kelley, D.G., and Broekelmann, T.J. (1982). Role of fibronectin in collagen deposition: Fab' to the gelatin-binding domain of fibronectin inhibits both fibronectin and collagen organization in fibroblast extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 92, 485–492.

- McNicol, A., and Israels, S.J. (1999). Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* *95*, 1–18.
- Meah, M.N., Raftis, J., Wilson, S.J., Perera, V., Garonzik, S.M., Murthy, B., Everlof, J.G., Aronson, R., Luetzgen, J., and Newby, D.E. (2020). Antithrombotic Effects of Combined PAR (Protease-Activated Receptor)-4 Antagonism and Factor Xa Inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *40*, 2678–2685.
- Mecham, R.P., Lange, G., Madaras, J., and Starcher, B. (1981). Elastin synthesis by ligamentum nuchae fibroblasts: effects of culture conditions and extracellular matrix on elastin production. *J. Cell Biol.* *90*, 332–338.
- Mecham, R.P., Madaras, J., McDonald, J.A., and Ryan, U. (1983). Elastin production by cultured calf pulmonary artery endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* *116*, 282–288.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* *454*, 428–435.
- Mehta, M., Zhou, Y., Paty, P.S.K., Teymouri, M., Jafree, K., Bakhtawar, H., Hnath, J., and Feustel, P. (2016). Percutaneous common femoral artery interventions using angioplasty, atherectomy, and stenting. *J Vasc Surg* *64*, 369–379.
- Mehta, P., Cummings, R.D., and McEver, R.P. (1998). Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Biol. Chem.* *273*, 32506–32513.
- Mehta, S.R., Yusuf, S., Peters, R.J., Bertrand, M.E., Lewis, B.S., Natarajan, M.K., Malmberg, K., Rupprecht, H., Zhao, F., Chrolavicius, S., et al. (2001). Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* *358*, 527–533.
- Mellion, B.T., Ignarro, L.J., Ohlstein, E.H., Pontecorvo, E.G., Hyman, A.L., and Kadowitz, P.J. (1981). Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* *57*, 946–955.
- Menden, H., Tate, E., Hogg, N., and Sampath, V. (2013). LPS-mediated endothelial activation in pulmonary endothelial cells: role of Nox2-dependent IKK- β phosphorylation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *304*, L445-455.
- Minor, M., Alcedo, K.P., Battaglia, R.A., and Snider, N.T. (2019). Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *317*, C1079–C1092.
- Mishra, S.K., Braun, N., Shukla, V., Füllgrabe, M., Schomerus, C., Korf, H.-W., Gachet, C., Ikehara, Y., Sévigny, J., Robson, S.C., et al. (2006). Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development* *133*, 675–684.
- Mo, X., Liu, L., López, J.A., and Li, R. (2012). Transmembrane domains are critical to the interaction between platelet glycoprotein V and glycoprotein Ib-IX complex. *J Thromb Haemost* *10*, 1875–1886.

- Moake, J.L., Turner, N.A., Stathopoulos, N.A., Nolasco, L.H., and Hellums, J.D. (1986). Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* *78*, 1456–1461.
- Moake, J.L., Turner, N.A., Stathopoulos, N.A., Nolasco, L., and Hellums, J.D. (1988). Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* *71*, 1366–1374.
- Mócsai, A., Walzog, B., and Lowell, C.A. (2015). Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovasc. Res.* *107*, 373–385.
- Modderman, P.W., Admiraal, L.G., Sonnenberg, A., and von dem Borne, A.E. (1992). Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J. Biol. Chem.* *267*, 364–369.
- Mohamed, O.Y., Al-Masri, A.A., El Eter, E.A., and Lateef, R. (2016). SCH 79797, a selective PAR1 antagonist, protects against ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the rat hearts. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* *20*, 4796–4800.
- Mojica Muñoz, A.-K., Jamasbi, J., Uhland, K., Degen, H., Münch, G., Ungerer, M., Brandl, R., Megens, R., Weber, C., Lorenz, R., et al. (2017). Recombinant GPVI-Fc added to single or dual antiplatelet therapy in vitro prevents plaque-induced platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* *117*, 1651–1659.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., and Vane, J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* *263*, 663–665.
- Moon, J.Y., Franchi, F., Rollini, F., and Angiolillo, D.J. (2018). Role for Thrombin Receptor Antagonism With Vorapaxar in Secondary Prevention of Atherothrombotic Events: From Bench to Bedside. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* *23*, 23–37.
- Moore, K.L., Andreoli, S.P., Esmon, N.L., Esmon, C.T., and Bang, N.U. (1987). Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J. Clin. Invest.* *79*, 124–130.
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (1999). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* *147*, 185–194.
- Moroi, M., Onitsuka, I., Imaizumi, T., and Jung, S.M. (2000). Involvement of activated integrin alpha2beta1 in the firm adhesion of platelets onto a surface of immobilized collagen under flow conditions. *Thromb. Haemost.* *83*, 769–776.
- Morrow, D.A., Alberts, M.J., Mohr, J.P., Ameriso, S.F., Bonaca, M.P., Goto, S., Hankey, G.J., Murphy, S.A., Scirica, B.M., Braunwald, E., et al. (2013). Efficacy and safety of vorapaxar in patients with prior ischemic stroke. *Stroke* *44*, 691–698.
- Morton, H.C., van den Herik-Oudijk, I.E., Vosseveld, P., Snijders, A., Verhoeven, A.J., Capel, P.J., and van de Winkel, J.G. (1995). Functional association between the human myeloid

- immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain. Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association. *J. Biol. Chem.* 270, 29781–29787.
- Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., and Fässler, R. (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat. Med.* 14, 325–330.
- Mosher, D.F., Doyle, M.J., and Jaffe, E.A. (1982). Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 93, 343–348.
- Mukaddam, A., Patil, R., Jadli, A., Chandrakala, S., Ghosh, K., and Shetty, S. (2015). Paradoxical bleeding and thrombosis in a patient with afibrinogenemia and fibrinogen Mumbai mutation. *Am J Clin Pathol* 143, 755–757.
- Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., and Phillips, D.M. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178, 449–460.
- Muppala, S., Frolova, E., Xiao, R., Krukovets, I., Yoon, S., Hoppe, G., Vasanji, A., Plow, E., and Stenina-Adognravi, O. (2015). Proangiogenic Properties of Thrombospondin-4. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 1975–1986.
- Murata, K., Motayama, T., and Kotake, C. (1986). Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis* 60, 251–262.
- Myers, J.C., Dion, A.S., Abraham, V., and Amenta, P.S. (1996). Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones. *Cell Tissue Res.* 286, 493–505.
- Myers, J.C., Li, D., Bageris, A., Abraham, V., Dion, A.S., and Amenta, P.S. (1997). Biochemical and immunohistochemical characterization of human type XIX defines a novel class of basement membrane zone collagens. *Am. J. Pathol.* 151, 1729–1740.
- Nakashima, Y., Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L., and Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133–140.
- Narayanan, A.S., Sandberg, L.B., Ross, R., and Layman, D.L. (1976). The smooth muscle cell. III. Elastin synthesis in arterial smooth muscle cell culture. *J. Cell Biol.* 68, 411–419.
- Nergiz-Unal, R., Lamers, M.M.E., Van Kruchten, R., Luiken, J.J., Cosemans, J.M.E.M., Glatz, J.F.C., Kuijpers, M.J.E., and Heemskerk, J.W.M. (2011). Signaling role of CD36 in platelet activation and thrombus formation on immobilized thrombospondin or oxidized low-density lipoprotein. *J. Thromb. Haemost.* 9, 1835–1846.
- Nesbitt, S., Nesbit, A., Helfrich, M., and Horton, M. (1993). Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express alpha v beta 3, alpha 2 beta 1, and alpha v beta 1 integrins. *J. Biol. Chem.* 268, 16737–16745.
- Ni, H., Denis, C.V., Subbarao, S., Degen, J.L., Sato, T.N., Hynes, R.O., and Wagner, D.D. (2000). Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest* 106, 385–392.

- Ni, H., Yuen, P.S.T., Papalia, J.M., Trevithick, J.E., Sakai, T., Fässler, R., Hynes, R.O., and Wagner, D.D. (2003). Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 2415–2419.
- Nieswandt, B., and Watson, S.P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* *102*, 449–461.
- Nieswandt, B., Bergmeier, W., Schulte, V., Rackebrandt, K., Gessner, J.E., and Zirngibl, H. (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*, 23998–24002.
- Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J.W., Zirngibl, H., and Fässler, R. (2001a). Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J.* *20*, 2120–2130.
- Nieswandt, B., Schulte, V., Bergmeier, W., Mokhtari-Nejad, R., Rackebrandt, K., Cazenave, J.P., Ohlmann, P., Gachet, C., and Zirngibl, H. (2001b). Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J. Exp. Med.* *193*, 459–469.
- Nieswandt, B., Bergmeier, W., Eckly, A., Schulte, V., Ohlmann, P., Cazenave, J.P., Zirngibl, H., Offermanns, S., and Gachet, C. (2001c). Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation. *Blood* *97*, 3829–3835.
- Nieswandt, B., Schulte, V., Zywiec, A., Gratacap, M.-P., and Offermanns, S. (2002). Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets. *J. Biol. Chem.* *277*, 39493–39498.
- Nieswandt, B., Moser, M., Pleines, I., Varga-Szabo, D., Monkley, S., Critchley, D., and Fässler, R. (2007). Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* *204*, 3113–3118.
- Nieuwenhuis, H.K., Sakariassen, K.S., Houdijk, W.P., Nievelstein, P.F., and Sixma, J.J. (1986). Deficiency of platelet membrane glycoprotein Ia associated with a decreased platelet adhesion to subendothelium: a defect in platelet spreading. *Blood* *68*, 692–695.
- Nilsen, E.M., Johansen, F.E., Jahnsen, F.L., Lundin, K.E., Scholz, T., Brandtzaeg, P., and Haraldsen, G. (1998). Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. *Gut* *42*, 635–642.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* *161*, 653–660.
- Norman, K.E., Moore, K.L., McEver, R.P., and Ley, K. (1995). Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* *86*, 4417–4421.

- Norman, K.E., Katopodis, A.G., Thoma, G., Kolbinger, F., Hicks, A.E., Cotter, M.J., Pockley, A.G., and Hellewell, P.G. (2000). P-selectin glycoprotein ligand-1 supports rolling on E- and P-selectin in vivo. *Blood* 96, 3585–3591.
- Nottebaum, A.F., Cagna, G., Winderlich, M., Gamp, A.C., Linnepe, R., Polaschegg, C., Filippova, K., Lyck, R., Engelhardt, B., Kamenyeva, O., et al. (2008). VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J. Exp. Med.* 205, 2929–2945.
- Nourshargh, S., and Alon, R. (2014). Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 41, 694–707.
- Nurden, A.T. (2006). Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 1, 10.
- Nurden, P., Savi, P., Heilmann, E., Bihour, C., Herbert, J.M., Maffrand, J.P., and Nurden, A. (1995). An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. *J. Clin. Invest.* 95, 1612–1622.
- Obergfell, A., Judd, B.A., del Pozo, M.A., Schwartz, M.A., Koretzky, G.A., and Shattil, S.J. (2001). The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin α IIb β 3 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 276, 5916–5923.
- Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceso, C., Moores, S.L., Brugge, J.S., Lowell, C.A., and Shattil, S.J. (2002). Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]IIb[\beta]3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 157, 265–275.
- O’Connell, M.K., Murthy, S., Phan, S., Xu, C., Buchanan, J., Spilker, R., Dalman, R.L., Zarins, C.K., Denk, W., and Taylor, C.A. (2008). The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. *Matrix Biol.* 27, 171–181.
- O’Donnell, V.B., Murphy, R.C., and Watson, S.P. (2014). Platelet lipidomics: modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets. *Circ. Res.* 114, 1185–1203.
- Offermanns, S. (2006). Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* 99, 1293–1304.
- Offermanns, S., Laugwitz, K.L., Spicher, K., and Schultz, G. (1994). G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 504–508.
- Ohlmann, P., Laugwitz, K.L., Nürnberg, B., Spicher, K., Schultz, G., Cazenave, J.P., and Gachet, C. (1995). The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. *Biochem. J.* 312 (Pt 3), 775–779.
- Ohlmann, P., Hechler, B., Ravanat, C., Loyau, S., Herrenschmidt, N., Wanert, F., Jandrot-Perrus, M., and Gachet, C. (2008). Ex vivo inhibition of thrombus formation by an anti-glycoprotein VI Fab fragment in non-human primates without modification of glycoprotein VI expression. *J. Thromb. Haemost.* 6, 1003–1011.

- Ohlmann, P., de Castro, S., Brown, G.G., Gachet, C., Jacobson, K.A., and Harden, T.K. (2010). Quantification of recombinant and platelet P2Y(1) receptors utilizing a [(125)I]-labeled high-affinity antagonist 2-iodo-N(6)-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate [(125)I]MRS2500. *Pharmacol. Res.* 62, 344–351.
- Ohlmann, P., Lecchi, A., El-Tayeb, A., Müller, C.E., Cattaneo, M., and Gachet, C. (2013). The platelet P2Y(12) receptor under normal and pathological conditions. Assessment with the radiolabeled selective antagonist [(3)H]PSB-0413. *Purinergic Signal.* 9, 59–66.
- Ohmori, T., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Honda, S., Miyata, T., and Sakata, Y. (2010). Vinculin activates inside-out signaling of integrin α IIb β 3 in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 323–328.
- Okada, M., and Yamawaki, H. (2019). A current perspective of canstatin, a fragment of type IV collagen alpha 2 chain. *J Pharmacol Sci* 139, 59–64.
- Ollivier, V., Syvannarath, V., Gros, A., Butt, A., Loyau, S., Jandrot-Perrus, M., and Ho-Tin-Noé, B. (2014). Collagen can selectively trigger a platelet secretory phenotype via glycoprotein VI. *PLoS ONE* 9, e104712.
- Olorundare, O.E., Peyruchaud, O., Albrecht, R.M., and Mosher, D.F. (2001). Assembly of a fibronectin matrix by adherent platelets stimulated by lysophosphatidic acid and other agonists. *Blood* 98, 117–124.
- Onselaer, M.-B., Hardy, A.T., Wilson, C., Sanchez, X., Babar, A.K., Miller, J.L.C., Watson, C.N., Watson, S.K., Bonna, A., Philippou, H., et al. (2017). Fibrin and D-dimer bind to monomeric GPVI. *Blood Adv* 1, 1495–1504.
- Osada, M., Inoue, O., Ding, G., Shirai, T., Ichise, H., Hirayama, K., Takano, K., Yatomi, Y., Hirashima, M., Fujii, H., et al. (2012). Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *J Biol Chem* 287, 22241–22252.
- Osidak, M.S., Osidak, E.O., Akhmanova, M.A., Domogatsky, S.P., and Domogatskaya, A.S. (2015). Fibrillar, fibril-associated and basement membrane collagens of the arterial wall: architecture, elasticity and remodeling under stress. *Curr. Pharm. Des.* 21, 1124–1133.
- Ossovskaya, V.S., and Bunnnett, N.W. (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.* 84, 579–621.
- Oury, C., Toth-Zsamboki, E., Thys, C., Tytgat, J., Vermylen, J., and Hoylaerts, M.F. (2001). The ATP-gated P2X1 ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen. *Thromb. Haemost.* 86, 1264–1271.
- Oury, C., Kuijpers, M.J.E., Toth-Zsamboki, E., Bonnefoy, A., Danloy, S., Vreys, I., Feijge, M.A.H., De Vos, R., Vermylen, J., Heemskerk, J.W.M., et al. (2003). Overexpression of the platelet P2X1 ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype. *Blood* 101, 3969–3976.
- Oury, C., Sticker, E., Cornelissen, H., De Vos, R., Vermylen, J., and Hoylaerts, M.F. (2004). ATP augments von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation

- through Ca²⁺-calmodulin and myosin light chain kinase activation. *J. Biol. Chem.* *279*, 26266–26273.
- Pachel, C., Mathes, D., Arias-Loza, A.-P., Heitzmann, W., Nordbeck, P., Deppermann, C., Lorenz, V., Hofmann, U., Nieswandt, B., and Frantz, S. (2016). Inhibition of Platelet GPVI Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *36*, 629–635.
- Palta, S., Saroa, R., and Palta, A. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* *58*, 515–523.
- Parker, C.J., Stone, O.L., White, V.F., and Bernshaw, N.J. (1989). Vitronectin (S protein) is associated with platelets. *Br. J. Haematol.* *71*, 245–252.
- Pasquet, J.M., Gross, B., Quek, L., Asazuma, N., Zhang, W., Sommers, C.L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Judd, B., Lee, J.R., et al. (1999). LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 8326–8334.
- Paul, B.Z.S., Vilaire, G., Kunapuli, S.P., and Bennett, J.S. (2003). Concurrent signaling from Galphaq- and Galphai-coupled pathways is essential for agonist-induced alphavbeta3 activation on human platelets. *J. Thromb. Haemost.* *1*, 814–820.
- Pease, D.C. (1956). An electron microscopic study of red bone marrow. *Blood* *11*, 501–526.
- Pepin, M.G., Schwarze, U., Rice, K.M., Liu, M., Leistriz, D., and Byers, P.H. (2014). Survival is affected by mutation type and molecular mechanism in vascular Ehlers-Danlos syndrome (EDS type IV). *Genet. Med.* *16*, 881–888.
- Pereira, M., Rybarczyk, B.J., Odrljic, T.M., Hocking, D.C., Sottile, J., and Simpson-Haidaris, P.J. (2002). The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. *J. Cell. Sci.* *115*, 609–617.
- Petri, B., Broermann, A., Li, H., Khandoga, A.G., Zarbock, A., Krombach, F., Goerge, T., Schneider, S.W., Jones, C., Nieswandt, B., et al. (2010). von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood* *116*, 4712–4719.
- Petrich, B.G., Marchese, P., Ruggeri, Z.M., Spiess, S., Weichert, R.A.M., Ye, F., Tiedt, R., Skoda, R.C., Monkley, S.J., Critchley, D.R., et al. (2007). Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *J. Exp. Med.* *204*, 3103–3111.
- Petzold, T., Ruppert, R., Pandey, D., Barocke, V., Meyer, H., Lorenz, M., Zhang, L., Siess, W., Massberg, S., and Moser, M. (2013). β 1 integrin-mediated signals are required for platelet granule secretion and hemostasis in mouse. *Blood* *122*, 2723–2731.
- Peyvandi, F., Scully, M., Kremer Hovinga, J.A., Cataland, S., Knöbl, P., Wu, H., Artoni, A., Westwood, J.-P., Mansouri Taleghani, M., Jilma, B., et al. (2016). Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med* *374*, 511–522.
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C.M., and Kubes, P. (2006). Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* *203*, 2569–2575.

- Phillipson, M., Heit, B., Parsons, S.A., Petri, B., Mullaly, S.C., Colarusso, P., Gower, R.M., Neely, G., Simon, S.I., and Kubes, P. (2009). Vav1 is essential for mechanotactic crawling and migration of neutrophils out of the inflamed microvasculature. *J. Immunol.* *182*, 6870–6878.
- Piel-Julian, M.-L., Mahévas, M., Germain, J., Languille, L., Comont, T., Lapeyre-Mestre, M., Payrastre, B., Beyne-Rauzy, O., Michel, M., Godeau, B., et al. (2018). Risk factors for bleeding, including platelet count threshold, in newly diagnosed immune thrombocytopenia adults. *J Thromb Haemost* *16*, 1830–1842.
- Piotrowicz, R.S., Orchekowski, R.P., Nugent, D.J., Yamada, K.Y., and Kunicki, T.J. (1988). Glycoprotein Ic-IIa functions as an activation-independent fibronectin receptor on human platelets. *J. Cell Biol.* *106*, 1359–1364.
- Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J.W. (2000). Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* *275*, 21785–21788.
- Pluthero, F.G., Di Paola, J., Carcao, M.D., and Kahr, W.H.A. (2018). NBEAL2 mutations and bleeding in patients with gray platelet syndrome. *Platelets* *29*, 632–635.
- Pober, J.S., and Sessa, W.C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 803–815.
- Podack, E.R., Dahlbäck, B., and Griffin, J.H. (1986). Interaction of S-protein of complement with thrombin and antithrombin III during coagulation. Protection of thrombin by S-protein from antithrombin III inactivation. *J. Biol. Chem.* *261*, 7387–7392.
- Podolnikova, N.P., Yakovlev, S., Yakubenko, V.P., Wang, X., Gorkun, O.V., and Ugarova, T.P. (2014). The interaction of integrin α IIb β 3 with fibrin occurs through multiple binding sites in the α IIb β -propeller domain. *J. Biol. Chem.* *289*, 2371–2383.
- Polanowska-Grabowska, R., Simon, C.G., and Gear, A.R. (1999). Platelet adhesion to collagen type I, collagen type IV, von Willebrand factor, fibronectin, laminin and fibrinogen: rapid kinetics under shear. *Thromb. Haemost.* *81*, 118–123.
- Polgár, J., Clemetson, J.M., Kehrel, B.E., Wiedemann, M., Magnenat, E.M., Wells, T.N., and Clemetson, K.J. (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*, 13576–13583.
- Potente, M., and Mäkinen, T. (2017). Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 477–494.
- Potocnik, A.J., Brakebusch, C., and Fässler, R. (2000). Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity* *12*, 653–663.
- Poujol, C., Nurden, A.T., and Nurden, P. (1997). Ultrastructural analysis of the distribution of the vitronectin receptor (alpha v beta 3) in human platelets and megakaryocytes reveals an intracellular pool and labelling of the alpha-granule membrane. *Br. J. Haematol.* *96*, 823–835.

- Prakash, P., Kulkarni, P.P., Lentz, S.R., and Chauhan, A.K. (2015). Cellular fibronectin containing extra domain A promotes arterial thrombosis in mice through platelet Toll-like receptor 4. *Blood* *125*, 3164–3172.
- Quach, M.E., Chen, W., and Li, R. (2018). Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. *Blood* *131*, 1512–1521.
- Quek, L.S., Pasquet, J.M., Hers, I., Cornall, R., Knight, G., Barnes, M., Hibbs, M.L., Dunn, A.R., Lowell, C.A., and Watson, S.P. (2000). Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway. *Blood* *96*, 4246–4253.
- Rainger, G.E., Buckley, C.D., Simmons, D.L., and Nash, G.B. (1999). Neutrophils sense flow-generated stress and direct their migration through alphaVbeta3-integrin. *Am. J. Physiol.* *276*, H858-864.
- Ramsland, P.A., Farrugia, W., Bradford, T.M., Sardjono, C.T., Esparon, S., Trist, H.M., Powell, M.S., Tan, P.S., Cendron, A.C., Wines, B.D., et al. (2011). Structural basis for Fc gammaRIIIa recognition of human IgG and formation of inflammatory signaling complexes. *J. Immunol.* *187*, 3208–3217.
- Rayes, J., Jadoui, S., Lax, S., Gros, A., Wichaiyo, S., Ollivier, V., Denis, C.V., Ware, J., Nieswandt, B., Jandrot-Perrus, M., et al. (2018a). The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent. *Haematologica* *103*, e256–e258.
- Rayes, J., Jadoui, S., Lax, S., Gros, A., Wichaiyo, S., Ollivier, V., Denis, C.V., Ware, J., Nieswandt, B., Jandrot-Perrus, M., et al. (2018b). The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent. *Haematologica* *103*, e256–e258.
- Rayes, J., Watson, S.P., and Nieswandt, B. (2019). Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J. Clin. Invest.* *129*, 12–23.
- Reheman, A., Gross, P., Yang, H., Chen, P., Allen, D., Leytin, V., Freedman, J., and Ni, H. (2005). Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation. *J. Thromb. Haemost.* *3*, 875–883.
- Remijn, J.A., IJsseldijk, M.J.W., Strunk, A.L.M., Abbes, A.P., Engel, H., Dikkeschei, B., Dompeling, E.C., de Groot, P.G., and Slingerland, R.J. (2007). Novel molecular defect in the platelet ADP receptor P2Y₁₂ of a patient with haemorrhagic diathesis. *Clin. Chem. Lab. Med.* *45*, 187–189.
- Rhodin, J.A. (1967). The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters. *J. Ultrastruct. Res.* *18*, 181–223.
- Riba, R., Hughes, C.E., Graham, A., Watson, S.P., and Naseem, K.M. (2008). Globular adiponectin induces platelet activation through the collagen receptor GPVI-Fc receptor gamma chain complex. *J. Thromb. Haemost.* *6*, 1012–1020.
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*, a004978.

- Rishi, A.K., Joyce-Brady, M., Fisher, J., Dobbs, L.G., Floros, J., VanderSpek, J., Brody, J.S., and Williams, M.C. (1995). Cloning, characterization, and development expression of a rat lung alveolar type I cell gene in embryonic endodermal and neural derivatives. *Dev. Biol.* *167*, 294–306.
- Rix, A., Fokong, S., Heringer, S., Pjontek, R., Kabelitz, L., Theek, B., Brockmann, M.-A., Wiesmann, M., and Kiessling, F. (2016). Molecular Ultrasound Imaging of $\alpha\beta 3$ -Integrin Expression in Carotid Arteries of Pigs After Vessel Injury. *Invest Radiol* *51*, 767–775.
- Roark, E.F., Keene, D.R., Haudenschild, C.C., Godyna, S., Little, C.D., and Argraves, W.S. (1995). The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study. *J. Histochem. Cytochem.* *43*, 401–411.
- Rocco, M., Aresu, O., and Zardi, L. (1984). Conformational state of circulating human plasma fibronectin. *FEBS Lett.* *178*, 327–330.
- Rohwedder, I., Montanez, E., Beckmann, K., Bengtsson, E., Dunér, P., Nilsson, J., Soehnlein, O., and Fässler, R. (2012). Plasma fibronectin deficiency impedes atherosclerosis progression and fibrous cap formation. *EMBO Mol Med* *4*, 564–576.
- Romo, G.M., Dong, J.F., Schade, A.J., Gardiner, E.E., Kansas, G.S., Li, C.Q., McIntire, L.V., Berndt, M.C., and López, J.A. (1999). The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J. Exp. Med.* *190*, 803–814.
- Rosenberg, R.D. (1989). Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiological role of this natural anticoagulant mechanism. *Am. J. Med.* *87*, 2S-9S.
- Rosenfeld, S.I., Looney, R.J., Leddy, J.P., Phipps, D.C., Abraham, G.N., and Anderson, C.L. (1985). Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes. *J. Clin. Invest.* *76*, 2317–2322.
- Ross, J.M., McIntire, L.V., Moake, J.L., and Rand, J.H. (1995). Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under physiological flow conditions. *Blood* *85*, 1826–1835.
- Ross, J.M., McIntire, L.V., Moake, J.L., Kuo, H.J., Qian, R.Q., Glanville, R.W., Schwartz, E., and Rand, J.H. (1998). Fibrillin containing elastic microfibrils support platelet adhesion under dynamic shear conditions. *Thromb. Haemost.* *79*, 155–161.
- Rotrosen, D., and Gallin, J.I. (1986). Histamine type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin, and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers. *J. Cell Biol.* *103*, 2379–2387.
- Rowe, R.G., and Weiss, S.J. (2008). Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* *18*, 560–574.
- Ru, Y.-X., Dong, S.-X., Liang, H.-Y., and Zhao, S.-X. (2016). Platelet production of megakaryocyte: A review with original observations on human in vivo cells and bone marrow. *Ultrastruct Pathol* *40*, 163–170.

- Ruoslahti, E., Vaheri, A., Kuusela, P., and Linder, E. (1973). Fibroblast surface antigen: a new serum protein. *Biochim. Biophys. Acta* 322, 352–358.
- Saarela, J., Rehn, M., Oikarinen, A., Autio-Harmanen, H., and Pihlajaniemi, T. (1998). The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. *Am. J. Pathol.* 153, 611–626.
- Sabatier, L., Chen, D., Fagotto-Kaufmann, C., Hubmacher, D., McKee, M.D., Annis, D.S., Mosher, D.F., and Reinhardt, D.P. (2009). Fibrillin assembly requires fibronectin. *Mol. Biol. Cell* 20, 846–858.
- Sadler, J.E. (2009). von Willebrand factor assembly and secretion. *J. Thromb. Haemost.* 7 *Suppl* 1, 24–27.
- Saelman, E.U., Nieuwenhuis, H.K., Hese, K.M., de Groot, P.G., Heijnen, H.F., Sage, E.H., Williams, S., McKeown, L., Gralnick, H.R., and Sixma, J.J. (1994). Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood* 83, 1244–1250.
- Saito, H., Minamiya, Y., Kitamura, M., Saito, S., Enomoto, K., Terada, K., and Ogawa, J. (1998). Endothelial myosin light chain kinase regulates neutrophil migration across human umbilical vein endothelial cell monolayer. *J. Immunol.* 161, 1533–1540.
- Sakai, L.Y., Keene, D.R., and Engvall, E. (1986). Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol.* 103, 2499–2509.
- Samama, M., Lecrubier, C., Conard, J., Hotchen, M., Breton-Gorius, J., Vargaftig, B., Chignard, M., Lagarde, M., and Dechavanne, M. (1981). Constitutional thrombocytopeny with subnormal response to thromboxane A₂. *Br. J. Haematol.* 48, 293–303.
- Sambrano, G.R., Weiss, E.J., Zheng, Y.W., Huang, W., and Coughlin, S.R. (2001). Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 413, 74–78.
- Santoro, S.A., Rajpara, S.M., Staats, W.D., and Woods, V.L. (1988). Isolation and characterization of a platelet surface collagen binding complex related to VLA-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 217–223.
- Santoso, S., Kunicki, T.J., Kroll, H., Haberbosch, W., and Gardemann, A. (1999). Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood* 93, 2449–2453.
- Sarin, H. (2010). Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J Angiogenesis Res* 2, 14.
- Sarratt, K.L., Chen, H., Zutter, M.M., Santoro, S.A., Hammer, D.A., and Kahn, M.L. (2005). GPVI and alpha2beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood* 106, 1268–1277.

- Sato, F., Wachi, H., Ishida, M., Nonaka, R., Onoue, S., Urban, Z., Starcher, B.C., and Seyama, Y. (2007). Distinct steps of cross-linking, self-association, and maturation of tropoelastin are necessary for elastic fiber formation. *J. Mol. Biol.* *369*, 841–851.
- Savage, B., and Ruggeri, Z.M. (1991). Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. *J. Biol. Chem.* *266*, 11227–11233.
- Savage, B., Saldívar, E., and Ruggeri, Z.M. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* *84*, 289–297.
- Savage, B., Almus-Jacobs, F., and Ruggeri, Z.M. (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* *94*, 657–666.
- Schaff, M., Tang, C., Maurer, E., Bourdon, C., Receveur, N., Eckly, A., Hechler, B., Arnold, C., de Arcangelis, A., Nieswandt, B., et al. (2013). Integrin $\alpha 6\beta 1$ is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation* *128*, 541–552.
- Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., and Muller, W.A. (2004). Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat. Immunol.* *5*, 393–400.
- Schick, P.K., Walker, J., Profeta, B., Denisova, L., and Bennett, V. (1997). Synthesis and secretion of von Willebrand factor and fibronectin in megakaryocytes at different phases of maturation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *17*, 797–801.
- Schlansky, B., and Hwang, J.H. (2009). Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy. *J. Gastroenterol.* *44 Suppl 19*, 44–52.
- Schoenwaelder, S.M., Ono, A., Sturgeon, S., Chan, S.M., Mangin, P., Maxwell, M.J., Turnbull, S., Mulchandani, M., Anderson, K., Kauffenstein, G., et al. (2007). Identification of a unique co-operative phosphoinositide 3-kinase signaling mechanism regulating integrin alpha IIb beta 3 adhesive function in platelets. *J. Biol. Chem.* *282*, 28648–28658.
- Schönberger, T., Ziegler, M., Borst, O., Konrad, I., Nieswandt, B., Massberg, S., Ochmann, C., Jürgens, T., Seizer, P., Langer, H., et al. (2012). The dimeric platelet collagen receptor GPVI-Fc reduces platelet adhesion to activated endothelium and preserves myocardial function after transient ischemia in mice. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *303*, C757-766.
- Schubert, W., Frank, P.G., Razani, B., Park, D.S., Chow, C.W., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J. Biol. Chem.* *276*, 48619–48622.
- Schwarzbauer, J.E. (1991). Identification of the fibronectin sequences required for assembly of a fibrillar matrix. *J. Cell Biol.* *113*, 1463–1473.
- Scirica, B.M., Bonaca, M.P., Braunwald, E., De Ferrari, G.M., Isaza, D., Lewis, B.S., Mehrhof, F., Merlini, P.A., Murphy, S.A., Sabatine, M.S., et al. (2012). Vorapaxar for secondary prevention of thrombotic events for patients with previous myocardial infarction: a prespecified subgroup analysis of the TRA 2°P-TIMI 50 trial. *Lancet* *380*, 1317–1324.

- Scully, M., Cataland, S.R., Peyvandi, F., Coppo, P., Knöbl, P., Kremer Hovinga, J.A., Metjian, A., de la Rubia, J., Pavenski, K., Callewaert, F., et al. (2019). Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med* 380, 335–346.
- Sechler, J.L., Rao, H., Cumiskey, A.M., Vega-Colón, I., Smith, M.S., Murata, T., and Schwarzbauer, J.E. (2001). A novel fibronectin binding site required for fibronectin fibril growth during matrix assembly. *J. Cell Biol.* 154, 1081–1088.
- Seiffert, D., and Schleef, R.R. (1996). Two functionally distinct pools of vitronectin (Vn) in the blood circulation: identification of a heparin-binding competent population of Vn within platelet alpha-granules. *Blood* 88, 552–560.
- Seizer, P., Borst, O., Langer, H.F., Bültmann, A., Münch, G., Herouy, Y., Stellos, K., Krämer, B., Bigalke, B., Büchele, B., et al. (2009). EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction. *Thromb. Haemost.* 101, 682–686.
- Serrano, F.A., El-Shahawy, M., Solomon, R.J., Sobel, B.E., and Schneider, D.J. (2007). Increased platelet expression of FcGammaRIIIa and its potential impact on platelet reactivity in patients with end stage renal disease. *Thromb J* 5, 7.
- Sharma, J., Turk, J., and McHowat, J. (2010). Endothelial cell prostaglandin I(2) and platelet-activating factor production are markedly attenuated in the calcium-independent phospholipase A(2)beta knockout mouse. *Biochemistry* 49, 5473–5481.
- Shaw, S.K., Bamba, P.S., Perkins, B.N., and Luscinckas, F.W. (2001). Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J. Immunol.* 167, 2323–2330.
- Shen, B., Zhao, X., O'Brien, K.A., Stojanovic-Terpo, A., Delaney, M.K., Kim, K., Cho, J., Lam, S.C.-T., and Du, X. (2013). A directional switch of integrin signalling and a new anti-thrombotic strategy. *Nature* 503, 131–135.
- Shepro, D., Sweetman, H.E., and Hechtman, H.B. (1980). Experimental thrombocytopenia and capillary ultrastructure. *Blood* 56, 937–939.
- Sherwood, E.R., and Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 18, 385–405.
- Shi, Y., O'Brien, J.E., Fard, A., Mannion, J.D., Wang, D., and Zalewski, A. (1996). Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* 94, 1655–1664.
- Shiraga, M., Miyata, S., Kato, H., Kashiwagi, H., Honda, S., Kurata, Y., Tomiyama, Y., and Kanakura, Y. (2005). Impaired platelet function in a patient with P2Y12 deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J. Thromb. Haemost.* 3, 2315–2323.
- Sim, J.A., Park, C.-K., Oh, S.B., Evans, R.J., and North, R.A. (2007). P2X1 and P2X4 receptor currents in mouse macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 152, 1283–1290.

- Simon, D.I., Chen, Z., Xu, H., Li, C.Q., Dong, J. f, McIntire, L.V., Ballantyne, C.M., Zhang, L., Furman, M.I., Berndt, M.C., et al. (2000). Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* *192*, 193–204.
- Sinnaeve, P., Fahrni, G., Schelfaut, D., Spirito, A., Mueller, C., Frenoux, J.-M., Hmissi, A., Bernaud, C., Ufer, M., Moccetti, T., et al. (2020). Subcutaneous Selatogrel Inhibits Platelet Aggregation in Patients With Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* *75*, 2588–2597.
- Slichter, S.J. (2004). Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. *Transfus Med Rev* *18*, 153–167.
- Smith, J.W., Ruggeri, Z.M., Kunicki, T.J., and Cheresch, D.A. (1990). Interaction of integrins alpha v beta 3 and glycoprotein IIb-IIIa with fibrinogen. Differential peptide recognition accounts for distinct binding sites. *J. Biol. Chem.* *265*, 12267–12271.
- Solh, T., Botsford, A., and Solh, M. (2015). Glanzmann's thrombasthenia: pathogenesis, diagnosis, and current and emerging treatment options. *J Blood Med* *6*, 219–227.
- Sonnenberg, A., Modderman, P.W., and Hogervorst, F. (1988). Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature* *336*, 487–489.
- Sorini Dini, C., Nardi, G., Ristalli, F., Mattesini, A., Hamiti, B., and Di Mario, C. (2019). Contemporary Approach to Heavily Calcified Coronary Lesions. *Interv Cardiol* *14*, 154–163.
- Sorushanova, A., Delgado, L.M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath, R., Mullen, A.M., Bayon, Y., Pandit, A., Raghunath, M., et al. (2019). The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv. Mater. Weinheim* *31*, e1801651.
- Spalton, J.C., Mori, J., Pollitt, A.Y., Hughes, C.E., Eble, J.A., and Watson, S.P. (2009). The novel Syk inhibitor R406 reveals mechanistic differences in the initiation of GPVI and CLEC-2 signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* *7*, 1192–1199.
- Sporn, L.A., Chavin, S.I., Marder, V.J., and Wagner, D.D. (1985). Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* *76*, 1102–1106.
- Springer, T.A., Zhu, J., and Xiao, T. (2008). Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen gammaC peptide by the platelet integrin alphaIIb beta3. *J. Cell Biol.* *182*, 791–800.
- Sreeramkumar, V., Adrover, J.M., Ballesteros, I., Cuartero, M.I., Rossaint, J., Bilbao, I., Náchter, M., Pitaval, C., Radovanovic, I., Fukui, Y., et al. (2014). Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* *346*, 1234–1238.
- Srivatsa, S.S., Fitzpatrick, L.A., Tsao, P.W., Reilly, T.M., Holmes, D.R., Schwartz, R.S., and Mousa, S.A. (1997). Selective alpha v beta 3 integrin blockade potently limits neointimal hyperplasia and lumen stenosis following deep coronary arterial stent injury: evidence for the functional importance of integrin alpha v beta 3 and osteopontin expression during neointima formation. *Cardiovasc. Res.* *36*, 408–428.

- Staatz, W.D., Rajpara, S.M., Wayner, E.A., Carter, W.G., and Santoro, S.A. (1989). The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen. *J. Cell Biol.* *108*, 1917–1924.
- Stefanini, L., Paul, D.S., Robledo, R.F., Chan, E.R., Getz, T.M., Campbell, R.A., Kechele, D.O., Casari, C., Piatt, R., Caron, K.M., et al. (2015). RASA3 is a critical inhibitor of RAP1-dependent platelet activation. *J. Clin. Invest.* *125*, 1419–1432.
- Stegner, D., Haining, E.J., and Nieswandt, B. (2014). Targeting glycoprotein VI and the immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *34*, 1615–1620.
- Stenina, O.I., Desai, S.Y., Krukovets, I., Kight, K., Janigro, D., Topol, E.J., and Plow, E.F. (2003). Thrombospondin-4 and its variants: expression and differential effects on endothelial cells. *Circulation* *108*, 1514–1519.
- Stenmark, K.R., Yeager, M.E., El Kasmi, K.C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E.V., Li, M., Riddle, S.R., and Frid, M.G. (2013). The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* *75*, 23–47.
- Stockmann, A., Hess, S., Declerck, P., Timpl, R., and Preissner, K.T. (1993). Multimeric vitronectin. Identification and characterization of conformation-dependent self-association of the adhesive protein. *J. Biol. Chem.* *268*, 22874–22882.
- Stoop, A.A., Lupu, F., and Pannekoek, H. (2000). Colocalization of thrombin, PAI-1, and vitronectin in the atherosclerotic vessel wall: A potential regulatory mechanism of thrombin activity by PAI-1/vitronectin complexes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20*, 1143–1149.
- Strassel, C., Nonne, C., Eckly, A., David, T., Leon, C., Freund, M., Cazenave, J.-P., Gachet, C., and Lanza, F. (2007). Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 241–247.
- Sugiyama, T., Okuma, M., Ushikubi, F., Sensaki, S., Kanaji, K., and Uchino, H. (1987). A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* *69*, 1712–1720.
- Suh, T.T., Holmbäck, K., Jensen, N.J., Daugherty, C.C., Small, K., Simon, D.I., Potter, S., and Degen, J.L. (1995). Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. *Genes Dev.* *9*, 2020–2033.
- Sullam, P.M., Hyun, W.C., Szöllösi, J., Dong, J. f, Foss, W.M., and López, J.A. (1998). Physical proximity and functional interplay of the glycoprotein Ib-IX-V complex and the Fc receptor FcγRIIA on the platelet plasma membrane. *J. Biol. Chem.* *273*, 5331–5336.
- Suzuki, S., Oldberg, A., Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. (1985). Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin. *EMBO J.* *4*, 2519–2524.
- Suzuki, Y., Yasui, H., Brzoska, T., Mogami, H., and Urano, T. (2011). Surface-retained tPA is essential for effective fibrinolysis on vascular endothelial cells. *Blood* *118*, 3182–3185.

- Suzuki-Inoue, K., Tulasne, D., Shen, Y., Bori-Sanz, T., Inoue, O., Jung, S.M., Moroi, M., Andrews, R.K., Berndt, M.C., and Watson, S.P. (2002). Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J. Biol. Chem.* *277*, 21561–21566.
- Suzuki-Inoue, K., Fuller, G.L.J., García, A., Eble, J.A., Pöhlmann, S., Inoue, O., Gartner, T.K., Hughan, S.C., Pearce, A.C., Laing, G.D., et al. (2006). A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood* *107*, 542–549.
- Suzuki-Inoue, K., Kato, Y., Inoue, O., Kaneko, M.K., Mishima, K., Yatomi, Y., Yamazaki, Y., Narimatsu, H., and Ozaki, Y. (2007). Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem* *282*, 25993–26001.
- Suzuki-Inoue, K., Inoue, O., Ding, G., Nishimura, S., Hokamura, K., Eto, K., Kashiwagi, H., Tomiyama, Y., Yatomi, Y., Umemura, K., et al. (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*, 24494–24507.
- Sweetwyne, M.T., and Murphy-Ullrich, J.E. (2012). Thrombospondin1 in tissue repair and fibrosis: TGF- β -dependent and independent mechanisms. *Matrix Biol.* *31*, 178–186.
- Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Breviario, F., Pirazzoli, V., Potente, M., Daly, C., Dimmeler, S., and Dejana, E. (2008). Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat. Cell Biol.* *10*, 923–934.
- Tadokoro, S., Nakazawa, T., Kamae, T., Kiyomizu, K., Kashiwagi, H., Honda, S., Kanakura, Y., and Tomiyama, Y. (2011). A potential role for α -actinin in inside-out α IIb β 3 signaling. *Blood* *117*, 250–258.
- Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T., and Springer, T.A. (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* *110*, 599–511.
- Takahashi, H., and Moroi, M. (2001). Antibody against platelet membrane glycoprotein VI in a patient with systemic lupus erythematosus. *Am. J. Hematol.* *67*, 262–267.
- Takasaki, I., Chobanian, A.V., and Brecher, P. (1991). Biosynthesis of fibronectin by rabbit aorta. *J. Biol. Chem.* *266*, 17686–17694.
- Tamagawa-Mineoka, R., Katoh, N., Ueda, E., Takenaka, H., Kita, M., and Kishimoto, S. (2007). The role of platelets in leukocyte recruitment in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. *Am. J. Pathol.* *170*, 2019–2029.
- Tamkun, J.W., and Hynes, R.O. (1983). Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *J. Biol. Chem.* *258*, 4641–4647.

- Tamkun, J.W., DeSimone, D.W., Fonda, D., Patel, R.S., Buck, C., Horwitz, A.F., and Hynes, R.O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* *46*, 271–282.
- Tang, Y.-Q., Yeaman, M.R., and Selsted, M.E. (2002). Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* *70*, 6524–6533.
- Theocharis, A.D., Manou, D., and Karamanos, N.K. (2019). The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J.* *286*, 2830–2869.
- Thomas, D.W., Mannon, R.B., Mannon, P.J., Latour, A., Oliver, J.A., Hoffman, M., Smithies, O., Koller, B.H., and Coffman, T.M. (1998). Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A₂. *J. Clin. Invest.* *102*, 1994–2001.
- Thomas, H., Cowin, A.J., and Mills, S.J. (2017). The Importance of Pericytes in Healing: Wounds and other Pathologies. *Int J Mol Sci* *18*.
- Tiedt, R., Schomber, T., Hao-Shen, H., and Skoda, R.C. (2007). Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood* *109*, 1503–1506.
- Tieu, B.C., Lee, C., Sun, H., Lejeune, W., Recinos, A., Ju, X., Spratt, H., Guo, D.-C., Milewicz, D., Tilton, R.G., et al. (2009). An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 3637–3651.
- Tirupathi, C., Song, W., Bergenfeldt, M., Sass, P., and Malik, A.B. (1997). Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* *272*, 25968–25975.
- Tiscia, G.L., and Margaglione, M. (2018). Human Fibrinogen: Molecular and Genetic Aspects of Congenital Disorders. *Int J Mol Sci* *19*.
- To, W.S., and Midwood, K.S. (2011). Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* *4*, 21.
- Tollefsen, D.M., and Pestka, C.A. (1985). Heparin cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure. *Blood* *66*, 769–774.
- Tomiyama, Y., Kunicki, T.J., Zipf, T.F., Ford, S.B., and Aster, R.H. (1992). Response of human platelets to activating monoclonal antibodies: importance of Fc gamma RII (CD32) phenotype and level of expression. *Blood* *80*, 2261–2268.
- Tomooka, M., Kaji, C., Kojima, H., and Sawa, Y. (2013). Distribution of podoplanin-expressing cells in the mouse nervous systems. *Acta Histochem Cytochem* *46*, 171–177.
- Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., Fallon, J.T., Gertz, S.D., Fernández-Ortiz, A., Chesebro, J.H., Badimon, L., Nemerson, Y., Fuster, V., et al. (1997). Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* *95*, 594–599.

- Tronik-Le Roux, D., Roullot, V., Poujol, C., Kortulewski, T., Nurden, P., and Marguerie, G. (2000). Thrombasthenic mice generated by replacement of the integrin alpha(IIb) gene: demonstration that transcriptional activation of this megakaryocytic locus precedes lineage commitment. *Blood* 96, 1399–1408.
- Tucker, K.L., Sage, T., Stevens, J.M., Jordan, P.A., Jones, S., Barrett, N.E., St-Arnaud, R., Frampton, J., Dedhar, S., and Gibbins, J.M. (2008). A dual role for integrin-linked kinase in platelets: regulating integrin function and alpha-granule secretion. *Blood* 112, 4523–4531.
- Turowski, P., Martinelli, R., Crawford, R., Wateridge, D., Papageorgiou, A.-P., Lampugnani, M.G., Gamp, A.C., Vestweber, D., Adamson, P., Dejana, E., et al. (2008). Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *J. Cell. Sci.* 121, 29–37.
- Tuszynski, G.P., Rothman, V.L., Murphy, A., Siegler, K., and Knudsen, K.A. (1988). Thrombospondin promotes platelet aggregation. *Blood* 72, 109–115.
- Tzu, J., and Marinkovich, M.P. (2008). Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 199–214.
- Ufer, M., Huynh, C., van Lier, J.J., Caroff, E., Fischer, H., and Dingemans, J. (2020). Absorption, distribution, metabolism and excretion of the P2Y₁₂ receptor antagonist selatogrel after subcutaneous administration in healthy subjects. *Xenobiotica* 50, 427–434.
- Ungerer, M., Rosport, K., Bültmann, A., Piechatzek, R., Uhland, K., Schlieper, P., Gawaz, M., and Münch, G. (2011). Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation* 123, 1891–1899.
- Uzan, G., Prenant, M., Prandini, M.H., Martin, F., and Marguerie, G. (1991). Tissue-specific expression of the platelet GPIIb gene. *J. Biol. Chem.* 266, 8932–8939.
- Van de Walle, G.R., Schoolmeester, A., Iserbyt, B.F., Cosmans, J.M.E.M., Heemskerk, J.W.M., Hoylaerts, M.F., Nurden, A., Vanhoorelbeke, K., and Deckmyn, H. (2007). Activation of alphaIIb beta3 is a sufficient but also an imperative prerequisite for activation of alpha2 beta1 on platelets. *Blood* 109, 595–602.
- Vandendries, E.R., Hamilton, J.R., Coughlin, S.R., Furie, B., and Furie, B.C. (2007). Par4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 288–292.
- Verma, S., Li, S.-H., Badiwala, M.V., Weisel, R.D., Fedak, P.W.M., Li, R.-K., Dhillon, B., and Mickle, D.A.G. (2002). Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 105, 1890–1896.
- Versteeg, H.H., Heemskerk, J.W.M., Levi, M., and Reitsma, P.H. (2013). New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.* 93, 327–358.

- Vial, C., Hechler, B., Léon, C., Cazenave, J.P., and Gachet, C. (1997). Presence of P2X1 purinoceptors in human platelets and megakaryoblastic cell lines. *Thromb Haemost* 78, 1500–1504.
- Vial, C., Rolf, M.G., Mahaut-Smith, M.P., and Evans, R.J. (2002). A study of P2X1 receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors. *Br. J. Pharmacol.* 135, 363–372.
- Vinogradova, O., Vaynberg, J., Kong, X., Haas, T.A., Plow, E.F., and Qin, J. (2004). Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic face during integrin activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4094–4099.
- Vögtle, T., Sharma, S., Mori, J., Nagy, Z., Semeniak, D., Scandola, C., Geer, M.J., Smith, C.W., Lane, J., Pollack, S., et al. (2019). Heparan sulfates are critical regulators of the inhibitory megakaryocyte-platelet receptor G6b-B. *Elife* 8.
- Voisin, M.-B., Pröbstl, D., and Nourshargh, S. (2010). Venular basement membranes ubiquitously express matrix protein low-expression regions: characterization in multiple tissues and remodeling during inflammation. *Am. J. Pathol.* 176, 482–495.
- Volz, J., Mammadova-Bach, E., Gil-Pulido, J., Nandigama, R., Remer, K., Sorokin, L., Zernecke, A., Abrams, S.I., Ergün, S., Henke, E., et al. (2019). Inhibition of platelet GPVI induces intratumor hemorrhage and increases efficacy of chemotherapy in mice. *Blood* 133, 2696–2706.
- Voors-Pette, C., Lebozec, K., Dogterom, P., Jullien, L., Billiald, P., Ferlan, P., Renaud, L., Favre-Bulle, O., Avenard, G., Machacek, M., et al. (2019). Safety and Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ACT017, an Antiplatelet GPVI (Glycoprotein VI) Fab. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39, 956–964.
- Vu, T.K., Wheaton, V.I., Hung, D.T., Charo, I., and Coughlin, S.R. (1991). Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* 353, 674–677.
- Wadanoli, M., Sako, D., Shaw, G.D., Schaub, R.G., Wang, Q., Tchernychev, B., Xu, J., Porter, T.J., and Huang, Q. (2007). The von Willebrand factor antagonist (GPG-290) prevents coronary thrombosis without prolongation of bleeding time. *Thromb Haemost* 98, 397–405.
- Wagner, D.D., and Marder, V.J. (1984). Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. *J. Cell Biol.* 99, 2123–2130.
- Wagner, C.L., Mascelli, M.A., Neblock, D.S., Weisman, H.F., Coller, B.S., and Jordan, R.E. (1996). Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88, 907–914.
- Wagner, D.D., Olmsted, J.B., and Marder, V.J. (1982). Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 95, 355–360.
- Walcheck, B., Moore, K.L., McEver, R.P., and Kishimoto, T.K. (1996). Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. *A*

- mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *J. Clin. Invest.* 98, 1081–1087.
- Walker-Caprioglio, H.M., Hunter, D.D., McGuire, P.G., Little, S.A., and McGuffee, L.J. (1995). Composition in situ and in vitro of vascular smooth muscle laminin in the rat. *Cell Tissue Res.* 281, 187–196.
- Wallentin, L., Becker, R.C., Budaj, A., Cannon, C.P., Emanuelsson, H., Held, C., Horrow, J., Husted, S., James, S., Katus, H., et al. (2009). Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 361, 1045–1057.
- Waller, B.F., Orr, C.M., Slack, J.D., Pinkerton, C.A., Van Tassel, J., and Peters, T. (1992). Anatomy, histology, and pathology of coronary arteries: a review relevant to new interventional and imaging techniques--Part I. *Clin Cardiol* 15, 451–457.
- Wang, L., Jacobsen, S.E.W., Bengtsson, A., and Erlinge, D. (2004). P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. *BMC Immunol.* 5, 16.
- Wang, S., Dangerfield, J.P., Young, R.E., and Nourshargh, S. (2005). PECAM-1, alpha6 integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration. *J. Cell. Sci.* 118, 2067–2076.
- Wang, S., Voisin, M.-B., Larbi, K.Y., Dangerfield, J., Scheiermann, C., Tran, M., Maxwell, P.H., Sorokin, L., and Nourshargh, S. (2006). Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J. Exp. Med.* 203, 1519–1532.
- Wang, Y., Chen, W., Zhang, W., Lee-Sundlov, M.M., Casari, C., Berndt, M.C., Lanza, F., Bergmeier, W., Hoffmeister, K.M., Zhang, X.F., et al. (2020). Desialylation of O-glycans on glycoprotein Iba drives receptor signaling and platelet clearance. *Haematologica.*
- Wanjare, M., Agarwal, N., and Gerecht, S. (2015). Biomechanical strain induces elastin and collagen production in human pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 309, C271-281.
- Ware, J. (2004). Dysfunctional platelet membrane receptors: from humans to mice. *Thromb Haemost* 92, 478–485.
- Ware, J., Russell, S., and Ruggeri, Z.M. (2000). Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2803–2808.
- Warmerdam, P.A., van de Winkel, J.G., Vlug, A., Westerdaal, N.A., and Capel, P.J. (1991). A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J. Immunol.* 147, 1338–1343.
- Watson, S.P., Auger, J.M., McCarty, O.J.T., and Pearce, A.C. (2005). GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1752–1762.
- Wayner, E.A., Carter, W.G., Piotrowicz, R.S., and Kunicki, T.J. (1988). The function of multiple extracellular matrix receptors in mediating cell adhesion to extracellular matrix:

- preparation of monoclonal antibodies to the fibronectin receptor that specifically inhibit cell adhesion to fibronectin and react with platelet glycoproteins Ic-IIa. *J. Cell Biol.* *107*, 1881–1891.
- Wegener, K.L., Partridge, A.W., Han, J., Pickford, A.R., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H., and Campbell, I.D. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* *128*, 171–182.
- Weiss, E.J., Hamilton, J.R., Lease, K.E., and Coughlin, S.R. (2002). Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood* *100*, 3240–3244.
- Wencel-Drake, J.D., Painter, R.G., Zimmerman, T.S., and Ginsberg, M.H. (1985). Ultrastructural localization of human platelet thrombospondin, fibrinogen, fibronectin, and von Willebrand factor in frozen thin section. *Blood* *65*, 929–938.
- Wéra, O., Lecut, C., Servais, L., Hego, A., Delierneux, C., Jiang, Z., Keutgens, A., Evans, R.J., Delvenne, P., Lancellotti, P., et al. (2020). P2X1 ion channel deficiency causes massive bleeding in inflamed intestine and increases thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* *18*, 44–56.
- Wewer, U.M., Shaw, L.M., Albrechtsen, R., and Mercurio, A.M. (1997). The integrin alpha 6 beta 1 promotes the survival of metastatic human breast carcinoma cells in mice. *Am. J. Pathol.* *151*, 1191–1198.
- White, J.G. (1969). The submembrane filaments of blood platelets. *Am J Pathol* *56*, 267–277.
- White-Adams, T.C., Berny, M.A., Patel, I.A., Tucker, E.I., Gailani, D., Gruber, A., and McCarty, O.J.T. (2010). Laminin promotes coagulation and thrombus formation in a factor XII-dependent manner. *J. Thromb. Haemost.* *8*, 1295–1301.
- Wight, T.N., Kinsella, M.G., and Qvarnström, E.E. (1992). The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *4*, 793–801.
- Wihlborg, A.-K., Wang, L., Braun, O.O., Eyjolfsson, A., Gustafsson, R., Gudbjartsson, T., and Erlinge, D. (2004). ADP receptor P2Y₁₂ is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 1810–1815.
- Wilson, S.J., Ismat, F.A., Wang, Z., Cerra, M., Narayan, H., Raftis, J., Gray, T.J., Connell, S., Garonzik, S., Ma, X., et al. (2018). PAR4 (Protease-Activated Receptor 4) Antagonism With BMS-986120 Inhibits Human Ex Vivo Thrombus Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *38*, 448–456.
- Wiviott, S.D., Braunwald, E., McCabe, C.H., Montalescot, G., Ruzyllo, W., Gottlieb, S., Neumann, F.-J., Ardissino, D., De Servi, S., Murphy, S.A., et al. (2007). Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* *357*, 2001–2015.
- Wonerow, P., Pearce, A.C., Vaux, D.J., and Watson, S.P. (2003). A critical role for phospholipase Cgamma2 in alphaIIb beta3-mediated platelet spreading. *J. Biol. Chem.* *278*, 37520–37529.

- Wong, P.C., Watson, C., and Crain, E.J. (2016). The P2Y1 receptor antagonist MRS2500 prevents carotid artery thrombosis in cynomolgus monkeys. *J. Thromb. Thrombolysis* *41*, 514–521.
- Wong, P.C., Seiffert, D., Bird, J.E., Watson, C.A., Bostwick, J.S., Giancarli, M., Allegretto, N., Hua, J., Harden, D., Guay, J., et al. (2017). Blockade of protease-activated receptor-4 (PAR4) provides robust antithrombotic activity with low bleeding. *Sci Transl Med* *9*.
- Woodfin, A., Reichel, C.A., Khandoga, A., Corada, M., Voisin, M.-B., Scheiermann, C., Haskard, D.O., Dejana, E., Krombach, F., and Nourshargh, S. (2007). JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. *Blood* *110*, 1848–1856.
- Woodley, D.T., Stanley, J.R., Reese, M.J., and O’Keefe, E.J. (1988). Human dermal fibroblasts synthesize laminin. *J. Invest. Dermatol.* *90*, 679–683.
- World Health Organization (2017). Cardiovascular Diseases (CVDs).
- Woulfe, D., Jiang, H., Mortensen, R., Yang, J., and Brass, L.F. (2002). Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets. *J. Biol. Chem.* *277*, 23382–23390.
- Wu, K.K., Le Breton, G.C., Tai, H.H., and Chen, Y.C. (1981). Abnormal platelet response to thromboxane A₂. *J. Clin. Invest.* *67*, 1801–1804.
- Wu, Y.-P., Bloemendal, H.J., Voest, E.E., Logtenberg, T., de Groot, P.G., Gebbink, M.F.B.G., and de Boer, H.C. (2004). Fibrin-incorporated vitronectin is involved in platelet adhesion and thrombus formation through homotypic interactions with platelet-associated vitronectin. *Blood* *104*, 1034–1041.
- Wujak, L., Didiasova, M., Zakrzewicz, D., Frey, H., Schaefer, L., and Wygrecka, M. (2015). Heparan sulfate proteoglycans mediate factor XIIa binding to the cell surface. *J. Biol. Chem.* *290*, 7027–7039.
- Xia, L., Sperandio, M., Yago, T., McDaniel, J.M., Cummings, R.D., Pearson-White, S., Ley, K., and McEver, R.P. (2002). P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J. Clin. Invest.* *109*, 939–950.
- Xiao, K., Garner, J., Buckley, K.M., Vincent, P.A., Chiasson, C.M., Dejana, E., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P. (2005). p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol. Biol. Cell* *16*, 5141–5151.
- Yan, Y., Yang, H., Hu, X., Zhang, Z., Ge, S., Xu, Z., Gao, J., Liu, J., White, G.C., and Ma, Y.-Q. (2019). Kindlin-3 in platelets and myeloid cells differentially regulates deep vein thrombosis in mice. *Aging (Albany NY)* *11*, 6951–6959.
- Yanaga, F., Poole, A., Asselin, J., Blake, R., Schieven, G.L., Clark, E.A., Law, C.L., and Watson, S.P. (1995). Syk interacts with tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets activated by collagen and cross-linking of the Fc gamma-IIA receptor. *Biochem. J.* *311* (Pt 2), 471–478.
- Yang, J.T., Rayburn, H., and Hynes, R.O. (1993). Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development* *119*, 1093–1105.

- Yeaman, M.R. (2014). Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol* *12*, 426–437.
- Yebrá, M., Diaferia, G.R., Montgomery, A.M.P., Kaido, T., Brunken, W.J., Koch, M., Hardiman, G., Crisa, L., and Cirulli, V. (2011). Endothelium-derived Netrin-4 supports pancreatic epithelial cell adhesion and differentiation through integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$. *PLoS ONE* *6*, e22750.
- Yu, I.-S., Lin, S.-R., Huang, C.-C., Tseng, H.-Y., Huang, P.-H., Shi, G.-Y., Wu, H.-L., Tang, C.-L., Chu, P.-H., Wang, L.-H., et al. (2004). TXAS-deleted mice exhibit normal thrombopoiesis, defective hemostasis, and resistance to arachidonate-induced death. *Blood* *104*, 135–142.
- Yuan, W., Leisner, T.M., McFadden, A.W., Wang, Z., Larson, M.K., Clark, S., Boudignon-Proudhon, C., Lam, S.C.-T., and Parise, L.V. (2006). CIB1 is an endogenous inhibitor of agonist-induced integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ activation. *J. Cell Biol.* *172*, 169–175.
- Yurchenco, P.D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.
- Zahid, M., Mangin, P., Loyau, S., Hechler, B., Billiald, P., Gachet, C., and Jandrot-Perrus, M. (2012). The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target. *J. Thromb. Haemost.* *10*, 2418–2427.
- van Zanten, G.H., de Graaf, S., Slootweg, P.J., Heijnen, H.F., Connolly, T.M., de Groot, P.G., and Sixma, J.J. (1994). Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest* *93*, 615–632.
- Zeng, D.F., Chen, F., Wang, S., Chen, S.L., Xu, Y., Shen, M.Q., Du, C.H., Wang, C., Kong, P.Y., Cheng, T.M., et al. (2018). Autoantibody against integrin $\alpha \text{v}\beta 3$ contributes to thrombocytopenia by blocking the migration and adhesion of megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost.* *16*, 1843–1856.
- Zerr, M., Hechler, B., Freund, M., Magnenat, S., Lanois, I., Cazenave, J.-P., Léon, C., and Gachet, C. (2011). Major contribution of the P2Y₁ receptor in purinergic regulation of TNF α -induced vascular inflammation. *Circulation* *123*, 2404–2413.
- Zhang, H., Berg, J.S., Li, Z., Wang, Y., Lång, P., Sousa, A.D., Bhaskar, A., Cheney, R.E., and Strömblad, S. (2004). Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* *6*, 523–531.
- Zhang, J., Varas, F., Stadtfeld, M., Heck, S., Faust, N., and Graf, T. (2007). CD41-YFP mice allow in vivo labeling of megakaryocytic cells and reveal a subset of platelets hyperreactive to thrombin stimulation. *Exp. Hematol.* *35*, 490–499.
- Zhang, W., Deng, W., Zhou, L., Xu, Y., Yang, W., Liang, X., Wang, Y., Kulman, J.D., Zhang, X.F., and Li, R. (2015). Identification of a juxtamembrane mechanosensitive domain in the platelet mechanosensor glycoprotein Ib-IX complex. *Blood* *125*, 562–569.
- Zhao, B.-Q., Chauhan, A.K., Canault, M., Patten, I.S., Yang, J.J., Dockal, M., Scheiflinger, F., and Wagner, D.D. (2009). von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. *Blood* *114*, 3329–3334.

- Zhao, K., Yang, M., Lu, Y., Sun, S., Li, W., Li, X., and Zhao, Z. (2019). P2Y₁₂ Polymorphisms and the Risk of Adverse Clinical Events in Patients Treated with Clopidogrel: A Meta-Analysis. *Drug Res (Stuttg)* 69, 23–31.
- Zheng, P.-S., Reis, M., Sparling, C., Lee, D.Y., La Pierre, D.P., Wong, C.-K.A., Deng, Z., Kahai, S., Wen, J., and Yang, B.B. (2006). Versican G3 domain promotes blood coagulation through suppressing the activity of tissue factor pathway inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* 281, 8175–8182.
- Zhi, H., Rauova, L., Hayes, V., Gao, C., Boylan, B., Newman, D.K., McKenzie, S.E., Cooley, B.C., Poncz, M., and Newman, P.J. (2013). Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood* 121, 1858–1867.
- Zhi, H., Dai, J., Liu, J., Zhu, J., Newman, D.K., Gao, C., and Newman, P.J. (2015). Platelet Activation and Thrombus Formation over IgG Immune Complexes Requires Integrin α IIb β 3 and Lyn Kinase. *PLoS ONE* 10, e0135738.
- Zhu, J., Luo, B.-H., Xiao, T., Zhang, C., Nishida, N., and Springer, T.A. (2008). Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol. Cell* 32, 849–861.
- Ziegler, M., Hohmann, J.D., Searle, A.K., Abraham, M.-K., Nandurkar, H.H., Wang, X., and Peter, K. (2018). A single-chain antibody-CD39 fusion protein targeting activated platelets protects from cardiac ischaemia/reperfusion injury. *Eur. Heart J.* 39, 111–116.

Le rôle de la GPVI et des intégrines plaquettaires en hémostase, en thrombose et dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires

L'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes assurent l'hémostase, mais sont également à l'origine de la thrombose artérielle responsable de pathologies ischémiques graves. Ces pathologies sont traitées par des antiplaquettaires ayant prouvé leur efficacité, mais qui augmentent le risque de saignement. L'objectif de ce travail a été de mieux comprendre les mécanismes impliquant les plaquettes en hémostase, en thrombose artérielle et dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires afin de réduire le risque hémorragique lié à ces traitements. L'identification d'une différence du rôle de la GPVI dans la formation du thrombus entre l'Homme et la souris indique que les agents anti-GPVI en développement pourraient être plus efficaces chez les patients que ce que laissait prévoir les études précliniques. L'utilisation de souris déficientes pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ plaquettaire n'a pas mis en évidence un rôle majeur de ce récepteur en thrombose artérielle, malgré une réduction de l'agrégation plaquettaire sur une surface de fibronectine en flux, suggérant que ce récepteur n'est pas une cible antithrombotique intéressante. Enfin, l'identification d'un rôle des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ plaquettaires dans l'arrêt des saignements en conditions inflammatoires confirme le risque de saignement lié au ciblage des intégrines $\beta 3$ plaquettaires.

Mots clés : plaquettes, hémostase, thrombose artérielle, GPVI, intégrines

The role of GPVI and platelet integrins in hemostasis, thrombosis and the arrest of bleeding under inflammatory conditions

Platelet adhesion, activation and aggregation ensure hemostasis but can also lead to arterial thrombosis inducing serious ischemic pathologies. Those are treated and prevented with antiplatelet agents which are reducing mortality but also increase the bleeding risk. The aim of this work was to improve our understanding of the mechanisms implicating platelet in hemostasis, arterial thrombosis and the arrest of bleeding under inflammatory conditions in order to reduce the bleeding risk due to these agents. Identification of a differential role of GPVI in thrombus formation between Human and mice indicate that anti-GPVI agents in patients might be more efficient than expected based on preclinical studies. The use of genetically deficient mice for platelet $\alpha 5\beta 1$ integrin did not point out a major role for this receptor in arterial thrombosis, although a reduction in platelet aggregation on fibronectin was evidenced in flow-based experiment. Identification of a role for platelet $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in the arrest of bleeding under inflammatory conditions confirm the increased bleeding risk due to platelet $\beta 3$ integrin targeting.

Keywords: platelet, hemostasis, arterial thrombosis, GPVI, integrins