



HAL
open science

MRP4 (ABCC4) plaquettaire : rôle dans la compartimentation de l'AMPc et dans la pharmacologie de l'aspirine

Alexandre Leuci

► To cite this version:

Alexandre Leuci. MRP4 (ABCC4) plaquettaire : rôle dans la compartimentation de l'AMPc et dans la pharmacologie de l'aspirine. Hématologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP5031 . tel-03879249

HAL Id: tel-03879249

<https://theses.hal.science/tel-03879249v1>

Submitted on 30 Nov 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 Paris

École doctorale **ED 563 Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries**

Laboratoire INSERM UMR_S1140 « Innovations thérapeutiques en hémostase »

MRP4 (ABCC4) plaquettaire : rôle dans la compartimentation de l'AMPc et dans la pharmacologie de l'aspirine

En français

Par Alexandre Leuci

Thèse de doctorat d'Hématologie

Dirigée par le Dr Christilla Bachelot-Loza

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2020

Devant un jury composé de :

Annabelle Dupont, PU-PH, Rapporteur

Alexandre Kauskot, CR-HDR, Rapporteur

Corinne Frere, MCU-PH, Examinatrice

Pascale Gaussem, PU-PH, Examinatrice

Jean Christophe Gris, PU-PH, Examineur

Christilla Bachelot-Loza, CR-HDR, Directrice de thèse



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

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Pascale Gaussem de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire depuis mon master 2 et de me faire l'honneur de présider ma thèse. Je vous remercie pour toutes les remarques et toute l'aide que vous m'avez apportée durant le temps passé au sein de l'unité.

Je remercie tous les membres de mon jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse. Je remercie tout d'abord le Professeur Annabelle Dupont et le Docteur Alexandre Kauskot d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également le docteur Corinne Frere et le Professeur Jean-Christophe Gris d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je voudrais remercier grandement ma directrice de thèse, le Docteur Christilla Bachelot-Loza, pour toute son aide. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, elle a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Je souhaite également remercier le Professeur Virginie Siguret de m'avoir fait confiance lors de la mission doctorale d'enseignement en hématologie, cela m'a permis de confirmer mon goût pour l'enseignement et de découvrir l'enseignement en hématologie par lames virtuelles.

Un grand merci à tous les membres de l'unité UMR_S 1140, chercheurs, ITA et étudiants pour leur accueil et les moments passés ensemble, merci pour toutes nos discussions sur des sujets divers et variés et ce, avec le soutien de l'Académie française. Un grand merci également à tous les étudiants qui ont agrémenté de bonne humeur le laboratoire à chacune de leur venue. Les années de thèse ont toutes une saveur différente.

Mes remerciements vont également à la plateforme d'imagerie cellulaire de la faculté de pharmacie et en particulier à Virginie Mignon pour tous ses conseils scientifiques et personnels au cours de ces 4 années.

Je remercie également tous les agents de l'animalerie centrale de la faculté dont les zootechniciens qui m'ont été d'une grande aide pour la gestion de l'élevage.

Je dédie cette thèse à ma famille, qui a su m'aider et me soutenir même après tant d'années d'études, cela m'a permis de garder le cap avec joie et bonne humeur.

Table des matières

Table des illustrations.....	1
Liste des figures.....	1
Abréviations	3
Introduction	5
Chapitre 1 Physiologie plaquettaire	7
1 Rôle physiologique des plaquettes	7
1.1 Implication dans l'hémostase.....	7
2 Production plaquettaire	8
2.1 Maturation et différenciation de la lignée mégacaryocytaire	8
2.2 Plaquetto-genèse.....	9
2.3 Morphologie plaquettaire	11
2.3.1 Zone externe	11
2.3.2 Zone intermédiaire	12
2.3.2.1 Cytosquelette d'actine	12
2.3.2.2 Les microtubules	12
2.3.3 Zone interne	12
2.3.3.1 Système canaliculaire	12
2.3.3.2 Granules	12
2.3.3.2.1 Granules alpha.....	12
2.3.3.2.2 Granules denses	13
2.3.3.2.3 Lysosomes	13
2.4 Durée de vie des plaquettes.....	13
3 Hémostase primaire	14
4 Activation plaquettaire par contact avec le sous-endothélium	15
4.1 Voie du complexe GPIb-IX-V.....	15
3.2 Voie du récepteur GPVI/ FcRy	16

4.3 Voie de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	18
5 Activation plaquettaire par des agents solubles	20
5.1 Voie des récepteurs PARs	20
5.2 Voie des récepteurs purinergiques	21
5.2.1 Récepteur P2Y1	22
5.2.2 Récepteur P2Y12	22
5.2.3 Récepteur P2X1	23
5.3 Voie des récepteurs des métabolites produits par la phospholipase A2	24
5.3.1 Métabolisme de l'acide arachidonique	24
5.3.2 Voie des cyclooxygénases (COX)	25
5.3.3 Voie du récepteur TP au thromboxane A2	27
5.3.3.1 Effets endothéliaux du thromboxane A2	27
5.3.3.2 Effets plaquettaires du thromboxane A2	27
5.3.4 Régulation thérapeutique de la voie de l'acide arachidonique	29
6 Régulation de l'activité plaquettaire	30
7 Nucléotides cycliques plaquettaires	32
7.1 Voie du GMPc	32
7.1.1 Production du GMPc	32
7.1.1.1 Production de NO par la NO synthase	32
7.1.1.2 Production du GMPc par la guanylate cyclase soluble	33
7.1.2 Effets plaquettaires du GMPc	34
7.1.3 Régulation du taux de GMPc	36
7.2 Voie de l'AMPc	37
7.2.1 Production de l'AMPc	37
7.2.1.1 Récepteur aux prostaglandines	37
7.2.1.1.1 Récepteurs aux prostaglandines induisant une inhibition plaquettaire	37
7.2.1.1.2 Récepteurs aux prostaglandines favorisant l'activation plaquettaire	38
7.2.1.1.3 Récepteurs aux prostaglandines IP	38

7.2.1.1.4 Récepteurs aux prostaglandines DP1	38
7.2.1.2 Production de l'AMPc par l'adénylate cyclase	38
7.2.3 Effets plaquettaires de l'AMPc	40
7.2.4 Régulation du taux d'AMPc	42
7.2.4.1 Action des PDEs	42
7.2.4.2 Compartimentation de la voie de l'AMPc	44
8 Protéine d'efflux « multidrug resistance-associated protein 4 »	47
8.1 Famille des MRPs.....	47
8.2 Structure de MRP4	47
8.3 Fonctions générales.....	48
8.4 Fonctions plaquettaires.....	49
Chapitre 2 : Effets antiplaquettaires de l'aspirine	51
1 Pharmacocinétique de l'aspirine.....	51
1.1 Etape d'absorption	51
1.2 Etape de distribution	52
1.3 Etape de métabolisation	52
1.4 Etape d'élimination	53
2 Pharmacodynamie de l'aspirine.....	53
2.1 Inhibition des protéines sanguines	53
2.2 Inhibition des COXs.....	53
2.3 Effet de l'aspirine sur l'endothélium	55
2.4 Effet plaquettaire de l'aspirine.....	55
2.5 Effets mégacaryocytaires de l'aspirine.....	56
3 Résistance thérapeutique à l'aspirine.....	57
3.1 Mesure de l'efficacité de l'aspirine	57
3.1.1 Dosage des thromboxanes	57
3.1.2 Mesure de l'activité plaquettaire résiduelle	57
3.2 Mécanismes de résistance	58

3.2.1 Variabilité de la réponse.....	58
3.2.2 Résistances pharmacologiques	59
3.2.2.1 Polymorphisme du récepteur P2Y1.....	59
3.2.2.2 Polymorphisme du récepteur aux thromboxanes.....	59
3.2.2.3 Polymorphisme de la COX-1.....	59
3.3 Implication de MRP4 dans la résistance pharmacologique à l'aspirine.....	59
Résultats	62
Chapitre 1 : Role of membrane lipid rafts in MRP4 (ABCC4)-dependent regulation of the cAMP pathway in blood platelets.	64
Introduction.....	65
Manuscrit.....	66
Discussion du manuscrit	98
Chapitre 2 : Evaluation of commonly used tests to measure the effect of single-dose aspirin on mouse hemostasis	104
Introduction.....	105
Manuscrit	106
Discussion du manuscrit	113
Résultats complémentaires	114
Conclusions et perspectives	118
Annexes	121
Annexe 1 : Murine platelet production is suppressed by S1P release in the hematopoietic niche, not facilitated by blood S1P sensing.....	123
Références bibliographiques	137
Résumé de thèse	163

Table des illustrations

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de l'hémostase	p07
Figure 2 Représentation schématique de la mégacaryopoïèse	p09
Figure 3. Réarrangement du cytosquelette et formation des plaquettes	p10
Figure 4. Ultrastructure d'une plaquette vue en microscopie électronique à transmission	p11
Figure 5. Voie de signalisation du récepteur GPIIb-IX-V	p15
Figure 6. Représentation de la voie GPVI- FcRγ	p16
Figure 7. Présentation des voies « outside-in » et « inside-out » associées à αIIbβ3	p18
Figure 8. Modèle de réponse en tandem des récepteurs PAR chez la souris et chez l'Homme	p21
Figure 9. Récepteurs P2X1 et P2Y plaquettaires	p22
Figure 10. Représentation de la voie métabolique catalysée par la phospholipase A2 avec ses principaux métabolites	p24
Figure 11. Métabolisme de l'acide arachidonique	p25
Figure 12. Représentation du métabolisme des COXs	p26
Figure 13. Représentation du mécanisme d'action de la COX	p26
Figure 14. Voie générale du thromboxane A2 selon la protéine G stimulée	p28
Figure 15. Séquence de dégradation de l'ATP et de l'ADP par le CD39 et le CD73	p30
Figure 16. Principaux mécanismes de contrôle de l'activation plaquettaire	p31
Figure 17. Voie de synthèse du NO à partir de la L-arginine	p32
Figure 18. Représentation de la structure de la GCs	p34
Figure 19. Activation des récepteurs aux prostaglandines et leur ligands	p37
Figure 20. Structure des adénylate cyclases membranaires	p39
Figure 21. Modèle d'activation de PKA par l'AMPC	p41
Figure 22. Modèle du complexe AKAP-PKA-PDE4D3 cardiaque	p44
Figure 23. Modèle de régulation d'un microdomaine AMPC	p45
Figure 24. Modèle de compartimentation de la voie de l'AMPC	p46
Figure 25. Représentation de la structure de MRP4	p47
Figure 26. Modèle de répartition plaquettaire de MRP4	p49
Figure 27. Représentation schématique du métabolisme de l'aspirine	p53
Figure 28. Superposition des sites de liaison des COX-1 et -2	p54
Figure 29. Mise évidence de la surexpression de MRP4 au sein de cellules DAMI	p60
Figure 30. Hypothèse de l'organisation de la voie de l'AMPC en microdomaine	p101
Figure 31. Hypothèse de l'organisation de la voie de l'AMPC au sein des radeaux lipidiques	p102
Figure 32. Hypothèse de l'organisation de la voie de l'AMPC au sein des radeaux lipidiques en conditions dénaturantes au repos et au cours de l'activation plaquettaire	p103
Figure 33. Répartition de la dose d'aspirine administrée selon la voie d'administration	p106
Figure 34. Immunoempreinte de plaquettes issues de souris après gavage par l'aspirine	p114
Figure 35. Observation en microscopie optique à 3 et 6 jours de culture avec aspirine 100 μM	p115

Abréviations

A

AA: acide arachidonique

ABC: ATP binding cassette

AC: adénylate cyclase

ADAM: A disintegrin and metalloprotease member

ADP: adénosine di-phosphate

AKAP: A-kinase anchoring protein

AKT : Protein Kinase B

AMP : adénosine monophosphate

AMPC : 3', 5' adenosine monophosphate cyclique

ARNm : acide ribonucléique messenger

AS : acide salicylique

ASA: aspirine

ATP: adénosine tri-phosphate

B-C

BTK/TEC: Bruton's tyrosine Kinase / Tyrosin protein Tec

CALDAG-GEFI: Calcium and DAG regulated guanine nucleotide exchange factor I

CFU-MK: colony forming unit megakaryocyte

COX : cyclooxygénase

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

D

DAG : diacyl-glycerol

DAMI : lignée mégacaryocytaire

DB: granule dense

Domaine PAS : domain Per-ARNT-Sim

DTS : système tubulaire dense

E-F-G

ELAM-1: endothelial leukocyte adhesion molecule-1

EPO: érythropoïétine

FAD: flavine adenine dinucleotide

GADS/GRB2: GRB2-related adaptator downstream of Shc / Growth factor receptor-bound protein

GAP: GTPase-activating protein

GCs: guanylate cyclase soluble

GMPc: 3', 5' guanosine monophosphate cyclique

GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 beta

GTP: guanosine triphosphate

H-I

H-Nox: heme-nitric oxide/oxygen binding domain

I.M. : intramusculaire

I.P. : intrapéritonéale

I.V. : intraveineux

IC 50 : concentration inhibitrice 50

ICAM-1 : intracellular adhesion molecule-1

IL6 : interleukine 6

IP3: inositol 1,4,5 triphosphate

IRAG: IP3 receptor associated cGK-I substrat protein

ITAM: immunoreceptor Tyrosine-based motif

ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

L-M-N

LAMP2: lysosome-associated membrane glycoprotein 2

LAT: Linker for activation of T Cells

LOXs: lipooxygénases

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

miRNA: medium interferent RNA

MK: Mégacaryocytes

MLC-*lia* : chaîne légère de la myosine IIa
MRP4: multidrug resistance-associated protein 4
MSD1: polytropic membrane spanning domain
MT : mitochondrie
M β CD : méthyl- β -cyclodextrine
NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBDs: nucleotide binding domains
NO: monoxyde d'azote
NOS: NO synthase

O-P

OCS : système canaliculaire ouvert
P.O. : *per os*
PA : principe actif
PAR : protease activated receptor
PDE 2A, 3A, 4D3, 5 : phosphodiesterase 2A, 3A, 4D3, 5
PECAM :
PG A à I : prostaglandine A à I
PGG2 / H2 : prostaglandine G2 / H2
PGI-2: prostaglandines I2
PI3-K : phosphoinositide 3-kinase
PIP2 : phosphatidylinositol (4,5) -biphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol (1,4,5) -triphosphate
PKA : protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKA-R1 : sous-unité catalytique de PKA
PKC : Protein Kinase C
PKG : protéine kinase dépendante du GMPc

PLA2C : phospholipase A2 cytosolique
PLC γ 2 : phospholipase C gamma 2

R-S

RGS/SPL/SHP-1: protéine RGS, spinophiline et « Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
RhoA: Ras homolog family member A
RIAM: RAP-1-GTP-interacting adaptor molecule
S1P: sphingosine 1 phosphate
SFK: Src Family Kinase
SLP76: SH2 domain containing leukocyte protein of 76 KDa
smAKAP: small AKAP
Structure CC: helical coil-coiled structure
Syk : Tyrosin protein kinase

T-V

TP : récepteur aux prostanoides
TPO: thrombopoïétine
TRAP: thrombin receptor activating peptides
TRCP6: Transient receptor potential cation channel 6
TXA2: thromboxane A2
TxB2: thromboxane B2
VASP: vasodilator-stimulated protein
VAV1/3: Vav guanine nucleotide exchange factor
VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Introduction

Chapitre 1 Physiologie plaquettaire

1 Rôle physiologique des plaquettes

Depuis leur identification dans leur participation au « bouchon hémostatique », participation soutenue et théorisée par Berger en 1970, le rôle attribué aux plaquettes s'étend aux files des années avec une participation à l'immunité, à l'inflammation et aux processus cancéreux (Harrison 2005).

1.1 Implication dans l'hémostasie

Les plaquettes, ou thrombocytes, sont des fragments de cellules anucléées issues des mégacaryocytes de la moelle, elles possèdent une durée de vie de 7 à 10 jours (Harrison 2005). L'ultrastructure d'une plaquette normale comporte de nombreuses organelles telles que des granules de stockage (granules alpha, denses et lysosomes), des mitochondries et un réseau de membrane interne appelé système canaliculaire interne (White 1968; Blair et al. 2009). Les plaquettes circulent de façon individuelle à hauteur de 150 à 450 G/L chez l'adulte (figure 1.1). De par leur petite taille et de par leur nombre relativement faible par rapport à la quantité d'érythrocytes, une concentration plus élevée de plaquettes est localisée dans les couches externes du régime laminaire que forme le flux sanguin circulant, ce qui les expose plus facilement aux inhibiteurs endothéliaux (Aarts et al. 1983). En revanche, lors d'une brèche vasculaire (figure 1.2), elles concourent avec d'autres acteurs sanguins au rétablissement de l'intégrité vasculaire et à l'arrêt des saignements (de Revel et al. 2004). L'hémostasie comporte trois phases avec d'une part l'hémostasie primaire, à l'origine de la formation du clou plaquettaire (figure 1.3), et d'autre part la coagulation qui implique les facteurs de coagulation activés, ce qui génère de la thrombine puis de la fibrine insoluble consolidant du caillot (figure 1.4) (de Witt et al. 2014). La dernière étape consiste à détruire le caillot une fois la lésion réparée, il s'agit de la fibrinolyse (figure 1.5) qui a pour but de rétablir une circulation normale.

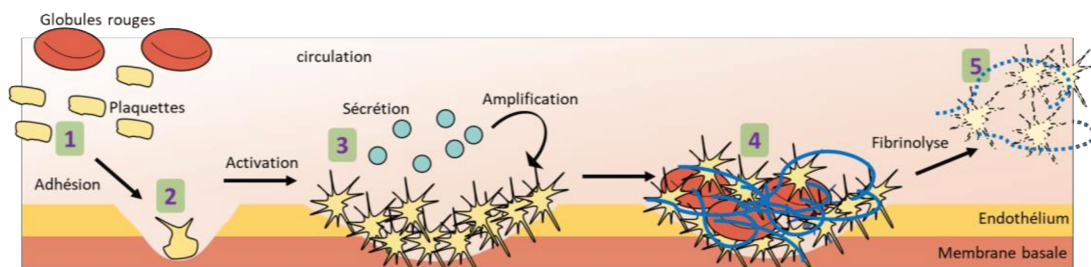


Figure 1. Représentation schématique de l'hémostasie, schéma adapté d'après Li et al., 2017. 1) Les plaquettes circulent à l'état de repos dans la circulation, 2) au cours d'une brèche vasculaire, elles adhèrent au sous endothélium démasqué et vont alors sécréter leur contenu granulaire, 3) les agents sécrétés permettent le recrutement d'autres plaquettes ce qui constitue une étape d'amplification de l'activation plaquettaire. 4) Au cours de la coagulation, la thrombine va transformer le fibrinogène en fibrine qui s'incorpore alors au caillot et permet sa consolidation, 5) une fois la brèche réparée le caillot est dissous par la plasmine lors de la fibrinolyse.

2 Production plaquettaire

2.1 Maturation et différenciation de la lignée mégacaryocytaire

Les plaquettes sont issues de cellules géantes appelées mégacaryocytes (MK), de 20 à 150 μm de diamètre, elles-mêmes issues des cellules souches hématopoïétiques, CSH (Vainchenker et al. 2017). Chez l'adulte, les CSH situées dans la moelle osseuse des os plats s'engagent dans une différenciation qui les conduit au stade de progéniteurs hématopoïétiques puis au stade de progéniteur myéloïde commun avant de s'engager dans la lignée mégacaryocytaire (Debili et al. 1996).

Au stade de progéniteurs mégacaryocytaires, stade CFU-MK (Colony forming unit megakaryocyte), les cellules ne sont pas morphologiquement reconnaissables mais elles expriment le CD34, marqueur commun des cellules hématopoïétiques immatures. Elles se retrouvent à proximité des vaisseaux sinusoïdes (Lichtman et al. 1978) et leur différenciation et maturation se font sous l'influence de divers facteurs comme la thrombopoïétine (TPO), les cytokines environnantes comme les interleukines IL6, IL11, l'érythropoïétine (EPO) et certains lipides de la niche hématopoïétique dont la sphingosine 1 phosphate (S1P) (Niazi et al. 2019) (Annexe 1).

Au cours de ce phénomène continu, stimulé par la TPO, les CFU-MK se différencient en mégacaryoblastes de stade I puis en mégacaryocytes basophiles ou de stade II pour finalement aboutir aux mégacaryocytes matures de stade III, également nommés mégacaryocytes plaquetto-gènes. Il existe tout au long de cette évolution une augmentation de la ploïdie par endoréplication (Nagata et al. 1997; Vitrat et al. 1998; Lordier et al. 2008) des MK jusqu'à 16 N en moyenne chez l'Homme et 128 N chez la souris (Tomer et al. 1988; Corash et al. 1989). Ceci s'accompagne d'une accélération de la synthèse des constituants cellulaires et une disparition de marqueurs des CSH comme le CD34 au profit de marqueurs spécifiques des MK et des plaquettes comme le CD41 (GPIIb), et le CD42b (GPIb) (figure 2).

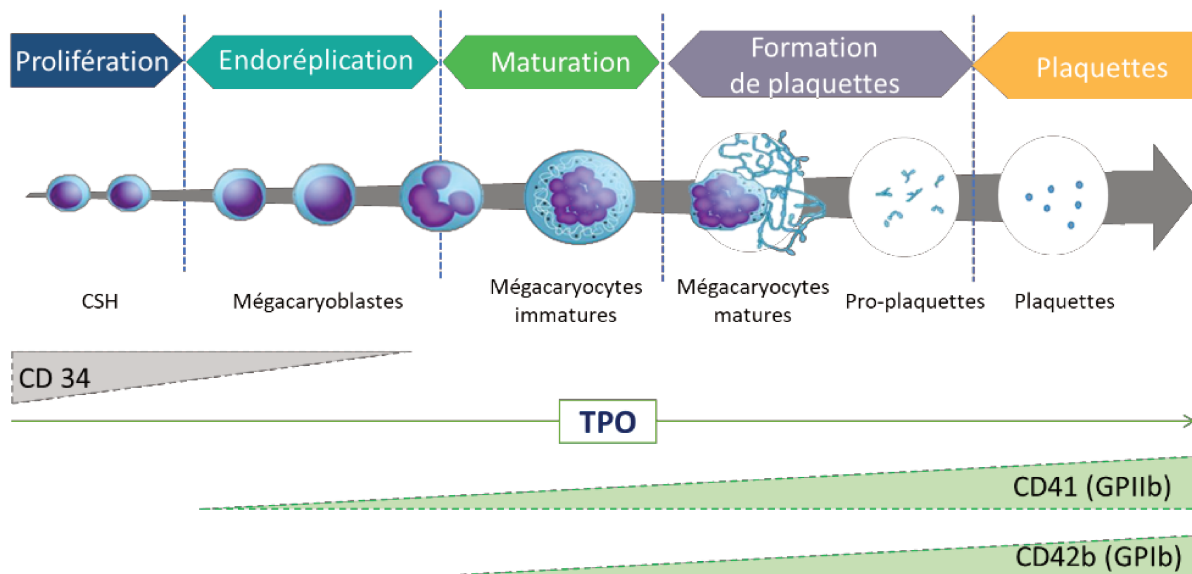


Figure 2. Représentation schématique de la mégacaryopoïèse, adaptée de Vainchenker et al, 2017. Le nombre de cellules souches s'accroît avant que ces dernières ne multiplient leur matériel nucléaire lors d'endoréplifications successives. Le mégacaryocyte poursuit sa maturation au cours du temps, sous stimulation de la TPO, comme en témoigne la disparition de marqueurs de ces CSH, en particulier le CD34 et par l'apparition de marqueurs spécifiques de la lignée, le CD41 et le CD42b. Une fois au stade mature, il y a la libération de proplaquettes dans la circulation puis fragmentation de ces proplaquettes en plaquettes. TPO : thrombopoïétine.

Une étude originale du groupe de Begonja montre que les nucléotides inhibiteurs plaquettaires jouent également un rôle au cours de la maturation des MK et de la production des plaquettes. Il existe un pic d'AMPc qui permet la maturation et la différenciation des progéniteurs en MK puis l'AMPc laisse place à un pic de GMPc qui est nécessaire pour l'étape de libération des plaquettes (Begonja et al. 2013).

2.2 Plaquettonogenèse

C'est au stade du MK mature que le cytosquelette et les membranes de démarcation se réarrangent pour former des proplaquettes puis des plaquettes (Radley et Scurfield 1980; Cramer et al. 1997), chaque MK pouvant alors former 1000 à 2000 plaquettes. Le MK, qui est à proximité des vaisseaux sanguins, réorganise son réseau de microtubules pour former des protrusions (Patel et al. 2005) au travers de la monocouche endothéliale du sinus médullaire vers la circulation où il libère alors les proplaquettes (figure 3) (Behnke 1969; Italiano et al. 1999). Depuis quelques années un deuxième site de production plaquettaire est reconnu suite à divers travaux, il s'agit de la circulation pulmonaire (Levine et al. 1993; Lefrançois et al. 2017).

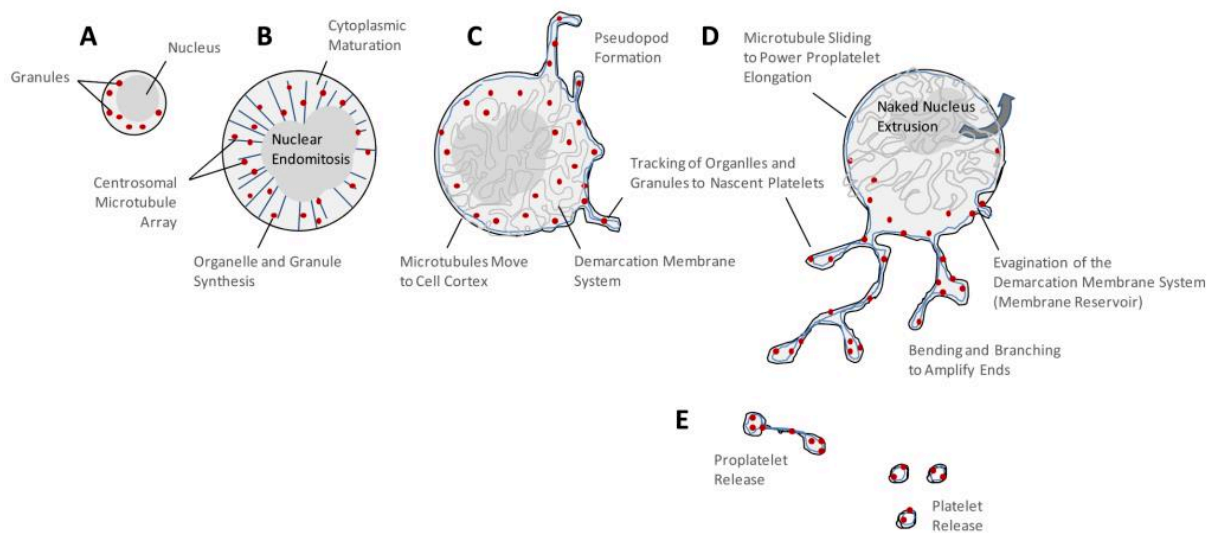


Figure 3. Réarrangement du cytosquelette et formation des plaquettes, d'après Thon et al, 2010. Au cours de la maturation, le mégacaryocyte subit des transformations majeures dont la migration des microtubules en périphérie de la cellule et la répartition des granules de sécrétion le long de ces microtubules. Le réarrangement des microtubules devenus périphériques va permettre la formation de pseudopodes et protrusions à l'origine de la formation des plaquettes.

Issus de la fragmentation des MK, les plaquettes ne possèdent pas de noyau mais contiennent toute la machinerie nécessaire pour la synthèse protéique dont l'ARNm (Booyse et al. 1967; Warshaw, et al. 1967; Shaw, Chesterman et al. 1984; Kieffer et al. 1987). Cependant il existe très peu de synthèse protéique dans les plaquettes, la majeure partie des variations quantitatives protéiques provenant du MK.

2.3 Morphologie plaquettaire

Mesurant 2 à 4 μm et de forme discoïde, l'ultrastructure plaquettaire a depuis longtemps fait l'objet de travaux de microscopie électronique, qui permettent de distinguer trois zones : une première zone externe avec la membrane et les récepteurs plaquettaire, une seconde zone intermédiaire avec le cytosquelette et une troisième zone interne avec les systèmes canaliculaires, les granules de sécrétion et les mitochondries (figure 4).

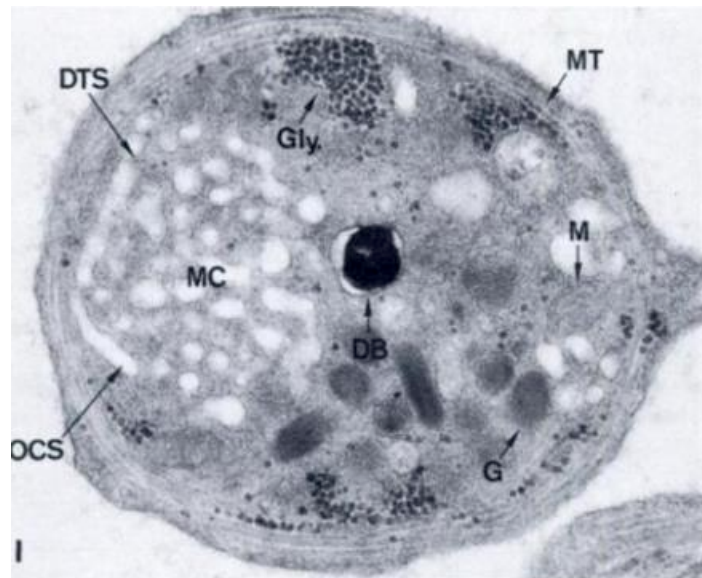


Figure 4. Ultrastructure d'une plaquette vue en microscopie électronique à transmission (White et Rao 1982). DTS : système tubulaire dense, OCS : système canaliculaire ouvert, DB : granule dense, MT : microtubules, G : granule alpha, M : mitochondrie.

2.3.1 Zone externe

La membrane cytoplasmique des plaquettes est de composition comparable à celle des autres cellules avec des phospholipides assemblés en bicouche dans laquelle s'insère du cholestérol, des glycolipides et des protéines membranaires. Elle présente une asymétrie de répartition des phospholipides avec les phospholipides cationiques sur la face externe et ceux anioniques (*phosphatidylsérine* et *phosphatidyléthanolamine*) sur la face interne. Au repos, la flipase une « ATP-dépendant aminophospholipid translocase » permet de maintenir cette asymétrie, asymétrie qui est rompue lors de l'activation avec l'exposition des phospholipides anioniques à la surface rendant les plaquettes procoagulantes. De nombreuses protéines sont insérées dans la membrane plasmique, on y trouve notamment des récepteurs de l'activation plaquettaire comme les récepteurs à la thrombine ou à l'ADP, des canaux ioniques et certaines intégrines comme $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 11\beta 3$ qui peuvent fixer respectivement le collagène et le fibrinogène.

2.3.2 Zone intermédiaire

2.3.2.1 Cytosquelette d'actine

L'actine, protéine la plus abondante dans les plaquettes (Thon et al. 2012), est présente à 40 % sous forme polymérisée de fibres d'actine, et les 60 % restant constituent une réserve de polymères. L'actine intervient pendant les phénomènes liés à l'activité contractile des plaquettes impliquée dans le changement de forme et la sécrétion au cours de l'activation plaquettaire (Diagouraga et al. 2014).

2.3.2.2 Les microtubules

Les microtubules se situent au niveau de la bande marginale des plaquettes. Ils forment un réseau circulaire structurant et donnant la forme discoïde aux plaquettes (White 1984). Composés d'alpha et de bêta tubuline, ce sont des structures dynamiques qui peuvent se polymériser et dépolymériser selon l'activité cellulaire, ce qui permet entre autres de déplacer certains organites en fonction des besoins cellulaires.

2.3.3 Zone interne

2.3.3.1 Système canaliculaire

Le système canaliculaire se compose du système canaliculaire ouvert (OCS) et du système tubulaire dense (STD) (Behnke 1969; White et al. 1980). L'OCS est un réseau de membrane invaginée communiquant avec la surface, il facilite l'endocytose, intervient dans la sécrétion plaquettaire et constitue une réserve de membranes pour la formation de pseudopodes lors de l'activation plaquettaire. Le STD est un reliquat du réticulum endoplasmique du MK (White 1972) et permet entre autres de séquestrer le calcium par l'intermédiaire de la calréticuline.

2.3.3.2 Granules

Les plaquettes possèdent divers types de granules et organelles, dont des peroxyosomes, et des granules sécrétoires : les granules alpha, les granules denses et les lysosomes, chacun étant de composition différente et assurant des fonctions complémentaires. Les plaquettes contiennent également des mitochondries qui participent au métabolisme oxydatif avec la production d'ATP, régulent la production des espèces réactives de l'oxygène et assurent la respiration cellulaire (Akkerman et al. 1981; Zharikov et al. 2013).

2.3.3.2.1 Granules alpha

Les granules alpha sont les granules de stockage les plus nombreux avec un nombre moyen de 50 à 80 par plaquettes. Ils contiennent également un grand nombre de protéines dont des protéines qui interviennent lors de l'hémostase (*tels que le fibrinogène, le facteur Willebrand et la fibronectine*) et des facteurs de croissance pour stimuler la cicatrisation (*Vascular Epithelium Growth Factor, Platelet-Derived Growth Factor et Transforming growth factor beta*). La membrane des granules alpha

constitue également un pool de réserve pour l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ qui est exposée lors de la sécrétion plaquettaire, augmentant le nombre total de ce récepteur à la surface. C'est aussi sur cette membrane qu'est spécifiquement localisée le P-sélectine, protéine qui, lorsqu'elle est exprimée à la surface plaquettaire, est un marqueur de la sécrétion de ces granules. Formés à partir de l'appareil de golgi, les granules alpha sont localisés proche de l'OCS et fusionnent avec ce dernier lors de l'étape de sécrétion (Flaumenhaft 2003).

2.3.3.2.2 Granules denses

Les granules denses jouent également un rôle lors de l'activation plaquettaire et favorisent la vasoconstriction. Ils contiennent de l'ADP, de la sérotonine qui est une amine vaso-active et des cations bivalents comme le calcium et le magnésium (Yadav et al. 2017). La sécrétion du contenu des granules denses participe à l'amplification de l'agrégation plaquettaire avec l'ADP sécrété qui active les plaquettes avoisinantes. Des travaux récents, dont ceux de notre équipe suggèrent la présence de l'AMPC, inhibiteur plaquettaire, au sein des granules denses (Decouture et al. 2015; Massimi et al. 2015).

2.3.3.2.3 Lysosomes

Les lysosomes se composent de différentes hydrolases acides dont la cathepsine, la β -galactosidase et l'élastase qui leur confèrent un rôle dans la dégradation des composants biologiques issus du métabolisme cellulaire. La libération du contenu de ces granules, qui participent à la lyse des thrombi, nécessite une forte activation plaquettaire.

2.4 Durée de vie des plaquettes

La plaquetto-genèse réalisée par les MK aboutit à la production des plaquettes circulaires, immatures et possédant un stock d'ARN, nommées plaquettes réticulées (Dale et al. 1995). Au cours de leur vie, elles deviennent matures avec notamment l'acquisition de leur forme discoïde et vivent 7 à 10 jours dans la circulation chez l'homme (Harrison 2005). La durée de vie des plaquettes est conditionnée par leur utilisation biologique comme dans l'hémostase mais également par la clairance plaquettaire qui inclut le vieillissement cellulaire avec la désialylation de la membrane cytoplasmique (Hoffmeister 2011; Kauskot et al. 2018). La plupart des médicaments sont susceptibles d'interférer sur la durée de vie ou la production des plaquettes par des mécanismes divers, toxiques ou immunologiques.

3 Hémostase primaire

Dans la circulation sanguine, les plaquettes circulent à l'état de repos grâce aux propriétés thrombo-résistantes de l'endothélium intact. En effet, les cellules endothéliales produisent notamment des inhibiteurs de l'activation plaquettaire comme la prostacycline I2 (PGI-2) et le monoxyde d'azote (NO), qui activent respectivement la voie de l'AMPc et du GMPc (Smolenski 2012). L'endothélium présente également une activité ecto ADP-asiq à sa surface conférée par le CD39 et CD73, qui limitent l'activation plaquettaire à l'ADP en le dégradant en adénosine, molécule qui possède une activité inhibitrice plaquettaire (Marcus et al. 1997). Au cours d'une brèche vasculaire, l'endothélium subit une série de changements et acquiert un phénotype pro-thrombotique avec entre autres l'arrêt de la sécrétion du NO et de la PGI-2 et à l'inverse la sécrétion de molécules pro-thrombotiques telles que le thromboxane A2. Par ailleurs, la brèche vasculaire conduit à l'exposition de la matrice sous endothéliale, riche en protéines adhésives dont le collagène et le facteur von Willebrand (VWF). En présence de forces de flux importantes ($> 800 \text{ s}^{-1}$) (Weiss et al. 1978), les plaquettes roulent puis adhèrent au VWF via la glycoprotéine GPIb-V-IX ; mais cette adhésion doit être renforcée par des récepteurs d'adhésion que sont les récepteurs au collagène, $\alpha 2\beta 1$ et GPVI et al. 2007; Z. Li et al. 2010) pour obtenir une adhésion stable des plaquettes.

Une fois adhérees, les plaquettes forment des pseudopodes, s'étalent, s'agrègent les unes aux autres et sécrètent leur contenu. Parmi les molécules libérées par les plaquettes, il existe une amine vasoactive, la sérotonine, mais aussi l'adénosine diphosphate (ADP) et des molécules néosynthétisées, telles que le thromboxane A2 (Ally et al. 1980; Murugappa et al. 2006) ; l'ADP et le thromboxane A2 sont deux molécules qui jouent un rôle crucial dans l'activation plaquettaire. Cette sécrétion, ainsi que la thrombine puissant activateur plaquettaire générée parallèlement par la cascade de la coagulation, vont permettre le recrutement d'autres plaquettes circulantes et induire le phénomène d'amplification de l'activation plaquettaire au voisinage de la lésion (Blair et al. 2009).

Les différents activateurs plaquettaires conduisent à l'activation d'une voie commune nommée la voie « inside-out » responsable de l'activation de l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (GPIIb/IIIa), nécessaire à la formation de l'agrégat. En particulier, $\alpha \text{IIb}\beta 3$ va fixer le fibrinogène au niveau de la séquence RGD \times et de la séquence dodécapeptide ce qui aboutit à la formation d'un agrégat plaquettaire.

4 Activation plaquettaire par contact avec le sous-endothélium

4.1 Voie du complexe GPIb-IX-V

La liaison des plaquettes au VWF immobilisé se fait par l'intermédiaire du complexe des glycoprotéines GPIb-IX-V (Luo et al. 2007), récepteur majoritaire de l'adhésion plaquettaire avec plus de 25 000 copies exprimées. C'est un récepteur transmembranaire qui se compose des glycoprotéines GPIb α (CD42b), GPIb β (CD42c), GPIX (CD42a) et GPV (CD42d) pour un ratio de 2 :4 :2 :1 (figure 5) (Luo et al. 2007). D'abord exprimé sous forme immature (Dong et al. 1998) il acquiert ses modifications post traductionnelles, N-glycosylation et O-glycosylation, et devient mature permettant entre autres de conférer une charge négative aux plaquettes au repos via ses sialylations.

Afin de se fixer à la sous unité GPIb α , le VWF doit se lier au collagène au niveau de la lésion ou changer de conformation à l'aide des forces de flux (J. Chen et al. 2005; Thomas 2009; Liu et al. 2015). Par ailleurs, les sous-unités GPIb β et GPIX aident à l'assemblage. De même, l'expression et la relocalisation du récepteur au sein des radeaux lipidiques membranaires (G. Xu et al. 2015) favoriserait l'adhérence au collagène comme le suggèrent les travaux de Feng et al 2000 et Williamson et al 2002.

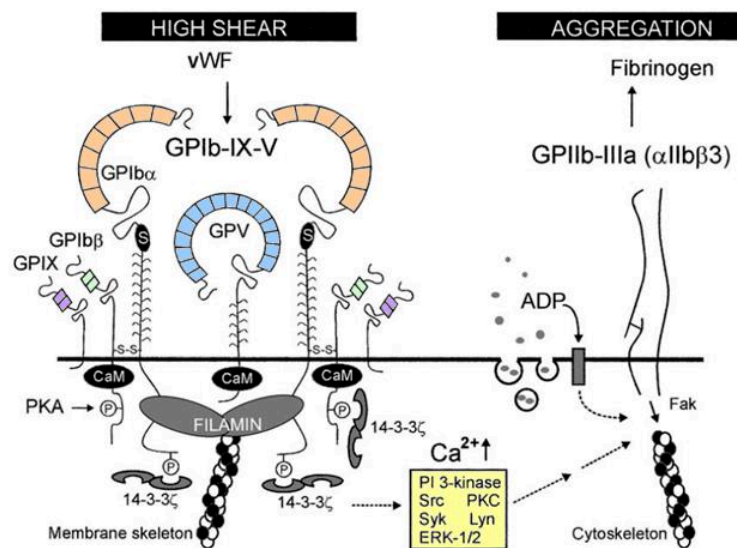


Figure 5. Voie de signalisation du récepteur GPIb-IX-V, (adaptée selon Andrews et al., 2003). Le Vwf se fixe sur le complexe GPIb-IX-V, ce qui entraîne le recrutement de la protéine 14-3-3. Cette protéine va activer divers effecteurs plaquettaires que sont PI3K, Src, Syk, PKC pour aboutir à l'activation de l'intégrine α IIb β 3 et à la sécrétion granulaire.

Après liaison du VWF au complexe GPIb-IX-V (Kasirer-Friede et al. 2004), la sous-unité GPIb recrute la protéine 14-3-3 qui active diverses protéines de signalisation (PI3-K, Src, Syk, PKC) qui vont aboutir à l'augmentation cytosolique du calcium, au réarrangement du cytosquelette, à la sécrétion des granules et à l'activation de l'intégrine α IIb β 3 (figure 5). La phosphorylation de la sous-unité GPIb α , par la

protéine kinase A, permet également le recrutement de la protéine 14-3-3 mais induit cependant une régulation négative de la liaison du VWF au récepteur GPIb-IX-V (Canobbio et al. 2004).

Lorsque le récepteur est non fonctionnel ou absent, comme dans le syndrome de Bernard et Soulier, on observe un dysfonctionnement de l'hémostase primaire qui se traduit par une macrothrombopénie et un syndrome hémorragique (Belluci et al. 1985; Costa et al. 2003; Berndt et al. 2011).

3.2 Voie du récepteur GPVI/ FcR γ

La liaison au collagène se fait via la glycoprotéine transmembranaire GPVI dimérisée. GPVI est également couplée à la chaîne γ des récepteurs Fc (FcR γ) (Miura et al. 2002; Herr et al. 2009) qui est responsable de la transduction du signal (Quek et al. 2000; Rayes et al. 2019). Le récepteur GPVI est présent à hauteur de 3000 copies par plaquettes (Best et al. 2003).

Après liaison du collagène, les kinases de la famille SFK (*Fyn* et *Lyn*) constitutivement associées à GPVI phosphorylent le motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) du récepteur FcR γ permettant le recrutement de Syk (B. Nieswandt et al. 2001; Polgár et al. 1997; Ezumi et al. 1998). Syk s'autophosphoryle et est phosphorylé par les kinases de la famille SFK, lui permettant de recruter l'adaptateur membranaire LAT (Linker for activation of T cells) et tous ses effecteurs. On retrouve parmi ces partenaires la PI3-K (phosphoinositide 3-kinase), qui phosphoryle le PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate) en PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) responsable de l'activation d'AKT (protéine kinase B), et la PLC γ 2 (phospholipase C gamma 2) qui produit du DAG (diacyl-glycerol) et de l'IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) respectivement responsable de l'activation de la PKC et de l'augmentation du calcium cytosolique suite à sa mobilisation du système tubulaire dense. AKT, PKC, en association avec le calcium conduisent à l'agrégation et à la sécrétion d'ADP et de thromboxane A2 néosynthétisé (B. Nieswandt et al. 2001; Atkinson et al. 2001).

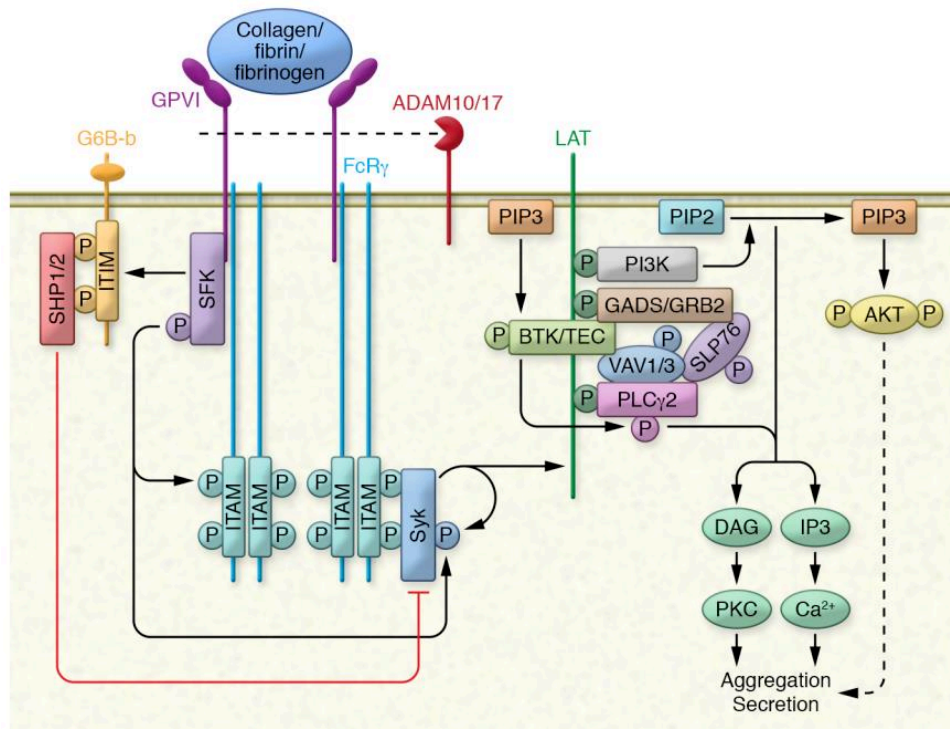


Figure 6. Représentation de la voie GPVI- FcR γ selon Rayes et al 2019. Après la liaison du collagène à la GPVI, une tyrosine de la famille SFK phosphoryle les motifs ITAM du FcR γ . Syk est ensuite phosphorylé et s'autophosphoryle, recrutant LAT et ses partenaires ce qui aboutit à la formation de deux second messagers, l'IP3, du DAG, à l'activation d'AKT, promouvant l'activation plaquettaire. SHP1/2 : "Src-homology 2 domain (SH2)-containing PTPs 1/2"; ITIM: "Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif", SFK: "Src Family Kinases"; ITAM: "Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif"; Syk: "Tyrosine-protein kinase SYK"; LAT: "Linker for activation of T cells"; PIP3: "Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate"; PIP2: "phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate"; PI3K: "phosphoinositide 3-kinase"; GADS/GRB2: "GRB2-related adaptor downstream of Shc / Growth factor receptor-bound protein 2"; BTK/TEC: "Bruton's tyrosine kinase / Tyrosine-protein kinase Tec"; VAV1/3: "vav guanine nucleotide exchange factor 1/3"; SLP76: "SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa"; PLC γ 2: "phospholipase C gamma 2"; AKT: "Protein kinase B"; DAG: "diacyl glycerol"; IP3: "inositol 1,4,5-trisphosphate"; PKC: "Protein kinase C".

Pour éviter une activation inappropriée, notamment en cas de forces de flux trop importantes, il existe des mécanismes de régulation négative des complexes GPVI-FcR γ notamment par élimination du récepteur suite au clivage de la partie extracellulaire de GPVI (« sheeding ») par les métalloprotéases ADAM-10 et 17 (Gardiner et al. 2007). Par ailleurs, l'activation d'une voie de signalisation ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) via les récepteurs PECAM ou GP6B conduit à l'inhibition de Syk et donc de la signalisation sous-jacente. Une réponse altérée au collagène peut être observée lors d'un déficit en récepteur FcR γ (Poole et al. 1997; B. Nieswandt et al. 2001) ou en cas de traitement à l'aspirine qui va réduire la part d'amplification que joue le thromboxane A2 lors de la sécrétion (Roth et al. 1994).

4.3 Voie de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$, ou GPIIb-IIIa, est l'intégrine clé dans les interactions plaquettaires car elle permet la formation du pont plaquette-fibrinogène-plaquette (*formation du clou plaquettaire*) mais elle permet aussi la rétraction du caillot. Sur les plaquettes au repos, $\alpha\text{IIb}\beta_3$ est exprimée sur la membrane plasmique à raison d'environ 80 000 copies sous une conformation de faible affinité-avidité pour ses ligands. Lors de l'activation plaquettaire, son expression à la surface augmente grâce à un pool de réserve mobilisable présent dans la membrane des granules alpha et dans le système canaliculaire de surface (Nurden et al. 1996).

Au cours de l'activation plaquettaire, l'augmentation du calcium et du DAG conduit à l'activation de CALDAG-GEFI (Calcium and DAG-regulated guanine nucleotide exchange factor I) responsable de l'activation de la protéine RAP1-GDP en RAP1-GTP. Ce dernier permet le recrutement, par l'intermédiaire des protéines RIAM (RAP-1-GTP-interacting adaptor molecule) de la taline 1 (protéine du cytosquelette) ; il se fixe également au cours de l'activation plaquettaire, la protéine kindline 3 (protéine de point d'adhésion focale) à la partie β_3 de l'intégrine (figure 7) (Bledzka et al. 2012; Yates et al. 2012; Shattil et al. 2010).

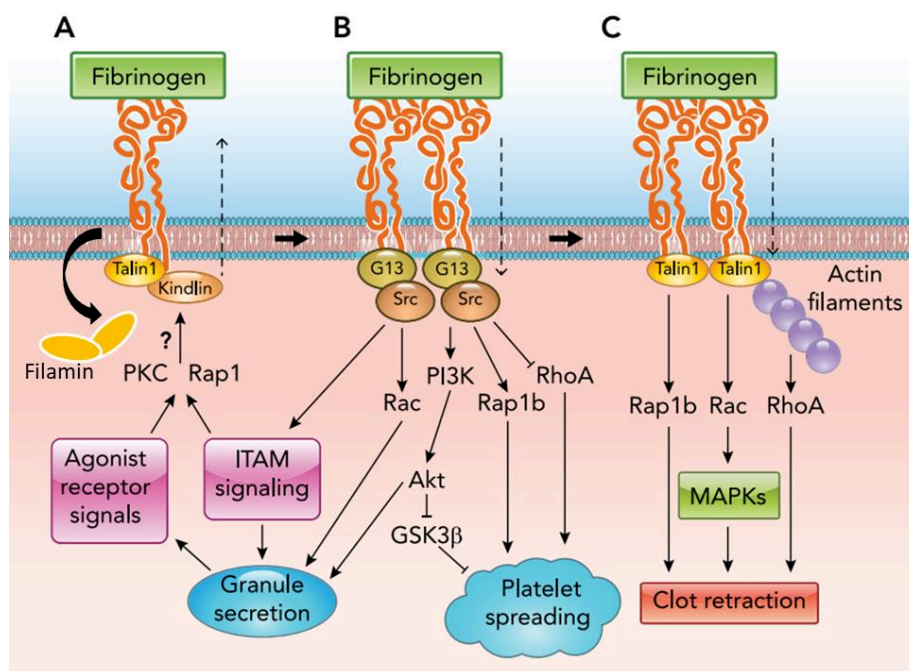


Figure 7. Présentation des voies « outside-in » et « inside-out » associées à $\alpha\text{IIb}\beta_3$, selon Estevez et al, 2017. Suite à l'activation d'un récepteur plaquettaire, un signal intraplaquettaire permet d'activer l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ qui va alors fixer le fibrinogène et transmettre un signal intraplaquettaire favorisant la sécrétion des granules, l'étalement des plaquettes mais aussi la rétraction du caillot. PKC: Protein kinase C, Rap 1: Ras-proximate-1, ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif, G13: G protein 13, Src: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate, PI3K: Phosphoinositide 3-kinases, RhoA: Ras homolog family member A, AKT: Protein kinase B, GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 beta, MAPKs: Mitogen-Activated Protein Kinases.

La liaison de ces deux protéines à l'intégrine n'est possible qu'après dissociation de la filamine A qui empêche l'activation de l'intégrine en occupant les sites de liaison de la taline 1 et de la kindline 3 de la partie $\beta 3$ de l'intégrine (Rosa et al. 2019). Une fois la taline 1 et la kindline 3 liées, l'intégrine passe de la conformation courbée inactive à une conformation « relâchée » capable de fixer ses différents ligands (Choi et al. 2013). Ces phénomènes d'activation de l'intégrine, suite à un signal intraplaquettaire, sont regroupés sous l'appellation de voie d'activation « inside-out » de l'intégrine $\alpha \text{IIb} \beta 3$.

Une fois sous sa conformation « relâchée », l'intégrine peut alors fixer son ligand, majoritairement le fibrinogène, au niveau des sites RGD_X et du dodécapeptide HHLGGAKQAGDV (Farrell et al. 1992; Bennett et al. 1997). L'intégrine transmet alors un signal via la tyrosine kinase Src (Arias-Salgado et al. 2003; Senis et al. 2014) : c'est la voie « *outside-in* » (figure 7). Une des réponses dépendantes de cette voie de signalisation « *outside-in* » est l'activité contractile des plaquettes qui résulte de la restructuration du cytosquelette avec notamment une réorganisation des filaments d'actine. Cette activité contractile est responsable de la rétraction du caillot, le rendant plus résistant aux forces de flux et à la fibrinolyse (Carr 2003; Lam et al. 2011).

5 Activation plaquettaire par des agents solubles

5.1 Voie des récepteurs PARs

L'activation plaquettaire induite par la thrombine s'effectue via les récepteurs couplés à des protéines G trimériques que sont les récepteurs PAR, « *protease activated receptor* », dont PAR-1 et 4 chez l'Homme (Kahn et al, 1998) et PAR-3 et 4 chez la souris (Christopher et al. 2003). Ils sont présents à hauteur d'environ 1500 copies chez l'Homme. PAR-4 répond à de fortes concentrations de thrombine alors que le PAR-1 répond à des concentrations de thrombine plus faibles grâce à la présence d'un domaine hirudine like (Kahn et al. 1998; Liu et al. 1991; Jacques et al. 2000; Ayala et al. 2001). Le récepteur subit un démasquage protéolytique en position N-terminale par la thrombine et c'est la séquence démasquée qui se replie sur elle-même pour activer le récepteur (Seeley et al. 2003).

Lors de la stimulation des récepteurs PAR, récepteurs couplés aux protéines Gq, Gz et G12/13 (Barr et al. 1997; Offermanns et al. 1997; Moers et al. 2003), la thrombine induit une forte activation plaquettaire partiellement dépendante de l'ADP et des thromboxanes sécrétés. Les récepteurs PAR furent initialement proposés également couplés directement à la protéine Gi (Coughlin 2005). Plus récemment, d'autres travaux montrent que lors de l'activation plaquettaire à la thrombine et en présence d'un inhibiteur de l'ADP, il n'y a plus d'inhibition de l'AC qui est le reflet de l'activation de la protéine Gi ; laissant supposer que l'effet du récepteur PAR activé par la thrombine est dû à l'effet d'amplification par l'ADP qui active P2Y12 couplé à Gi (Kim et al. 2002) (voir ci-dessous).

Chez la souris, le récepteur PAR-3 n'aboutit pas à une signalisation directe mais joue le rôle de cofacteur du PAR-4 ce qui permet à ce dernier d'être activé par des doses de thrombine plus faibles (figure 8) (Christopher et al. 2003; De Candia 2012).

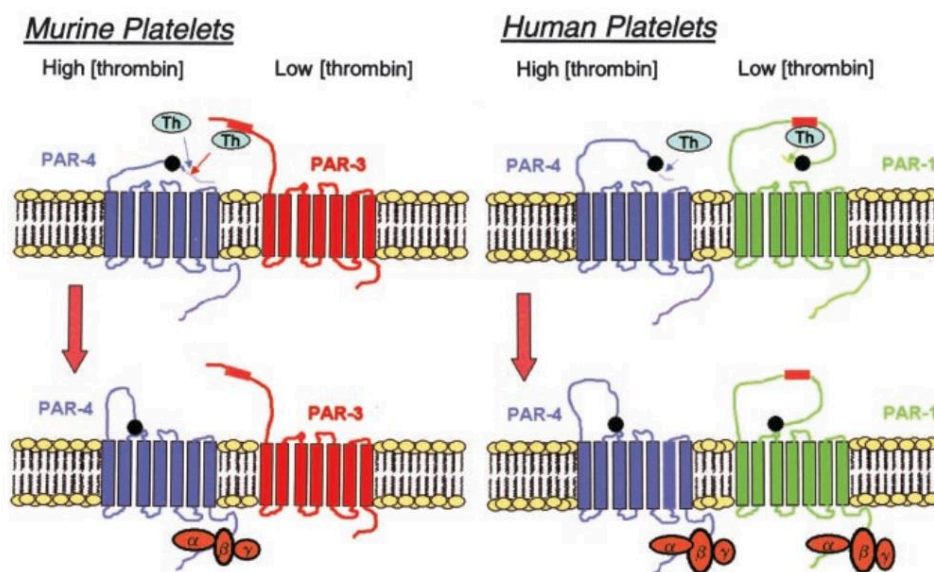


Figure 8. Modèle de réponse en tandem des récepteurs PAR chez la souris et chez l'Homme selon la concentration en thrombine mise en jeu, selon Major et al, 2003. Quand de faibles doses de thrombine sont en jeu, le PAR-3 murin active le PAR-4 qui permet l'activation plaquettaire tandis que chez l'Humain seul PAR-1 est activé et des doses de thrombine plus fortes sont nécessaires afin d'activer PAR-4. PAR: protease activated receptor.

Afin de s'affranchir de l'activité enzymatique de la thrombine et étudier spécifiquement la voie de signalisation induite par un récepteur PAR, l'activation du dit récepteur peut se faire par l'utilisation de peptides appelés TRAPs ou PARx-ap, « *thrombin receptor activating peptides* ». Ces peptides correspondent aux derniers acides aminés présents sur la partie N-terminale nouvellement démasquée à savoir SFLLRN pour le PAR-1 humain et AYPGKF pour le PAR-4 murin (Gerszten et al. 1994).

5.2 Voie des récepteurs purinergiques

L'ADP est un nucléotide activateur qui se fixe aux récepteurs couplés aux protéines G nommés P2Y1 et P2Y12, présents respectivement à hauteur de 150 et 400 copies et l'adénosine triphosphate (ATP) se fixe quant à lui à la protéine canal P2X1.

Bien que l'ADP joue un rôle crucial dans l'hémostase, comme en témoigne la stratégie antithrombotique souvent dirigée contre le récepteur P2Y12, l'ADP est un agoniste faible. En effet, utilisé seul en présence de calcium extracellulaire, l'ADP n'induit qu'une agrégation réversible sans sécrétion avec un rôle spécifique pour chacun de ses récepteurs associés à une protéine G distincte.

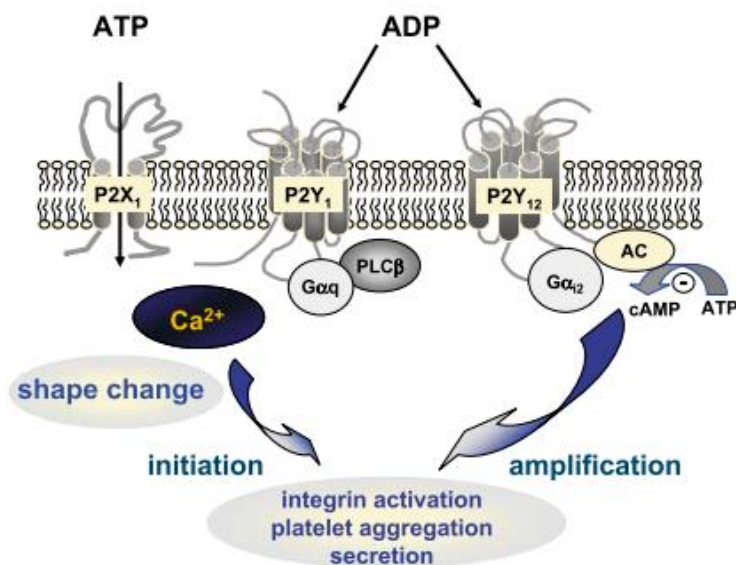


Figure 9. Récepteurs P2X₁ et P2Y plaquettaires, adapté selon Gachet 2008. P2X₁ est un canal qui permet l'influx rapide de calcium extracellulaire, provoquant un changement de forme. P2Y₁ est couplé à la protéine G_q et permet le changement de forme et une activation plaquettaire réversible. P2Y₁₂ est couplé à la protéine G_i et permet l'inhibition de l'AC et de potentialiser la sécrétion et l'activation plaquettaire.

5.2.1 Récepteur P2Y₁

La liaison de l'ADP au récepteur P2Y₁ conduit à l'activation de la protéine G_q (Murugappa et Kunapuli 2006) qui permet d'activer la phospholipase C afin de produire de l'IP₃ et du DAG (Offermanns et al. 1997). Ces seconds messagers aboutissent respectivement à la mobilisation du calcium intraplaquettaire et à l'activation de la PKC, ce qui permet l'activation transitoire des plaquettes et le changement de forme (Jin et al. 1998; Daniel et al. 1998).

5.2.2 Récepteur P2Y₁₂

Quand P2Y₁₂ est stimulé par l'ADP, il active la protéine G_{iα2} (Foster et al. 2001; Yang et al. 2002) dont la sous-unité α₂ permet de lever l'inhibition plaquettaire induite par l'AMPc en diminuant son taux basal via l'inhibition de sa production par blocage de l'adénylate cyclase (AC) (Yang et al. 2002; Murugappa et al. 2006). D'autre part, les sous-unités βγ activent la voie PI3K-AKT (Dangelmaier et al. 2001) et, en inhibant la protéine GAP (*GTPase-activating protein*) Rasa3, permettent de maintenir la petite protéine G, Rap1b, sous sa forme activée Rap1b-GTP. Ces voies de signalisation sont nécessaires pour l'amplification de l'agrégation de l'agrégation médiée par P2Y₁. L'activation de P2Y₁₂ par l'ADP sécrété joue également un rôle crucial dans l'amplification de l'activation plaquettaire induite par divers agonistes plaquettaires et en particulier par le collagène (Dorsam et al. 2002; Bernhard et al. 2002; Jin et al. 2002; Iyú et al. 2011).

5.2.3 Récepteur P2X1

La liaison de l'ATP à la protéine canal P2X1 déclenche un flux de calcium extracellulaire entrant qui permet d'augmenter rapidement le calcium cytosolique suite à l'activation plaquettaire. Bien que l'augmentation cytosolique du calcium déclenché par P2X1 soit plus faible que celui produit par le récepteur P2Y1 (Vial et al. 2002), il permet d'induire le changement de forme plaquettaire et ce notamment lors de l'activation au collagène (Oury et al. 2001). Cet influx de calcium est cependant potentialisé par la signalisation de P2Y1 (Vial et al. 2002) lors de l'activation des récepteurs purinergiques à l'ADP.

5.3 Voie des récepteurs des métabolites produits par la phospholipase A2

Sous l'action de phospholipase A2 cytosolique (*PLA2C*), dont l'activité est dépendante du calcium (Burke et al. 2009; Kramer et al. 1986), l'acide arachidonique (AA) est libéré à partir des phospholipides de la membrane plasmique en même temps que le lysophosphatidyl-Lyso-PAF métabolisé en PAF-acéther.

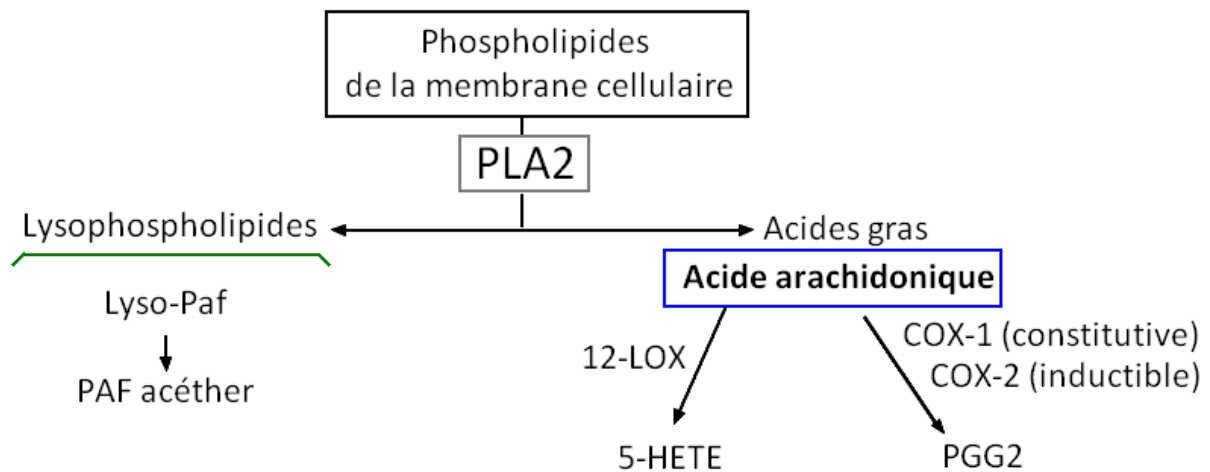


Figure 10. Représentation de la voie métabolique catalysée par la phospholipase A2 avec ses principaux métabolites, adaptée selon Gijon et al, 1999. La PLA2 permet de libérer du LYSO-PAF métabolisé en PAF et de l'AA. L'AA est métabolisé en 5-HPETE par la 12-LOX et en PGG2 par les COX1/2. PLA2: phospholipase A2; PAF: platelet activating factor; 12-LOX: lipoxygénases 5; 5-HPETE: 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid; COX 1-2: cyclooxygenase 1-2; PGG2: Prostaglandin G2.

5.3.1 Métabolisme de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique (AA) est un acide gras polyinsaturé noté 20 :4 (*n-6, n-9, n-12, n-15*) faisant partie de la famille des oméga 6. Il est produit à partir de l'acide linoléique en tant que précurseurs d'hormones et d'effecteurs eicosanoïdes ; c'est un acide gras essentiel. Il est inclus dans des phospholipides membranaires dont la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylcholine et les phosphatidylinositides. L'AA libéré depuis la membrane cellulaire est disponible pour être métabolisé par les cyclooxygénases, par les lipoxygénases (LOXs) ou pour réintégrer la membrane.

L'action plaquettaire des métabolites de la 12-LOX n'est pas complètement élucidée, étant parfois décrits comme antithrombotiques avec la diminution du métabolisme de l'AA ce qui induit une baisse de la synthèse des thromboxanes et de leur rôle amplificateur de l'activation plaquettaire, mais ils sont également décrits comme prothrombotiques en exerçant un rétrocontrôle positif sur la libération d'AA via la phosphorylation et l'oxydation de la kinase p38 MAPK (Coulon et al. 2003) et en augmentant l'agrégation induite par la thrombine (Sekiya et al. 1991).

Au sein des plaquettes, la voie des cyclooxygénases est la voie principale du métabolisme de l'AA, elle conduit à la formation de thromboxane A2, molécule activatrice plaquettaire. Ainsi, seule la voie des COXs sera développée par la suite.

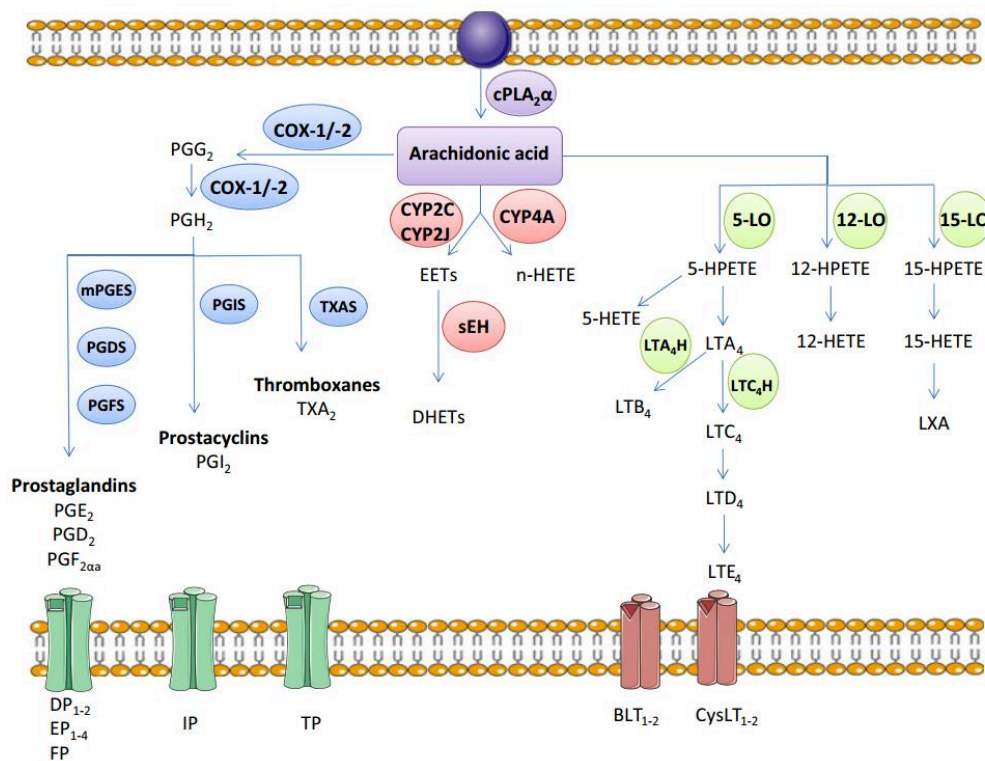


Figure 11. Métabolisme de l'acide arachidonique selon Merier et al, 2014. Libéré à partir de la membrane par la phospholipase C, l'AA peut être métabolisé en prostanoides par les COX1-2, métabolisé en acide hydroperoxyeicosanoïque par le CYP4A et métabolisé en leucotriènes par les LOXs. Au sein des plaquettes, seules les voies métaboliques de l'AA représentées par les COX et la 12-LOX sont présentes.

5.3.2 Voie des cyclooxygénases (COX)

La voie des cyclooxygénases, ou « *prostaglandin endoperoxide H synthase* », aboutit à la formation de prostaglandines, notées de PGA à PGI, et de thromboxane A2 (TXA2), agents modulateurs du tonus cardiovasculaire et impliqués dans l'hémostase. Les COX sont des enzymes dimériques, ancrées à la membrane (Picot et al. 1994; Xiao et al. 1998; Smyth et al. 2009), qui possèdent deux actions, une action cyclooxygénase qui permet d'abord de convertir l'AA en PGG2 (*prostaglandine G2*) puis une action de peroxydase qui réduit le PGG2 en PGH2 (*prostaglandine H2*) (Kawahara et al. 2015).

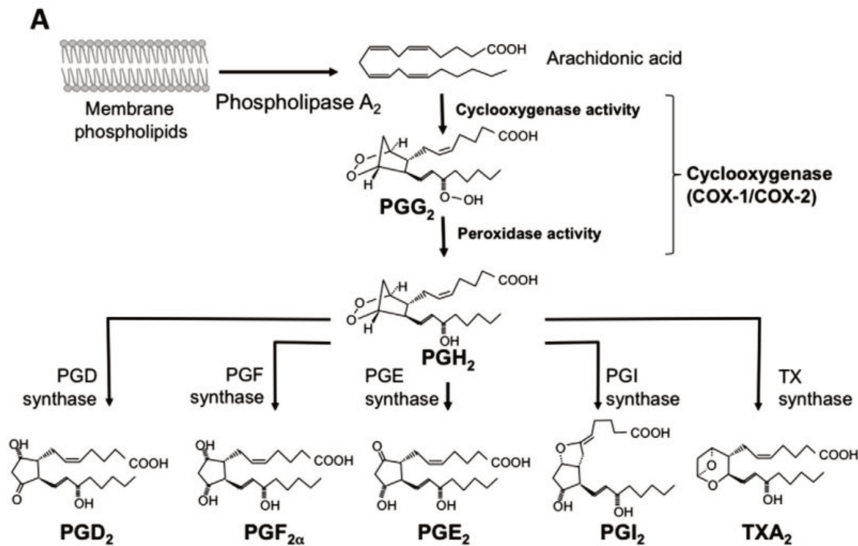


Figure 12. Représentation du métabolisme des COXs, selon Kawahara et al, 2015. L'AA peut être métabolisé par les cyclooxygénases 1 et 2 en prostaglandines (D, F, E, G) et en thromboxane A₂. COX : cyclooxygénase; PGG₂ : prostaglandin G₂; PGH₂ : prostaglandin H₂, PGD₂ /F₂ /E₂ /I₂ : prostaglandin D₂ /F₂ /E₂ /I₂; Tx synthase: thromboxane synthase; TXA₂ : thromboxane A₂.

La COX se compose d'un monomère qui possède une activité catalytique et d'un deuxième monomère qui agit comme régulateur allostérique du premier (Yuan et al. 2006). Selon les travaux de Yuan et al, 2006, le monomère catalytique fixe son ligand, induit un changement de conformation au niveau du deuxième monomère, l'empêchant alors de fixer un ligand. En retour, le deuxième monomère va modifier la conformation allostérique du premier monomère favorisant alors son activité d'oxygénase.

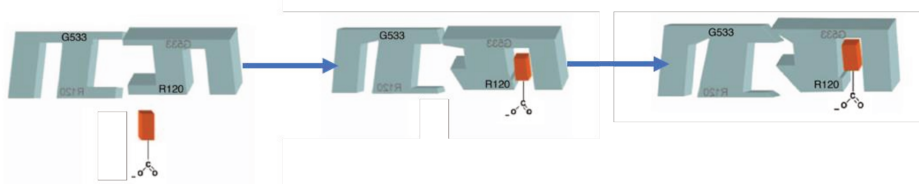


Figure 13. Représentation du mécanisme d'action de la COX, adaptée selon Yuan et al, 2006. Le premier monomère fixe son ligand et induit un changement de forme du second monomère. Le second monomère influence sur la configuration du premier monomère, lui permettant d'effectuer son activité enzymatique.

Dans divers types cellulaires, la COX-1 est responsable de la production basale de PGE-1 (Herschman 1996) et la COX-2 est une enzyme inductible faiblement exprimée (Lipsky et al. 2000) et dont l'expression est augmentée notamment en cas d'inflammation ou en réponse aux forces de flux élevées (O'Banion et al. 1992). Cependant, il existe des spécificités cellulaires avec 1) les cellules endothéliales qui synthétisent de la PGI-2 et de la PGE-1 par la COX-2 (Smith et al. 2000) pour maintenir les plaquettes circulantes au repos et 2) les plaquettes qui présentent la COX-1 (Reiter et al. 2000), impliquée dans la production du thromboxane A₂ et la COX-2 à un stade immature (Rocca et al. 2002).

De nombreux travaux suggèrent la présence d'une troisième enzyme, nommé COX-3, exprimée essentiellement au niveau cérébral et au niveau des coronaires (Chandrasekharan et al. 2002), mais selon certains travaux, cette enzyme serait en réalité un variant d'épissage de la COX-1 (Chandrasekharan et al. 2002; Davies et al. 2004). Cette enzyme permettrait selon certains auteurs de faire suite à l'action de la COX-2 sur l'inflammation aigüe pour réduire l'inflammation plus tardive (Willoughby et al. 2000; Serhan et al. 2002).

Au sein des plaquettes matures, seule la COX-1 est présente bien qu'en condition de renouvellement accéléré des plaquettes (Patrignani et al. 1999), la COX-2 peut être retrouvée exprimée au sein des MK et des plaquettes immatures (Rocca et al. 2002). L'effet des prostaglandines sur les plaquettes sera développé plus bas dans ce chapitre.

5.3.3 Voie du récepteur TP au thromboxane A₂

L'AA, via la cyclooxygénase puis la thromboxane synthase (Bauer et al. 2014), peut générer du TXA₂ qui exerce son action avant d'être métabolisé en thromboxane B₂ (TxB₂) (et al. 1975), seule molécule dosable mais inactive (Ekambara et al. 2011; Zhou et al. 2015). Du fait de sa courte demi-vie, environ 30 secondes à 37°C (Hamberg et al. 1975), et de l'absence de stockage, le TXA₂ agit comme un médiateur lipidique autocrine ou paracrine, agissant sur les cellules vicinales à sa production que sont majoritairement les plaquettes, les macrophages et les cellules mésangiales glomérulaires.

5.3.3.1 Effets endothéliaux du thromboxane A₂

Au niveau vasculaire, le TXA₂ est un agent vasoconstricteur puissant (Yamamoto et al. 1995) et un agent mitogène des cellules musculaires lisses aortiques (Morinelli et al. 1994). Le TXA₂ est aussi un agent promouvant le phénotype prothrombotique des cellules endothéliales par exposition de molécules d'adhésion telles que les « *intracellular adhesion molecule-1* » (ICAM-1), les « *vascular cell adhesion molecule-1* » (VCAM-1) et les « *endothelial leukocyte adhesion molecule-1* » (ELAM-1) (Ishizuka et al. 1998).

5.3.3.2 Effets plaquettaires du thromboxane A₂

A partir de l'acide arachidonique, la COX-1 et la thromboxane synthase microsomale plaquettaire (Needleman et al. 1976; Sun 1977) forment majoritairement du thromboxane A₂. Ce dernier peut induire par lui-même un changement de forme, l'agrégation et la sécrétion plaquettaire mais il joue surtout le rôle d'amplificateur de l'activation plaquettaire induite par des activateurs tels que la thrombine ou le collagène (Ally et al. 1980; Dorn et al. 1991).

Présent à hauteur de 1700 copies par plaquette, le récepteur des thromboxanes et prostanoides (TP) est un récepteur dont seule la forme alpha est présente au sein des plaquettes (Habib et al. 1999;

Friedman et al. 2015), bien que les ARNm de la forme bêta soient également présents (Hirata et al. 1996). Le récepteur TP alpha est retrouvé dans les plaquettes associé aux protéines G des familles Gq/11, G12/13 et Gs (Offermanns et al. 1994; Hirata et al. 1996; Kinsella et al. 1997).

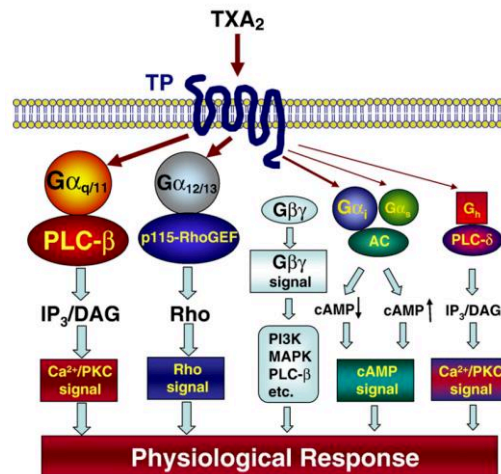


Figure 14. Voie générale du thromboxane A2 selon la protéine G stimulée, selon Nakahata et al, 2008. L'activation du récepteur TP plaquettaire au thromboxane induit l'activation de différentes protéines G dont la voie des protéines Gq/11, Gα12/13, Gs et Gi qui interviennent dans la régulation du taux d'AMPc cellulaire. A ce jour, la protéine Gi n'est pas décrite comme couplée au récepteur TP dans les plaquettes. DAG: diacyl glycerol; IP3: inositol 1,4,5-trisphosphate; PKC: Protein kinase C; PLCβ: phospholipase C beta; PLCδ: phospholipase C delta; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; MAPK: Mitogen-activated protein kinases; Rho: Rho GTPase.

La voie de la protéine Gq (Kinsella et al. 1997), voie majoritaire lors de l'activation du récepteur TP, induit une activation de la phospholipase C beta (*PLC-β*) qui dégrade les phospholipides membranaires en inositol 1,4,5-trisphosphates et en diacylglycérol (*IP3* et *DAG*) induisant une augmentation du calcium intracellulaire (Houslay et al. 1986; Nakahata et al. 1989); facilitant alors l'activation plaquettaire. La voie de la famille des protéines G12/G13 (Offermanns et al. 1994) contrôle la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine par l'intermédiaire des kinases Rho (Kozasa et al. 1998) permettant le remaniement du cytosquelette d'actine et le changement de forme plaquettaire lors de l'activation (Moers et al. 2004).

Au sein des plaquettes, le récepteur TP serait couplé à la voie de la protéine Gs comme le suggèrent les travaux de Hirata et al. où la stimulation du récepteur TP-α conduit à une augmentation de l'AMPc plaquettaire. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'augmentation de la production de l'AMPc interviendrait lors d'une faible activation du récepteur TP-α, limitant l'activation plaquettaire et que lors d'une activation du récepteur TP-α plus importante, l'activation de la PLC serait majoritaire et conduirait à l'activation plaquettaire (Hirata et al. 1996). A ce jour, le récepteur TP n'est pas retrouvé couplé avec la protéine Gi (Offermanns et al. 1994). La voie de la protéine Gh induit en parallèle de Gq une élévation du calcium mais par l'intermédiaire de la PLC gamma (Veza, Habib, et FitzGerald 1999).

Augmenté lors de l'activation et l'agrégation plaquettaire, l'effet activateur plaquettaire du TXA2 peut être contre balancé par un rétrocontrôle négatif suite à l'augmentation de la synthèse de PGI-2 endothéliale (Hunt et al. 1992) et consécutivement de l'AMPc plaquettaire (Muck et al. 1997) qui inhibent l'agrégation.

5.3.4 Régulation thérapeutique de la voie de l'acide arachidonique

L'AA et ses métabolites sont impliqués dans les phénomènes d'inflammation, de constriction vasculaire, d'asthme, d'agrégation plaquettaire et de cytoprotection ce qui en fait une voie de choix pour proposer des médicaments afin de limiter certains de ces effets. Il existe donc un arsenal thérapeutique pour limiter les effets de l'AA et des TXA2. Les glucocorticoïdes sont utilisés pour inhiber la libération de l'AA via la PLA2, les inhibiteurs de la thromboxane synthase tels que le ozagrel (Uchida et Murao 1981) et les inhibiteurs de la COX-1 tels que l'aspirine inhibent la formation des prostaglandines et du thromboxane (Driver, Marks, et van der Wal 2019) et les inhibiteurs du récepteur TP tels que le sulotroban (Patscheke et Stegmeier 1984).

De plus il existe des antagonistes spécifiques de certains métabolites finaux comme le montelukast qui inhibe la fixation des leucotriènes à leur récepteur (Markham et al. 1998). Par ailleurs, il existe également des analogues stables de la prostacycline, comme l'iloprost, utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (LeVarge 2015).

6 Régulation de l'activité plaquettaire

Afin de maintenir l'homéostasie de la réponse plaquettaire, d'éviter toute activation pathologique ou inappropriée et de limiter l'extension du caillot sanguin au site de la brèche vasculaire lors de l'hémostase, les plaquettes sont maintenues au repos ou limitées dans leur activation par divers mécanismes régulateurs.

Certains de ces mécanismes, dont fait partie l'activité ecto ADP-asiq, sont issus de l'endothélium. En effet, les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le maintien au repos des plaquettes par la synthèse de prostaglandines mais également en limitant l'activation plaquettaire à l'ADP. L'ADP, potentiellement libéré par l'endothélium endommagé, les plaquettes activées et les érythrocytes, est dégradé par une activité ecto ADP-asiq portée par le CD39 (*nucleotide phosphohydrolase*). Cette activité permet à l'endothélium de dégrader l'ATP en ADP et l'ADP en AMP, puis le CD73 dégrade l'AMP en adénosine, elle-même inhibitrice plaquettaire par activation de la voie de l'AMPc (Cooper et al. 1995; Marcus et al. 1997; Johnston-Cox et al. 2011).

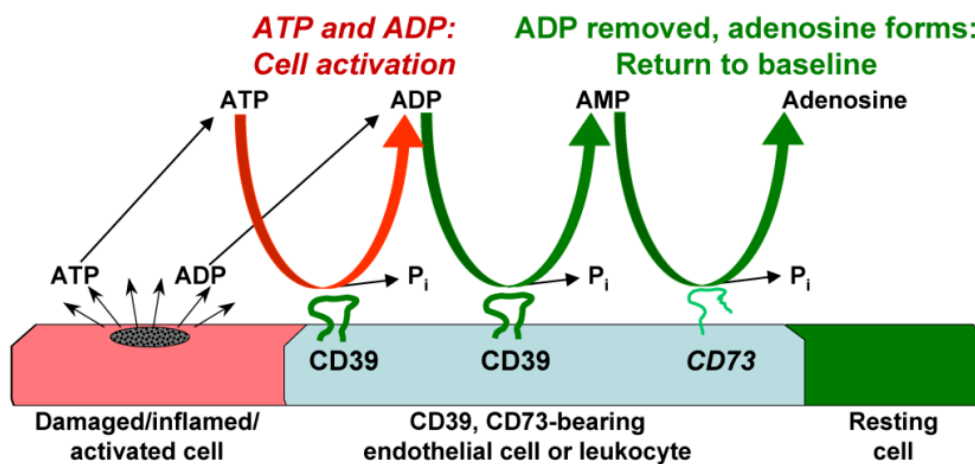


Figure 15. Séquence de dégradation de l'ATP et de l'ADP par le CD39 et le CD73, adaptée selon Fung et al, 2009. Lors de dommage cellulaire, il y a sécrétion d'ATP et d'ADP (*activateurs plaquettaires*) qui sont dégradés par le CD39 jusqu'au stade de l'AMP qui est lui dégradé en adénosine (*inhibitrice plaquettaire*) par le CD73.

D'autres mécanismes, internes aux plaquettes, impliquent la régulation des motifs ITAMs par les motifs ITIM, l'intervention de récepteurs nucléaires, la régulation des petites protéines à activité GTPases, des mécanismes non spécifiques comme la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G et la voie des nucléotides cycliques, seule voie développée par la suite (Bye et al. 2016).

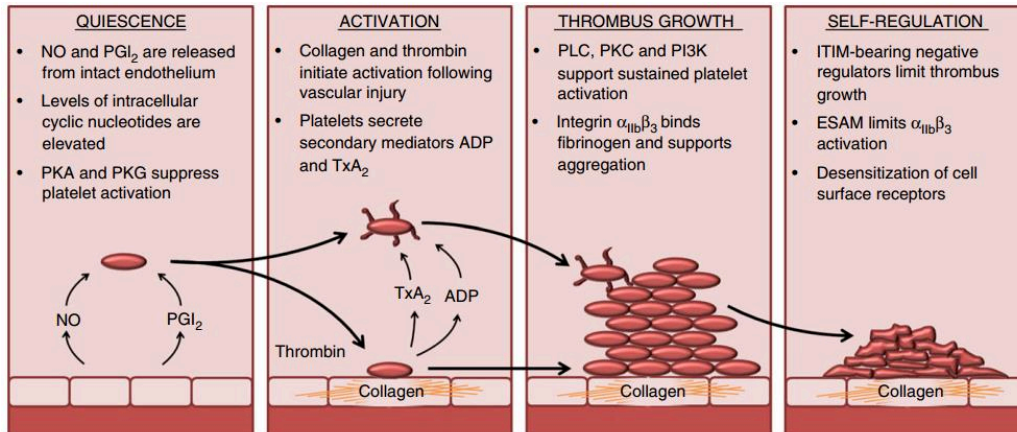


Figure 16. Principaux mécanismes de contrôle de l'activation plaquettaire, selon Bye et al, 2016. Au repos, c'est la voie des nucléotides cycliques stimulée par le NO et la PGI-2 produit par l'endothélium qui interviennent. Les plaquettes connaissent également un rétrocontrôle de l'activation par l'activité des motifs ITIM, la voie des protéines ESAM qui limitent l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et des mécanismes non spécifiques des plaquettes avec la désensibilisation des récepteurs.

7 Nucléotides cycliques plaquettaires

L'endothélium produit le monoxyde d'azote (NO) et la prostaglandine 2 (PGI-2) qui conduisent à l'activation du système inhibiteur que représentent les nucléotides cycliques intraplaquettaires. Le NO favorisant la production du 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (GMPc) par la guanylate cyclase (GC) et la PGI-2 favorisant la production de l'AMPc par l'adénylate cyclase (AC). Le taux des nucléotides cycliques est régulé par les phosphodiesterases qui les hydrolysent.

7.1 Voie du GMPc

7.1.1 Production du GMPc

Le NO, majoritairement produit par la NO synthase (NOS) de l'endothélium (R. M. Palmer, Ashton, et Moncada 1988), induit une inhibition de l'adhésion plaquettaire à l'endothélium et de l'agrégation lors d'activation plaquettaire par la thrombine (Palmer et al. 1987; Radomski et al. 1987). Pour ce faire, le NO sécrété des cellules endothéliales active directement la GC plaquettaire à l'origine de la production du GMPc. Ce second messenger a pour cible la protéine kinase G dont les cibles une fois phosphorylées, participent à l'inhibition de l'activation plaquettaire.

Par ailleurs, selon certains travaux, les plaquettes seraient également à l'origine d'une synthèse de NO basale, qui lors de l'activation plaquettaire induite par le collagène, serait accélérée (Zhou et al. 1995) conduisant à une augmentation du GMPc plaquettaire et constituerait alors un mécanisme de rétrocontrôle de l'activation plaquettaire (Anfossi et al. 2002).

7.1.1.1 Production de NO par la NO synthase

La production de NO s'effectue à partir d'un acide aminé non essentiel, la L-arginine (L-arg), présent à haute concentration dans le plasma ($80\mu\text{M}$). La L-arg (figure 16.1) est oxydée sur l'atome d'azote terminal de son groupement guanidine par la NOS pour produire la L-citrulline (figure 16.2) et le NO (figure 16.2). Le NO peut être par la suite oxydé en trioxyde d'azote (figure 16.4) avant de former des nitrites (figure 16.5) puis des nitrates (figure 16.6).

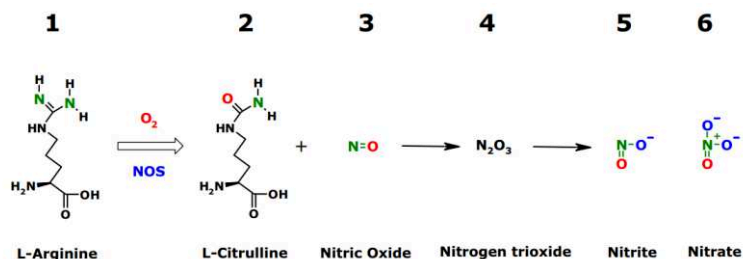


Figure 17. Voie de synthèse du NO à partir de la L-arginine, selon Gambaryan et Tsikas 2015. La L-arginine est convertie en L-citrulline et en NO sous l'action de la NOS, une réduction du NO est possible en nitrate puis en nitrite.

La NOS des plaquettes est similaire à celle retrouvée dans les cellules endothéliales (Sase et al. 1995) et se compose d'un dimère nécessitant la présence de la ferro-protoporphyrine IX (*hème*) et du complexe calcium-calmoduline (*la NOS est une enzyme calcium dépendante*). Afin de produire du NO, la NOS a besoin de cofacteurs que sont le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (*NADPH*) et la flavine adénine dinucléotide (*FAD*) pour le transfert des électrons nécessaire à la réaction (Alderton, Cooper, et Knowles 2001).

La NOS peut être inhibée par le découplage du complexe calcium- calmoduline et peut être activée par phosphorylation via la kinase AKT (Dimmeler et al. 1999; Fulton et al. 1999; McCabe et al. 2000). Ainsi les résultats de Freedman et al., qui mettent en évidence une augmentation de NO lors de l'activation plaquettaire à l'ADP, peuvent s'expliquer par l'activation de la protéine AKT (*lors de l'activation plaquettaire à l'ADP*) qui activerait la NOS et produirait du NO au cours de cette activation.

Bien que le NO ainsi que les nitrates et nitrites aient des actions plaquettaires, seul l'action du NO est décrite comme pouvant activer la GC soluble (*GCs*) (Gerzer et al. 1981), et seule l'action du NO sur la GCs sera développée par la suite.

7.1.1.2 Production du GMPc par la guanylate cyclase soluble

Le NO produit par les cellules endothéliales ne possède pas de récepteur plaquettaire. De par sa nature gazeuse, il diffuse au travers de la membrane plaquettaire pour activer la guanylate cyclase soluble (*GCs*), seule forme présente de GC au sein des plaquettes. La GCs se présente sous la forme d'un hétérodimère composé des sous unités alpha et bêta nécessaires à l'activité enzymatique (Koesling et al. 1991). La sous unité bêta semble cependant plus importante, les travaux de Wedel et al. montrent en effet qu'une délétion de la sous unité bêta entraîne une perte totale de l'activité enzymatique alors que la délétion de la sous unité alpha induit seulement une perte partielle, bien que marquée, de l'activité enzymatique (Wedel et al. 1995).

Chaque sous unité alpha et beta est composée de 4 domaines, seul le domaine H-NOX (*heme-nitric oxide/oxygen binding domain*) N-terminal diffère entre les deux sous unités. La sous unité beta comporte un domaine H-NOX héminique responsable de la fixation du NO en N-terminal (Gerzer et al. 1981; Ignarro et al. 1982). L'atome de fer contenu dans l'hème est initialement engagé dans un complexe pentavalent, noté Fe(II)-PPIX-(His) et comprenant l'histidine de la GCS, et c'est lors de la fixation du NO à l'atome de fer que se forme le complexe hexavalent qui est réduit par la suite avec la suppression de la liaison à l'histidine. La rupture de cette liaison induit un changement de conformation de la GCs qui devient active (Stone et Marletta 1996; Dierks et al. 1997). La deuxième partie de la GC comporte un domaine PAS (*Per-ARNT-Sim domain*) qui serait impliqué dans la dimérisation des sous unités et permettrait également de maintenir l'activité constitutive de la GCs

(Ma et al. 2008). Une troisième partie se compose du domaine structural CC (*helical coiled-coil*) en hélice et enfin la quatrième partie C-terminale comporte le domaine cyclase. C'est le rapprochement des deux CHD qui forme le site actif de l'enzyme (Montfort et al. 2017).

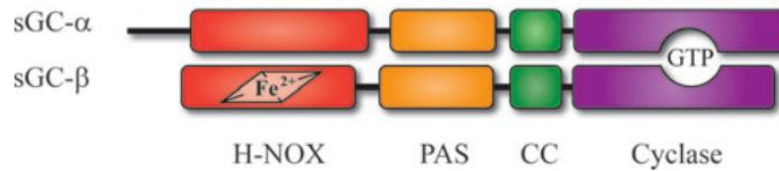


Figure 17. Représentation de la structure de la GCs, adaptée selon Montfort et al. 2017. Seule la sous-unité beta possède le motif héminique fixant le NO. Le reste de la structure, qui contient deux domaines de structure et le domaine catalytique, est similaire entre les deux sous-unités.

Il est à noter que la GCs peut également être activée directement sans passer par la partie héminique de l'enzyme, de tels agents sont dit activateur de la GCs, dont les composés BAY 41-2272 et BAY 41-8543 (Evgenov et al. 2006), alors que les agents activant la GCs par la partie héminique sont dit stimulateurs de la GCs dont le composé YC-1 et les donneurs de NO tel que le nitroprussiate de sodium (Priviero et al. 2010).

Bien que la structure soit acquise, le réarrangement des domaines suite à l'activation de la GCs est encore sujet à débat et deux modèles ressortent. Le premier modèle suggère que le domaine héminique, après fixation du NO et coupure de la liaison à l'histidine, active le domaine cyclase par l'intermédiaire d'un signal transmis par les domaines PAS (Campbell et al. 2014). Le deuxième modèle suggère que le domaine héminique soit constitutivement associé au site catalytique pour l'inhiber et c'est lors du changement de conformation que le domaine héminique se détache, libérant et activant le domaine cyclase (Fritz et al. 2013; Busker et al. 2014). L'activation de la GCs aboutit à la cyclisation du GTP en GMPc, libérant également un pyrophosphate.

7.1.2 Effets plaquettaires du GMPc

Les premiers travaux concernant la voie du NO ont montré un effet inhibiteur sur l'activation plaquettaire, effet inhibiteur médié par une augmentation intra plaquettaire du taux de GMPc. L'étude de la voie NO/GMPc implique d'une part l'utilisation de donneur de NO, qui augmente la synthèse du GMPc, et d'autre part l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la PDE5, le sildénafil, qui empêche la dégradation du GMPc (Gudmundsdóttir et al. 2005). L'utilisation d'inhibiteur de PDE5 seul n'a pas d'effet sur la concentration de GMPc plaquettaire (Wallis et al. 1999) et sur l'agrégation induite par le collagène, l'ADP et sur la sécrétion (Wallis et al. 1999; Berkels et al. 2001; Akand et al. 2015).

L'effet inhibiteur plaquettaire du NO implique l'activation de la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) dont seule l'isoforme beta (*PKG-1β*) est présente au sein des plaquettes humaines (Jang et al.

2002) ; les plaquettes de souris quant à elles expriment les deux isoformes PKG-1 β et une faible quantité de PKG-1 α (Geiselhöringer et al. 2004). PKG-1 β , contrairement à PKA, est une kinase monomérique comportant à la fois le domaine catalytique et le domaine régulateur (Francis et al. 2002). Le domaine régulateur peut fixer deux GMPc et le domaine catalytique fixe le magnésium et l'ATP ainsi que le substrat (Pfeifer et al. 1999). Les domaines de liaison au GMPc sont similaires à ceux de PKA pour la liaison à l'AMPc ; ils sont composés d'un tonneau béta, formé par huit feuillets béta antiparallèles et de trois hélices alpha l'entourant (Pfeifer et al. 1999). Il existe au sein des feuillets béta 6 et 7, responsables de la sélectivité du domaine aux nucléotides, la reconnaissance d'une phénylalanine contenue dans le motif peptidique du substrat. Cette phénylalanine rend le substrat spécifique pour PKG-1 β (Colbran et al. 1992). Le groupe de Smith et al. reporte que le GMPc provoque l'autophosphorylation de PKG-1 β sur la sérine 63 et 79, ce qui lève l'inhibition du domaine régulateur et augmente l'activité de PKG-1 β (Smith et al. 1996). L'activation de PKG inhibe les événements induits lors de l'activation plaquettaire.

Le GMPc inhibe, via PKG, la voie RhoA/ROCK ce qui induit une baisse de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine IIa (*MLC-IIa*) et induit la phosphorylation de la protéine Rap-1b et de la protéine « *vasodilator-stimulated phosphoprotein* » (*VASP*) impliquée dans la polymérisation de l'actine (Halbrügge et al. 1990), mécanisme responsable de l'absence de changement de forme de plaquettes incubées avec du NO avant activation (Aburima et al. 2017). L'activation de PKG induit directement une baisse de l'augmentation intracellulaire du calcium lors de l'activation plaquettaire par l'inhibition de la mobilisation du calcium via la protéine « IP3 receptor associated cGK-I substrate protein » (*IRAG*) (Nguyen et al. 1991; Geiger et al. 1992; Cavallini et al. 1996; Antl et al. 2007) mais PKG induit paradoxalement une expression de la P-sélectine au cours de l'activation plaquettaire (Schwarz et al. 2000).

Le NO empêche l'activation de l'intégrine α IIb β 3 et serait capable, selon les travaux de Keh *et al.*, de neutraliser les intégrines α IIb β 3 déjà activées (Horstrup et al. 1994; Aszódi et al. 1999; Keh et al. 2003). Après incubation de NO, il est observé une augmentation d'un facteur 5 du GMPc mais également une augmentation (bien que moindre (x 1,5)) de l'AMPc, inhibant tous les deux la phase secondaire de l'agrégation au collagène (Jang et al. 2002).

Bien que le rôle inhibiteur plaquettaire du GMPc soit unanimement accepté dans la littérature, certains groupes décrivent également un effet activateur au GMPc. En effet, dans ces travaux, ils observent que l'utilisation de l'inhibiteur de PDE5 (*qui ne modifie pas le taux plaquettaire de GMPc*) induit une augmentation de la réponse plaquettaire. Inversement, des plaquettes de souris invalidées pour PKG (*absence de signalisation en aval du GMPc*), présentent une diminution de la réponse plaquettaire au

VWF et à de faibles doses de thrombine (Li et al. 2003). Des observations similaires sont également retrouvées chez des patients déficitaires en GCs (Hervé et al. 2014). Si on prend en considération que l'activation du GMPc et de PKG conduisent à l'activation de PDEs dégradant l'AMPc (*voir ci-dessous*), l'effet positif de la voie du GMP/PKG observé par le groupe de Li et al. pourrait-être dû à l'effet des PDE2A, activées par le GMPc, diminuant alors le taux d'AMPc et favorisant l'activation plaquettaire à de faibles doses d'agonistes. Le groupe de Massberg et al. en 1999 montre également que dans des souris témoins transfusées, déplétées en plaquettes, avec des plaquettes invalidées pour PKG, il y a une baisse de l'adhésion des plaquettes à l'endothélium (Massberg et al. 1999).

Le rôle stimulateur du GMPc sur l'activation plaquettaire n'est démontré à ce jour que par quelques groupes et reste donc sujet à controverse. Si ce rôle devait être confirmé, cela pourrait alors laisser place à un concept intéressant de l'action du GMPc qui serait biphasique.

7.1.3 Régulation du taux de GMPc

Tout comme un défaut d'activation, un excès d'activation de la voie NO/GMPc/PKG peut être délétère comme le montrent les travaux de Annie-Jeyachristy *et al.*. Le groupe analyse des patients cirrhotiques et observe que leurs plaquettes possèdent une voie NO/GMPc/PKG amplifiée, ce qui se traduit en clinique par un phénotype hémorragique (Annie-Jeyachristy et al. 2013). Afin de réguler le taux de GMPc intervenant dans la balance thrombose/hémorragie, il existe dans la plaquette un mécanisme de régulation négative du taux des nucléotides cycliques. Ce mécanisme fait intervenir les PDEs qui peuvent accélérer la dégradation du GMPc selon sa production ; un deuxième mécanisme émerge avec la compartimentation des voies du GMPc en « signalosome » pour limiter la production et/ou la diffusion du GMPc selon l'état d'activation des plaquettes. Si ce deuxième mécanisme faisant appel à une régulation spatiale de la voie du NO/GMPc/PKG, a été clairement démontré dans les cellules musculaires lisses artérielles, à ce jour il existe très peu de données concernant une organisation similaire au sein des plaquettes.

7.2 Voie de l'AMPc

7.2.1 Production de l'AMPc

La production du 3',5'-cyclic adénosine monophosphate (AMPc) par l'adénylate cyclase, parfois nommée adénylyle cyclase (AC), est dépendante de l'activation de cette enzyme par des récepteurs couplés aux protéines G que sont les récepteurs aux prostaglandines. Les récepteurs aux prostaglandines sont quant à eux activés par les prostaglandines issues du métabolisme de l'AA via les COX1/2 endothéliales. L'AMPc ainsi produit a un effet inhibiteur sur l'activation plaquettaire et permet le maintien au repos des plaquettes dans la circulation.

7.2.1.1 Récepteur aux prostaglandines

Les récepteurs aux prostaglandines EP1, EP2, EP3, EP4, DP1 et IP sont présents dans les plaquettes et peuvent être classés en trois familles de récepteurs : 1) les récepteurs qui, par l'intermédiaire d'une protéine Gs, stimulent la production de l'AMPc et donc favorisent le maintien des plaquettes au repos (EP2, EP4, DP1 et IP) (Irie et al. 1994; Narumiya et al. 1999), 2) les récepteurs qui, par l'intermédiaire d'une protéine Gi, inhibent la production de l'AMPc (EP3) (Atsushi Irie et al. 1993) et 3) le récepteur EP1 couplé à la protéine Gq qui induit une augmentation de calcium cytosolique et favorisant l'activation plaquettaire. Une même prostaglandine peut, selon sa concentration, activer une famille de récepteurs à faible dose et la famille de récepteurs d'action opposée à plus forte dose.

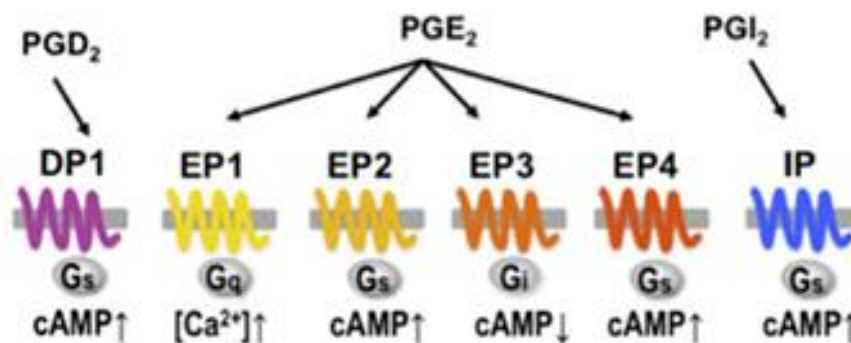


Figure 18. Activation des récepteurs aux prostaglandines et leur ligands, selon (Kawahara et al. 2015). Récepteur activateur de la voie de l'AMPc : DP1, EP2, EP4 et IP ; récepteurs inhibiteurs de la voie de l'AMPc : EP3 et récepteur induisant une augmentation de calcium : EP1. PGD₂ /E₂ /I₂: prostaglandin D₂ /E₂ /I₂.

7.2.1.1.1 Récepteurs aux prostaglandines induisant une inhibition plaquettaire

Les récepteurs EP2 et EP4 sont responsables, lors de leur activation, de la stimulation de l'AC via leur protéine Gs associée, aboutissant à une augmentation de l'AMPc intraplaquettaire et au maintien des plaquettes au repos (Philipose et al. 2010; Fabre et al. 2001; Petrucci et al. 2011).

7.2.1.1.2 Récepteurs aux prostaglandines favorisant l'activation plaquettaire

La PGE-2, exerce, à faibles doses (inférieures à 10^{-5} M), un effet activateur plaquettaire via les récepteurs EP3 qui induit, via la protéine Gi, une régulation négative de l'AMPc ce qui favorise l'activation plaquettaire. Bien que produite par les cellules musculaires lisses vasculaires, les auteurs questionnent la pertinence de la faible quantité plasmatique sur une réelle participation de la PGE-2 à l'activation plaquettaire en conditions physiologiques. Sa production peut cependant augmenter localement d'un facteur 30, au cours d'état inflammatoire, et pourrait dès lors activer les plaquettes via le récepteur EP3 (Fabre et al. 2001). Lorsque la PGE-1 stimule les récepteurs EP1, la protéine Gq associée au récepteur va induire une augmentation du calcium intracellulaire, favorisant l'activation plaquettaire.

7.2.1.1.3 Récepteurs aux prostaglandines IP

Les récepteurs IP sont stimulés par la PGI-2 ce qui induit une augmentation de l'AMPc intracellulaire via la protéine Gs qui stimule l'AC. La PGI-2 est un composé d'une demi-vie très courte de 3 minutes qui est principalement produite par l'endothélium des artères (Skidgel et Printz 1978). L'activation des récepteurs IP par la PGI-2 induit une inhibition de l'agrégation plaquettaire, du changement de forme et de la sécrétion (Tateson et al. 1977; González-Utor et al. 1992). Afin de pallier sa demi-vie courte, des analogues de la PGI-2 que sont l'iloprost et le cicaprost ont été développés (Schrör et al. 1981; Skuballa et al. 1986). Ces analogues sont non seulement plus stables mais également plus spécifiques des récepteurs IP (Stürzebecher et al. 1986). Les récepteurs IP peuvent également être stimulés par de fortes doses de PGE-2 (supérieures à 10^{-4} M), ce qui conduit également à l'augmentation de l'AMPc (Fabre et al. 2001).

7.2.1.1.4 Récepteurs aux prostaglandines DP1

La PGD2 possède un effet inhibiteur de l'agrégation suite à l'activation des récepteurs DP dont seule l'isoforme DP1 est présente au sein des plaquettes (Mills et al. 1974; Ito, et al. 1989). Un groupe rapporte la formation de PDG2 au cours de l'activation plaquettaire induite par la thrombine et l'ADP, ce qui en ferait plus volontiers une prostaglandine de rétrocontrôle de l'agrégation qu'une prostaglandine inhibitrice de l'agrégation (Oelz et al. 1977).

7.2.1.2 Production de l'AMPc par l'adénylate cyclase

C'est au début des années 1960 que l'équipe du lauréat du prix Nobel Sutherland et al. démontre l'existence d'un complexe produisant l'AMPc qu'il nomme adénylate cyclase (AC). Cette enzyme est isolée des fractions cellulaires contenant des membranes, autres que mitochondriales et microsomiales, et ce parmi un grand nombre d'espèces animales. L'AC est dès lors proposée comme une enzyme membranaire pouvant provenir de la membrane plasmique ou de l'enveloppe nucléaire. (Sutherland et al. 1962; Rall, Sutherland et al. 1962; Murad et al. 1962; Klainer et al. 1962).

Exprimée de façon ubiquitaire (Robison et al. 1971), selon son activation et selon la cellule impliquée, l'AC peut conduire à des effets cellulaires différents. L'AC catalyse la conversion de l'ATP en AMPc, ce dernier doit cependant être protoné et complexé au magnésium noté « ATP-H-Mg », en effet, l'ATP libre semble inhibiteur de l'enzyme (Birnbaumer et al. 1969). L'activité de l'AC est régulée par certains nucléotides comme le GTP et indirectement par divers composés biologiques tels que les hormones de type catécholamines et les prostaglandines. L'AC est également une enzyme régulée par les cations bivalents dont le calcium qui semble inhibiteur et le magnésium qui participe à son activité (Steer et al. 1975).

Il existe chez l'Homme les AC de classe IIIa comprenant la famille des AC membranaires (ACm) avec les sous-groupes I (AC 1, 8 et 3), II (AC 2, 4 et 7), III (AC 5 et 6) et IV (AC 9) ainsi que la classe IIIb que sont les AC solubles (ACs) avec le sous-groupe V (AC 10) (Sunahara et al. 1996; Linder et al. 2003). Les ACm se composent, de N-terminal vers C-terminal, d'une deuxième partie composée de six domaines transmembranaires, du domaine catalytique C1a, d'une troisième partie composée de 6 domaines transmembranaires suivis du domaine catalytique C2a (Tesmer et al. 1997; Zhang et al. 1997). Le site catalytique de l'enzyme est formé soit par un complexe homodimérique possédant un site actif soit d'un complexe hétérodimérique possédant deux sites actifs (Vercellino et al. 2017). L'interface entre ces deux dimères forme le site actif de l'enzyme et comporte un site de liaison à des agents activateurs comme la forskoline et un domaine de liaison à l'ATP et au magnésium. La liaison simultanée d'une molécule d'ATP et de deux ions magnésium, permet à ces derniers de stabiliser l'ATP et de déprotoner son groupement γ -phosphate qui change ensuite de conformation permettant la formation de l'AMPc (Tesmer et al. 1999).

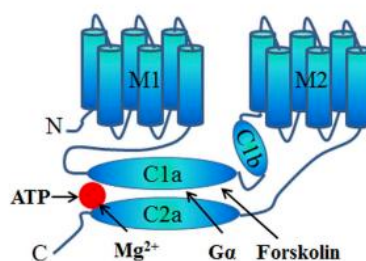


Figure 19. Structure des adénylate cyclases membranaires. (Boularan et Gales 2015). L'ACm comprend un premier domaine transmembranaire M1, du domaine catalytique Ca1, un peptide liaison C1b, un deuxième domaine transmembranaire M2 suivie du domaine catalytique C2a. Les domaines C1a et C2a forment le site actif de l'enzyme avec un site de liaison pour la forskoline, pour les sous unités alpha des protéines G, l'ATP et les ions magnésium. ATP : adénosine triphosphate, $G\alpha$: sous-unité alpha des protéines G, Mg^{2+} : ion magnésium, N : partie N-terminale et C : partie C-terminale de la protéine.

L'activité de l'AC est régulée par des changements de conformation induits par les protéines G et les agents modulateurs. Les domaines C1a et C2a fixent la protéine Gs et la forskoline (FSK) lors de l'activation de l'AC (Seamon, Padgett, et Daly 1981; Insel et Ostrom 2003; Pinto et al. 2008) et la sous-unité C1a ne fixe que la protéine Gi lors de l'inhibition de l'AC qui change alors de conformation (Dessauer et al. 1998; Chen-Goodspeed et al. 2005).

Les ACs sont un cas particulier des AC, en effet elles ne sont pas activées par la FSK et peuvent également produire du GMPc bien qu'elles possèdent une plus grande affinité pour l'ATP (Hasan et al. 2014; Kleinboelting et al. 2014). La structure des ACs comprend une queue N-terminale, le domaine catalytique C1a connecté au domaine catalytique C2a, un domaine auto inhibiteur « *P-site* » et un domaine d'interaction protéine-protéine (Tang et al. 1995; Kleinboelting et al. 2014).

Bien qu'il existe plusieurs isoformes, très peu d'études identifient les isoformes présentes au sein des plaquettes. Les études disponibles révèlent la présence des isoformes AC3, AC5, AC6 et AC7, à ce jour aucune ACs n'a été retrouvée dans les plaquettes (Burkhart et al. 2012; Hellevuo et al. 1997; Lewandrowski et al. 2009; Raslan et al. 2015; Zahedi et al. 2008).

7.2.3 Effets plaquettaires de l'AMPc

Suite aux premiers travaux de 1969, il est actuellement admis : 1) qu'une augmentation de l'AMPc inhibe l'activation plaquettaire à la thrombine, se traduit par un retard de l'agrégation puis une baisse de l'amplitude de l'agrégation pour le collagène et inhibe la sécrétion de la sérotonine pour l'ADP, et 2) qu'au cours de l'activation plaquettaire, l'AMPc diminue (Salzman et al. 1969; Salzman et al. 1971; Salzman et al. 1972). Cependant, suite à une première diminution de l'AMPc, plusieurs études ont mis en évidence une ré augmentation de l'AMPc lors de l'activation à la thrombine (Droller et al. 1972; Salzman et al. 1972).

L'action de l'AMPc est en partie médiée par la « *cAMP-dependent protein kinase* » (PKA) qui est un hétérotétramère formé de deux sous-unités catalytiques (*C α* ou *C β*) et deux sous-unités régulatrices (*R 1α* , *R 1β* , *R 2α* , *R 2β* et *R 3*) noté R₂C₂, constituant les isoformes PKAI et PKAII au sein des plaquettes. Bien que PKA soit un hétérotétramère R₂C₂, la régulation se déroule au sein de chaque complexe dimérique R₁C₁, chaque sous-unité R régulant alors l'activité d'une sous-unité C (Rannels et al. 1985). La sous-unité R possède deux sites de liaison à l'AMPc, le premier (A) est situé au centre de la sous-unité et permet une dissociation rapide suite à la liaison de l'AMPc et le deuxième (B), situé vers l'extrémité C-terminale, permet une dissociation lente suite à la liaison de l'AMPc (Doskeland 1978; Rannels et al. 1980; Ringheim et al. 1990). Sans activation par l'AMPc, PKA se présente sous la forme R₂C₂ et seul le site B est accessible à l'AMPc. Après liaison de l'AMPc au site B, la sous-unité R subit une transconformation qui expose le site A et permet la liaison d'un deuxième AMPc. C'est après la liaison

coopérative de ces deux AMPc sur chaque site régulateur que le complexe $R_2-(AMPc)_4$ se forme et que le complexe R_2C_2 se dissocie permettant aux sous-unités C_2 d'exercer leur action (Builder et al. 1980; Rannels et al. 1985; Haslam et al. 1999). L'activation de PKA peut s'écrire sous la forme de l'équation suivante : $R_2C_2 + 4AMPc \leftrightarrow R_2-(AMPc)_4 + C_2$.

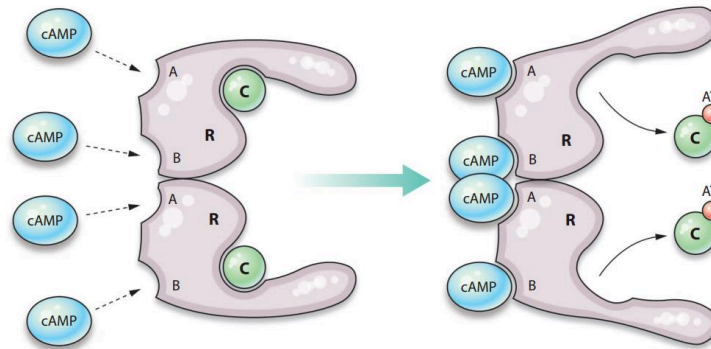


Figure 20. Modèle d'activation de PKA par l'AMPc (Murray 2008). Chaque site B de la sous-unité R fixe un AMPc ce qui induit un changement de conformation permettant la liaison d'un AMPc sur le site A. C'est suite à la liaison de deux AMPc par sous-unité R que les sous-unités catalytiques C sont libérées.

Lors de l'activation plaquettaire, PKA peut également être activée suite à la dissociation du complexe PKC-NFκB-IκBα-PKAc et la libération de PKAc (*sous-unité catalytique de PKA*), qui agit alors comme un rétrocontrôle négatif (Gambaryan et al. 2010). Certains travaux de la littérature suggèrent que la voie AMPc/PKA peut également, *in vitro*, phosphoryler certaines sous-unités alpha des protéines G, pouvant ainsi réguler le récepteur TP (Manganello et al. 1999).

Outre les mécanismes décrit ci-dessus, l'AMPc est également capable de renforcer d'autres mécanismes inhibiteurs comme celui de la protéine « *regulator of G-protein signaling 18* » (*RGS18*). Au repos, le complexe RGS/SPL/SHP-1 (*protéine RGS, spinophiline et « Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 »*) est formé, peu de RGS18 est libre. C'est au cours de l'activation plaquettaire que le complexe se dissocie, permettant à la forme libre de RGS18 d'exercer son action négative sur les protéines G par hydrolyse du GTP associée à la sous-unité alpha, jouant alors un rôle de régulateur négatif de l'activation plaquettaire. Il est aussi rapporté que lors de la stimulation de la voie de l'AMPc, par la PGE-1 ou la FSK, l'augmentation de l'AMPc provoque la dissociation de complexe RGS/SPL/SHP-1, libérant la forme libre de RGS18 et maintenant les protéine G inactives (Ma et al. 2015).

Tout comme le GMPc, l'AMPc participe à la régulation des flux calciques en permettant d'une part la recapture du calcium libéré lors de l'activation plaquettaire par les compartiments de réserves (Haslam et al. 1999; Mazzucato et al. 2002) et d'autre part par l'inhibition de l'influx calcique médié par le canal « *transient receptor potential cation channel* », TRPC6 (Haddock et al. 2002). L'AMPc inhibe le changement de forme induit par de faible dose de thrombine par une baisse de la forme active P-MLC

(Aburima et al. 2013) mais n'inhiberait pas le changement de forme induit par le collagène (Riondino et al. 2005).

La voie de l'AMPC peut également induire la phosphorylation de VASP et réguler son action sur le cytosquelette. Cependant, contrairement à la phosphorylation réalisée par PKG, PKA phosphoryle VASP préférentiellement sur la sérine 157 (Butt et al. 1994). PKA et PKG partagent un grand nombre de cibles dont les protéines Rap1B (Stefanini et al. 2019) et P38 MAPK (Jackson et al. 2010).

7.2.4 Régulation du taux d'AMPC

Dans une étude originale publiée par le groupe de Eigenthaler et al., les auteurs étudient la concentration des nucléotides cycliques par rapport aux capacités d'activation des protéines kinases qui leur sont associées. L'AMPC est présent à un taux de 23,1 pmol/10⁹ plaquettes (4,4 μM) et la PKA est présente à raison de 3,1 μM et possède une capacité de fixation de 6,2 μM d'AMPC. Comme le suggère l'auteur, le taux d'AMPC basal serait capable d'activer la totalité de PKA, cependant, il existe des mécanismes de régulation du taux d'AMPC que sont les PDEs et les microdomaines à AMPC afin de limiter son action (Eigenthaler et al. 1992).

7.2.4.1 Action des PDEs

Les PDEs ont été identifiées dans les plaquettes pour la première fois par Hidaka et Asano en 1976. On retrouve au sein des plaquettes les PDEs des familles 2A, 3A et 5, chacune ayant une affinité qui lui est propre vis-à-vis de l'AMPC et du GMPc (Hidaka et al. 1976; Grant et al. 1984; Haslam et al. 1999). Une particularité spécifique de la voie NO/GMPc/PKG est l'inhibition des PDEs, action non présente dans la voie de l'AMPC.

Les PDEs de la famille 2 sont responsables de l'hydrolyse de l'AMPC, leur activité est potentialisée par le GMPc (Martins et al. 1982). Les PDE2A plaquettaires sont des enzymes membranaires activées par le GMPc et réalisent l'hydrolyse de l'AMPC, limitant son effet inhibiteur (Grant et al. 1990).

Les PDEs de la famille 3, inhibées par le GMPc, sont présentes sous forme soluble dans les plaquettes (Grant et al. 1984). Bien que la PDE3A puisse dégrader l'AMPC et le GMPc, elle possède cependant une affinité quatre à dix fois supérieure pour l'AMPC (Grant et al. 1984; Degerman et al. 1997), ce qui explique que son inhibition par le GMPc influe majoritairement sur le taux d'AMPC.

La PDE5, enzyme cytosolique, est spécifique du GMPc et permet de contrôler la production de ce dernier (Francis et al. 1980; Wallis et al. 1999). Initialement identifiée dans les plaquettes (Coquil et al. 1980), la PDE5 est activée par le GMPc lors de sa production ce qui permet d'en contrôler les effets.

Le site actif des PDEs comprend un site de liaison à deux cations divalents et un site de liaison du substrat. Des études de structure des PDEs semblent indiquer que l'ion zinc (*Zn*) permet, outre la catalyse de la réaction enzymatique, le repliement de la protéine et la formation du site actif de l'enzyme (Xu et al. 2000). Le positionnement de l'AMPc au sein du site du substrat permet une ionisation du pont phosphodiester pour que le groupement hydroxyle d'une molécule d'eau impliquée dans la liaison du Zn à l'enzyme, puisse en réaliser l'hydrolyse (Huai et al. 2003). Selon les travaux de Zhang et al. 2004, la présence d'une glutamine au sein des PDEs serait responsable de la liaison des nucléotides, de la stabilité de cette liaison mais également responsable de la sélectivité aux nucléotides. Quand la glutamine est libre de tourner dans le plan, la PDE lie l'AMPc et le GMPc, mais quand la glutamine est contrainte dans son environnement, la PDE devient spécifique d'un des deux nucléotides (Zhang et al. 2004). Les PDEs effectuent l'hydrolyse du pont ester en 3' des nucléotides 5'-monophosphates et les convertissent en nucléotides 5'-monophosphates.

L'action de l'AMPc peut donc être régulée ou terminée par l'action des PDE2A et 3A qui dégradent l'AMPc en 5'AMP puis en adénosine. L'inhibition de la PDE3A par le GMPc permet d'augmenter le taux de l'AMPc pour prévenir l'activation plaquettaire mais un rétrocontrôle négatif existe pour ne pas désensibiliser les plaquettes avec un excès d'AMPc. Il fait intervenir la PDE2A, activée par le GMPc et permet de dégrader l'AMPc (Haslam et al. 1999). Lors de l'activation plaquettaire à la thrombine il y a une augmentation de l'activité de la PDE3A qui dégrade alors l'AMPc. L'activation de la PDE3A constitue alors un mécanisme d'inhibition de l'AMPc pour permettre l'activation plaquettaire (Zhang et al. 2007; Hunter et al. 2009).

7.2.4.2 Compartimentation de la voie de l'AMPC

Bien que le taux des nucléotides cycliques puisse être contrôlé par l'action des PDEs, ce mécanisme de régulation enzymatique ne peut à lui seul expliquer les observations de nombreux groupes faites dans divers types cellulaires dont celles du groupe de Jurevicius et Fischmeister. Au sein de cellules ventriculaires de grenouille et à l'aide d'étude de double « *patch-clamp* », les auteurs rapportent une augmentation localisée d'AMPC dans l'espace grâce à la présence des PDEs (Jurevicius et al. 1996). Cet espace métabolique restreint, où l'AMPC augmente, suggère une régulation par un mécanisme de compartimentation intracellulaire nommé microdomaines à AMPC. Cette compartimentation est étudiée dans divers types cellulaires et la voie de l'AMPC est retrouvée organisée en domaines membranaires situés soit aux membranes plasmiques soit au niveau des membranes internes.

Les premiers modèles de régulation de la voie de l'AMPC voient le jour sous forme de microdomaines élaborés autour de protéines d'ancrages que sont les « *A-Kinase Anchor Protein* » (AKAPs). Ces protéines d'ancrages représenteraient une plateforme de localisation subcellulaire regroupant divers effecteurs, dont PKC, PKA et l'AC, qui sont indépendants dans leur signalisation mais peuvent interagir entre eux. Au sein des cellules cardiaques, la voie de l'AMPC est structurée autour de l'AKAP musculaire (*mAKAP*) qui regroupe PKA et la PDE4D3. A l'état basal, la PDE4D3 protège PKA de l'activation basale de l'AMPC (Figure 21.A) et ce n'est que lors d'une augmentation importante du taux de l'AMPC que PKA est stimulée (Figure 21.B). PKA stimulée agit sur ses cibles mais active également la régulation négative de son activité, régulation représentée par les PDE4D3 (Figure 21.C) (Dodge et al. 2001).

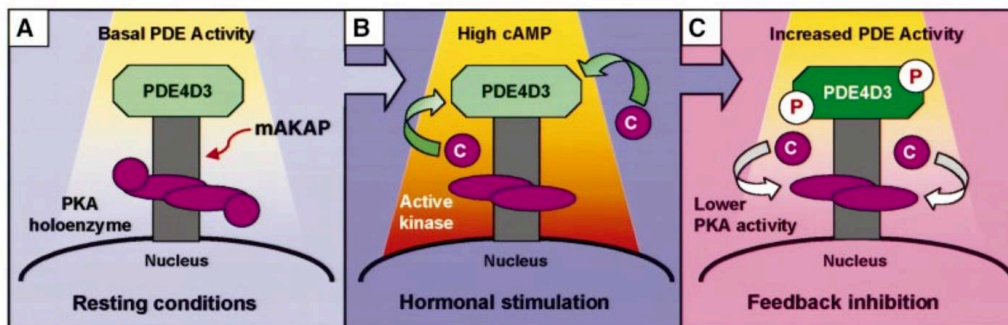


Figure 21. Modèle du complexe AKAP-PKA-PDE4D3 cardiaque (Dodge et al. 2001). A) au repos, les PDE4D3 empêchent l'activation de PKA, B) lors de l'augmentation du taux de l'AMPC, PKA est activée, C) PKA active ses effecteurs mais également PDE4D3 qui joue un rôle négatif sur l'activité de PKA. PKA : protéine kinase A ; PDE4D3 : phosphodiesterase 4D3 ; mAKAP : A-kinase anchor protein 6 ; C : catalytic PKA subunit.

Les modèles suivants concernent des microdomaines situés à la membrane cellulaire et intègrent les récepteurs membranaires ainsi que la production de l'AMPC. Ainsi, dans les cellules cardiaques, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques active l'AC par l'intermédiaire d'une protéine Gs, ce qui aboutit à l'augmentation de l'AMPC qui agit au sein d'un même microdomaine (Dessauer 2009).

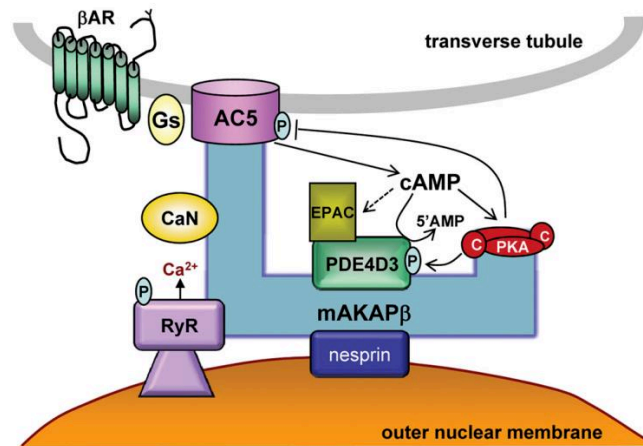


Figure 22. Modèle de régulation d'un microdomaine AMPc (Dessauer 2009). Les récepteurs β AR stimulent l'AC par l'intermédiaire d'une protéine Gs, l'AMPc augmente et active PKA qui permet d'induire une libération de calcium après stimulation du récepteur RyR. Cet effet est terminé en partie par PKA qui inhibe l'AC et active les PDEs. Le regroupement de tous les acteurs de l'AMPc se fait par l'AKAPm à proximité du noyau. β AR : beta adrenergic receptor ; AC5 : adenylyl cyclase 5 ; CaN : calcineurin ; PKA : protein kinase A ; PDE4D3 : phosphodiesterase 4D3 ; mAKAP : A-kinase anchor protein 6 ; C : catalytic PKA subunit ; RyR : ryanodine receptor ; EPAC : exchange factor directly activated by cAMP.

Dans une revue de la littérature de 2014, le groupe de Conti et al. propose trois modèles de compartimentation de la voie de l'AMPc. Le premier modèle est celui proposé par les publications précédentes, à savoir que ce sont les PDEs qui jouent le rôle de barrière métabolique et forment le microdomaine où l'AMPc est produit suite à l'activation de l'AC par un récepteur tiers, l'AMPc agit ensuite sur ses effecteurs au sein même du microdomaine (Figure 23.A). Le deuxième modèle accorde aux PDEs le rôle inverse, elles permettent la formation d'un domaine dépourvu d'AMPc à l'état de repos où les effecteurs ne seraient activés qu'en cas de forte augmentation de l'AMPc (Figure 23.B). Le dernier modèle reprend les travaux de Doge 2001 et Dessauer 2009 où les PDEs sont localisées au niveau de compartiments cellulaires et permettent de limiter l'activation de certaines réponses à l'état basal d'AMPc et ne seraient également activées qu'en cas de forte augmentation de l'AMPc (Figure 23.C).

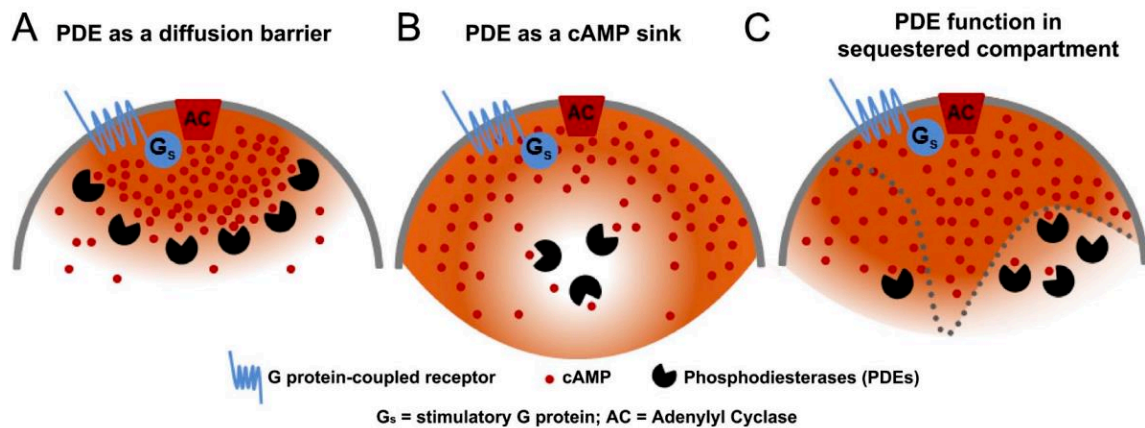


Figure 23. Modèle de compartimentation de la voie de l'AMPc (Conti, Mika, et Richter 2014). A) les PDEs jouent le rôle de barrière et empêchent l'AMPc de diffuser, B) les PDEs délimitent une zone où l'AMPc ne peut entrer et C) les PDEs régulent l'entrée de l'AMPc dans certains compartiments.

L'existence d'une compartimentation de la voie de l'AMPc ainsi que la capacité des AKAPs à créer une répartition subcellulaire de PKA dans divers types cellulaires suggèrent qu'une organisation similaire puisse exister au sein des plaquettes.

La conceptualisation de microdomaines plaquettaire est renforcée par l'existence de différents pools d'AMPc au sein des plaquettes humaines (Bilodeau et al. 2007). En effet, une faible fraction de l'isoforme PKA-RI est retrouvée dans les radeaux lipidiques membranaires plaquettaire ou associée à l'AKAP moésine, potentiellement responsable de cette localisation. L'utilisation d'un peptide qui inhibe la liaison PKA/moésine, induit une perte de localisation de PKA-RI dans les radeaux lipidiques et une perte de la régulation du récepteur GPIb (Raslan et al. 2014; Raslan et al. 2015).

La régulation des nucléotides cycliques, GMPc et AMPc, peut donc se faire par la modulation de leur production par les cyclases, par régulation de leur dégradation par les PDEs et modification de leur disponibilité par séquestration au niveau de microdomaines. Depuis quelques années, un nouveau moyen de régulation des nucléotides cycliques apparaît avec les protéines d'efflux dont la protéine «*multidrug resistance-associated protein 4* » (MRP4).

8 Protéine d'efflux «multidrug resistance-associated protein 4 »

La protéine d'efflux «*multidrug resistance-associated protein 4* » (MRP4) possède plusieurs appellations selon le champs d'étude, on la nomme également ABCC4 pour «*ATP-binding cassette sub-family C member 4* » et «*Traffic ATPases* ». Bien que la nomenclature ABCC4 soit la plus rigoureuse du point de vue de la classification des protéines et du génome, nous utiliserons la dénomination « MRP4 » qui est la plus fréquemment employée dans la littérature.

8.1 Famille des MRPs

Les « *ATP binding cassette* » protéines (ABC) comportent les familles A à G et c'est dans la famille C de ces protéines, ABCC, que sont retrouvées les protéines de résistance nommées MRPs. Les MRPs sont classées en deux familles selon leur structure, la première famille comporte les MRPs dites longues, MRP1, -2, -3, -6 et -7, qui possèdent un domaine transmembranaire supplémentaire ; la deuxième famille comporte les MRPs dites courtes, MRP4, -5, -8, qui ne comportent que deux domaines transmembranaires.

8.2 Structure de MRP4

MRP4 est une protéine transmembranaire se composant du N-terminal vers C-terminal d'un premier domaine « *polytropic membrane spanning domain* » (MSD1), d'un walker A1, du motif C1, du walker B1, du MSD2, d'un walker A2, du motif C2 (*variable selon la MRP*) et du walker B2 (Hung et al. 1998). Le walker A, le motif C et le walker B forment le site de liaison des nucléotides (NBDs) qui est en autre responsable de la liaison de l'ATP et de son hydrolyse pour le fonctionnement de la protéine (Jones et George 1999).

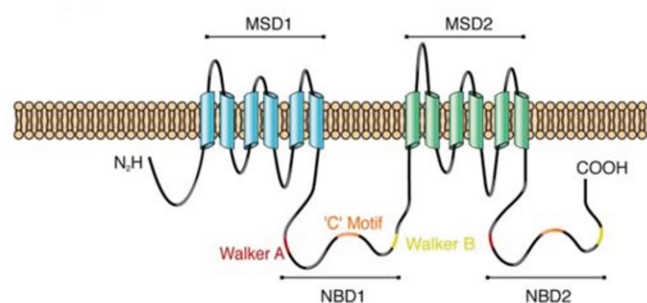


Figure 24. Représentation de la structure de MRP4 (Deeley, Westlake, et Cole 2006). N2H : extrémité N-terminale, MSD1 : polytropic membrane spanning domain 1, NBD1 : nucleotide binding domain 1, MSD2 : polytropic membrane spanning domain 2, NBD2 : nucleotide binding domain 2, COOH: extrémité C-terminale.

Les deux NBDs sont des sites possédant chacun son activité et la mutation de l'un des deux sites n'abolit l'activité des MRPs que de moitié, ce qui tend à montrer que les deux sites ne sont pas totalement dépendants dans leur activité (Nikaido et al. 1999). Le walker A est le site de liaison de l'ATP via un ion magnésium tandis que le walker B semble nécessaire à la bonne conformation de la

protéine (Cui et al. 2001). Il est suivi par une glutamine qui est essentielle pour l'hydrolyse de la liaison phosphodiester β - γ de l'ATP, hydrolyse nécessaire pour assurer le transport actif des MRPs. Le motif C est quant à lui impliqué dans la liaison à l'ATP mais également dans la transduction de l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP dans la partie transmembranaire de la protéine pour y induire un changement de forme. Les MSDs sont responsables de la formation du canal de transport mais également de la sélectivité du substrat.

L'activité de MRP4 débute lors de la reconnaissance du substrat par les MSDs, ce qui permet au dimère formé par les NBDs de lier deux ATP. Cette liaison conduit à un changement de conformation des MSDs qui correspond à l'ouverture du canal et au passage du substrat. Il s'ensuit une dégradation de l'ATP en ADP + Pi qui s'accompagne d'une refermeture du canal. La protéine doit encore revenir à son état initial pour pouvoir de nouveau être activée, étape réalisée par le départ de l'ADP du NBDs (Linton et al. 2007).

8.3 Fonctions générales

Les MRPs sont des pompes d'efflux initialement identifiées comme pouvant effluer des xénobiotiques hors de la cellule. Certaines MRPs bien connues en clinique, la P-glycoprotéine et la BRCP (*breast cancer-resistance protein*) sont responsables de l'efflux d'agents thérapeutiques conduisant à des résistances au traitement. Les composés efflués ont un large spectre tant en termes de structure que de taille. L'étude de la répartition des agents thérapeutiques, ou de leurs métabolites, dans des souris déficientes en MRP4 a conduit à établir une liste potentielle des cibles de MRP4 ; on y retrouve les composés relatifs à la thiopurine et les composés antiviraux nucléotidiques (Schuetz et al. 1999). L'absence de MRP4 induit une accumulation de plus de 50 % d'un anticancéreux de la famille des inhibiteurs des topoisomérases, le topotecan, dans le liquide cébrospinal et sa diminution de 36 % dans les urines (Leggas et al. 2004).

MRP4 est également un transporteur d'efflux pour des composés endogènes et participe de ce fait à la signalisation cellulaire par efflux d'agonistes ou d'inhibiteurs. MRP4 est capable d'effluer l'AMPc et le GMPc hors des cellules (Chen et al. 2001). Cependant, cette activité de pompe d'efflux n'est maximale qu'en présence d'un excès d'AMPc (*surproduction ou inhibition des PDEs*) (Wielinga et al. 2003). Dans les cellules musculaires, l'inhibition de l'expression de MRP4 (*par ARN interférent ou dans des cellules invalidées*) est corrélée à une augmentation de 289 % de l'AMPc, une augmentation de 230 % du GMPc intracellulaire et à l'augmentation des PDEs 3A et 4A (Sassi et al. 2008, 2012).

Cependant MRP4 possède, selon le type cellulaire, une localisation cellulaire qui varie ce qui implique que la direction de l'efflux importe autant que l'efflux lui-même (Russel et al. 2008). Dans les cellules du tube contourné proximal ainsi que dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, MRP4

est localisé au pôle apical ce qui lui permet de rejeter les xénobiotiques respectivement dans les urines et dans le sang (Aubel et al. 2002; Borst et al. 2004; Smeets et al. 2004).

8.4 Fonctions plaquettaires

Les premières études de MRP4 au sein des plaquettes sont en faveur d'une présence à la surface des granules denses (Jedlitschky et al. 2004), impliquant MRP4 dans le stockage de l'ADP au sein des granules. Selon certains travaux, MRP4 effluerait l'ADP du cytoplasme vers les granules denses au repos et c'est lors de l'activation plaquettaire et de la sécrétion des granules, où la membrane des granules fusionne avec celle de la plaquette, que l'efflux de MRP4 serait redirigé vers le milieu extracellulaire.

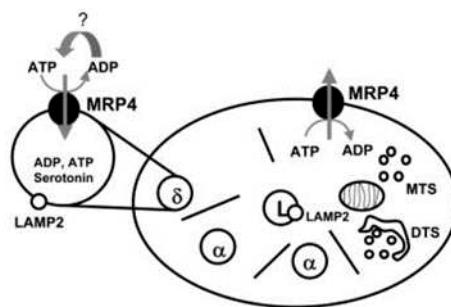


Figure 25. Modèle de répartition plaquettaire de MRP4 (Jedlitschky et al. 2004). δ : granules denses; MTS: système microtubulaire ; DTS : système tubulaire dense ; α : granules alpha ; LAMP2 : lysosome-associated membrane glycoprotein 2.

MRP4 est également associé, au sein des plaquettes, au transport de l'AMPc vers les granules denses (Borgognone et al. 2012). L'inhibition de MRP4 au cours de l'activation plaquettaire provoque une inhibition de l'agrégation induite par le collagène, de la mobilisation du calcium et de la libération d'ATP de manière dose dépendante mais reste sans effet sur l'activation plaquettaire par 0.05 UI de thrombine ou 1 μ M de U46619 (*analogue du TXA2*) (Lien et al. 2014).

Dans un modèle de souris invalidées pour MRP4, l'étude morphologique par microscopie électronique des plaquettes, de la ploïdie des mégacaryocytes et l'étude de l'expression des glycoprotéines de surfaces (GPIX, GPVI, GPIB) ne révèlent pas de différences entre les plaquettes MRP4^{-/-} et les témoins (Decouture et al. 2015; Cheepala et al. 2015). La délétion de MRP4 est associée à un phénotype hémorragique avec une augmentation du temps de saignement et du temps d'occlusion associés à une perte de sang plus importante que chez les souris témoins. Ces manifestations cliniques sont associées à une baisse de l'agrégation, une baisse de l'activation de l'intégrine α IIb β 3, une baisse de l'exposition de la P-sélectine à la surface des plaquettes et à une baisse de la sécrétion de sérotonine (Decouture et al. 2015). Dans certaines pathologies, une baisse de l'expression de MRP4 à la surface des granules est associée à des troubles du stockage de l'ATP et de l'ADP, comme dans certains cas de syndrome

d'Hermansky-Pudlak (*HPS*)(Jedlitschky et al. 2004, 2010). En revanche, l'hyperactivité plaquettaire retrouvée chez les patients atteints du VIH est corrélée à une augmentation des protéines de transport, dont MRP4, d'un facteur 3,5. Cette surexpression induit une augmentation de l'AMPc sécrété par les plaquettes et une baisse de l'AMPc intra plaquettaire en accord avec une diminution de l'activité de PKA sur VASP (Marcantoni et al. 2018).

Il semble, que MRP4 soit également impliqué dans la résistance plaquettaire au traitement par l'aspirine. Par sa capacité d'efflux, MRP4 diminuerait l'aspirine disponible au sein des plaquettes, diminuant ainsi son action (*voir chapitre 2*).

Chapitre 2 : Effets antiplaquettaires de l'aspirine

Découverte depuis plus de 3500 ans par les grecs, la salicine, précurseur de l'aspirine (ASA), est extraite de l'écorce du saule blanc, *Salix alba*, et est utilisée en tant que remède contre la douleur. L'aspirine, ou acide acétyl-salicylique, est produite la première fois par le français Charles Gerhardt en 1852 et sera commercialisée dès 1890 par l'industriel Allemand Bayer (Desborough et Keeling 2017). L'ASA est par la suite utilisée en cardiologie dans la prévention d'évènements cardiovasculaires occlusifs pour des patients présentant des risques thrombotiques. Elle permet de réduire de 15 % la mortalité vasculaire et de 30 % les évènements de type accidents vasculaires cérébraux ou cardiaques (APT Collaboration 1988).

Dans une étude clinique chez 796 patients, le groupe d'étude RISC apporte la preuve de l'efficacité de faible dose d'ASA dans la prévention d'évènements cardiovasculaires occlusifs. L'administration de 75 mg par jour durant 5 jours de traitement permet de réduire l'incidence des infarctus du myocarde et présente des effets indésirables limités en cas de bonne observance thérapeutique. L'ASA permet de limiter l'utilisation d'agents antihypertenseurs (*béta bloquant, inhibiteur calcique*) de façon significative et permet d'obtenir un retour au risque basal pour le groupe ASA 75 mg après trois mois de traitement (The RISC Group 1990).

1 Pharmacocinétique de l'aspirine

De son administration à son action, l'aspirine va franchir plusieurs étapes liées à la physiologie de l'organisme qui définissent son profil de pharmacocinétique. Ces étapes conditionnent la quantité d'aspirine disponible pour agir, son délai d'apparition, la durée et l'intensité de son effet thérapeutique ainsi qu'une transformation possible avant élimination. La mise à disposition de l'aspirine pour l'organisme, nommée biodisponibilité, implique donc les étapes d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination.

1.1 Etape d'absorption

Le lieu et la libération du principe actif (PA) sont conditionnés par la forme galénique de l'aspirine dont seules les formes utilisables en cardiovasculaire comme antiplaquettaire seront décrites par la suite. Dans le cas de formes injectables (*Kardegic® 500mg/5mL*) l'aspirine est directement libérée dans le compartiment central (*le sang*) et ne subit pas l'étape d'absorption ; dans le cas de formes orales

(*Aspirine UPSA®*, *Kardegic®*, *Aspegic®...*), l'aspirine doit subir l'étape d'absorption au travers des membranes biologiques du système digestif.

Cette absorption est en partie déterminée par les propriétés physicochimiques du PA mais également de la formulation. L'aspirine est un acide organique faible avec un pKa de 3,5 stable entre pH 2 et 3 et est dégradée aux pH inférieurs à 2 et supérieurs à 8. Le plus souvent conditionnée sous forme de poudre, la reconstitution de l'aspirine aboutit à une solution tamponnée d'aspirine qui est stable (*non hydrolysée*) et qui ne présente que 10 % de dégradation de l'ASA au bout de 24 heures (Gharbo et al. 1986). La dissolution de l'aspirine dans l'eau est quasi instantanée (622 ns) (Anand et al. 2018).

Les études de pharmacocinétique menées au cours des dernières années tendent à décrire l'ASA comme une drogue rapidement absorbée (*pic maximal entre 30 minutes et 1 heure*) (Rowland et al. 1972; Salem et al. 1977; Castleden et al. 1977; Cerletti et al. 2003) et possédant une pharmacologie qui semble très dépendante de la dose administrée et semblerait être sans variation d'effet thérapeutique d'un sexe à l'autre.

1.2 Etape de distribution

La fraction de dose administrée qui atteint le compartiment central reflète la biodisponibilité du PA. Elle est en grande partie dépendante de la phase d'absorption et est définie comme totale (100 %) pour la voie intraveineuse (*I.V.*) et est d'environ 45 à 50 % pour l'ASA administrée par voie orale (Pedersen et al. 1984). L'ASA possède, à pH sanguin (7,35 - 7,45), un volume de distribution de 0,13 à 0,19 L/Kg (Graham et al. 1977) et circule soit sous forme libre soit sous forme liée aux protéines sériques. Il se crée alors un équilibre entre la forme liée et libre où seule la forme libre est susceptible de se fixer à ses cibles et d'avoir un effet thérapeutique.

1.3 Etape de métabolisation

L'étape de métabolisation permet à certains médicaments de devenir actifs mais permet surtout de biotransformer le PA en vue de son élimination. Bien qu'ayant une demi-vie courte, environ 15 à 20 minutes, l'effet de l'ASA est retrouvé durant 8 à 10 jours (*durée de vie moyenne des plaquettes*) car sa liaison à la COX1 est irréversible. Elle inhibe les plaquettes dans la circulation pré-systémique (Pedersen et al. 1984). L'ASA est ensuite hydrolysée en acide salicylique (AS) qui circule sous la forme d'un acide faible fortement lié aux protéines plasmatiques (Borgå et al. 1976). L'AS, majoritairement éliminé par voie hépatique, est inactivé en dérivés conjugués avec l'acide glucuronique, en dérivés conjugués à la glycine (*acide salicylurique*) ou oxydé (Wilson et al. 1978; Bochner et al. 1981).

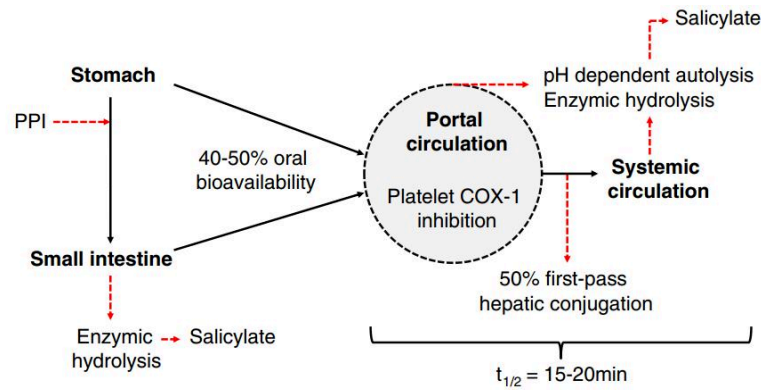


Figure 26. Représentation schématique du métabolisme de l'aspirine, selon (Floyd et Ferro 2014). L'aspirine est absorbée à 40-50 % par voie orale, le reste étant hydrolysé dans les intestins. La majeure partie de l'effet de l'aspirine à lieu une fois la circulation portale atteinte où elle inhibe la COX des plaquettes. L'aspirine est ensuite dégradée et éliminée sous forme de salicylate. PPI : proton pump inhibitor.

1.4 Etape d'élimination

La fraction de PA éliminée du compartiment central par unité de temps reflète la notion de clairance plasmatique. L'ASA est éliminée du compartiment central suivant une équation bi-exponentielle. L'AS est quant à lui éliminé par voie rénale sous forme inchangée (5 %), sous forme conjuguée au glucuronide (90 %) ou oxydée en acide gentisique (2 %) (Wilson et al. 1978; Bochner et al. 1981; Roberts et al. 1983).

2 Pharmacodynamie de l'aspirine

L'aspirine est un principe actif qui possède plusieurs actions pharmacologiques doses dépendantes ce qui lui confère une certaine polyvalence thérapeutique. En effet, selon la dose administrée, elle est utilisée pour ses propriétés antipyrétiques, anti-inflammatoires, antiplaquettaires et est utilisée dans la lutte contre l'athérosclérose. Seule son action antiplaquettaire sera développée par la suite.

2.1 Inhibition des protéines sanguines

Bien que l'effet antiplaquettaire de l'ASA soit porté par les COXs, l'ASA est capable d'acétyler toute une série additionnelle de protéines et de composés sanguins. On retrouve notamment l'acétylation de l'albumine (Hawkins et al. 1969), des immunoglobulines, de la transferrine, de la thyroglobuline (Pinckard et al. 1968) et de l'hémoglobine des patients souffrant d'anémies falciformes (Furia et al. 1973).

2.2 Inhibition des COXs

L'aspirine, inhibiteur des COXs (Roth et al. 1975), possède une meilleure affinité pour la COX-1 comme le démontre des travaux de simulation dynamique assistée par ordinateur. L'environnement de la poche de liaison à l'aspirine comprend les acides aminés suivants : les tyrosines 348 et 385 (*Tyr348 et*

Tyr 385), l'arginine 120 (*Arg120*), la sérine 530 (*Ser530*) et l'histidine 513 (*His513*) au sein de la COX-1. L'inhibition de la COX se déroule en deux étapes avec 1) la formation d'un intermédiaire métastable tétraédrique où l'hydroxyle de la Ser350 attaque la fonction acétyle de l'aspirine et 2) la réaction d'acétylation de la Ser350 conduisant à un transfert de l'acétyl de l'ASA sur la Ser350 de la COX. La fonction carboxylique de l'aspirine participe également à cette réaction en tant qu'accepteur de proton, les Tyr 348 et 385 de la COX-1 participent à la stabilité de la liaison de l'intermédiaire formé tandis que l'Arg120 stabilise l'aspirine par liaison saline avec la fonction carboxyle. Bien que les deux COXs présentent 60 % d'homologie (Kurumbail et al. 1996), elles possèdent une résidu spécifique dans leur site de liaison avec l'His513 pour la COX-1 qui est remplacée par une Arg513 dans la COX-2.

C'est l'absence de l'Arg513 qui est responsable de la sélectivité de l'ASA pour la COX-1. En effet, la présence de l'Arg513 diminue la fixation de l'ASA et augmente l'énergie nécessaire pour la réaction d'acétylation (Lei et al. 2015). Cette sélectivité se traduit par une concentration inhibitrice de 50 % (*IC50*) de l'ASA égale à 3,57 μM pour la COX-1 et d'environ 29,3 μM pour la COX-2 (Blanco et al. 1999).

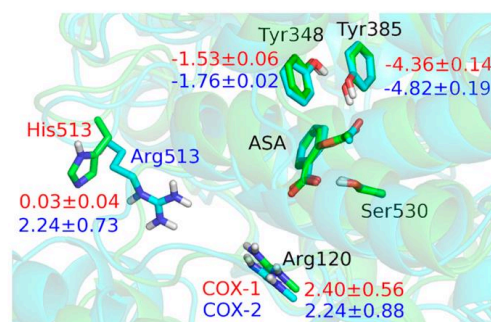


Figure 27. Superposition des sites de liaison des COX-1 et -2 (Lei et al. 2015). Sont représentés en rouge les résidus de la COX-1 et en bleu ceux de la COX-2. Les valeurs numériques correspondent à la contribution des résidus à la réaction, les valeurs négatives sont en faveur de la réaction et plus la valeur est positive, plus le résidu s'oppose à la réaction.

L'acétylation d'un monomère de la COX induit une modification de sa conformation, lui donnant alors le rôle du monomère régulateur allostérique, bloquant ainsi la fonction catalytique du second monomère. L'inhibition des COXs serait maximale lorsque le deuxième monomère est partiellement acétylé (Li et al. 2014; Patrignani et al. 2014). Bien que l'action de peroxydase de la COX soit moins affectée (DeWitt et al. 1990), l'acétylation empêche la liaison de l'AA à la COX et limite ainsi son métabolisme.

L'aspirine inhibe donc de façon irréversible la COX plaquettaire qui ne peut être resynthétisée par les plaquettes. La durée d'action de l'ASA est donc égale à la durée de vie des plaquettes soit une dizaine de jours chez l'Homme. A dose antiplaquettaire son action n'est pas limitée aux plaquettes et inhibe provisoirement les COXs des tissus dont celles de l'endothélium.

2.3 Effet de l'aspirine sur l'endothélium

Les cellules endothéliales utilisent la voie des COXs afin de produire des prostaglandines à partir de l'AA avec notamment la PGI-2 qui est une prostaglandine inhibitrice plaquettaire. Pour des doses d'ASA jusqu'à 162 mg, l'ASA induit une baisse de la production du TXA2 endothélial ce qui se traduit par une relaxation vasculaire mais possède un effet inverse pour des doses supérieures à 660 mg (Furuno et al. 2011) où l'ASA supprime la production de PGI-2 endothéliale conduisant à une baisse de la dilatation des cellules musculaires des vaisseaux. La récupération de l'activité des COXs, suite à un traitement par ASA faible dose, est d'environ 80 % du taux basal à 24 heures et un retour à la quasi normale 35 heures post exposition, retour à la normale qui s'effectue par la synthèse de nouvelles COXs et al. 1979).

2.4 Effet plaquettaire de l'aspirine

Dès les années 1970, des travaux corrélaient la prise de l'ASA à une modification de la morphologie plaquettaire. L'ASA conduit à une microcytose plaquettaire chez des volontaires sains sous ASA 2 mg par voie orale, l'ultrastructure des plaquettes restant identique à celle des plaquettes issues de témoins sans aspirine (Fajardo 1975).

L'efficacité de l'ASA sur la COX-1 plaquettaire est considérée maximale pour un taux d'inhibition de 97 % de la COX-1 (Pampus et al. 1993). La relation entre l'inhibition des COXs et la baisse de la synthèse de TXA2 n'est pas linéaire et une inhibition de 97 % des COXs est nécessaire pour observer une baisse de 96 % du TXA2 (Reilly et FitzGerald 1987). Après l'arrêt de prise de l'ASA 100 mg, administrée 1 à 8 semaines, la récupération de la production de TXA2 est similaire et redevient basale après 7 jours (Santilli et al. 2009).

L'inhibition de 97 % de la COX-1 et une suppression complète de la synthèse des thromboxanes plaquettaires peuvent s'obtenir après administration orale de faible dose d'ASA, 30-50 mg par jour, durant 7 à 10 jours de traitement (Wood et al. 1994; FitzGerald et al. 1983). L'ASA bloque ainsi la formation de TXA2 plaquettaire et diminue l'activation plaquettaire dont celle induite par le collagène. En présence de fortes doses d'ASA, l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ suite à l'activation plaquettaire diminue de 40 %, l'expression de la P-sélectine diminue de 25 %, l'expression du CD63 (*marqueur des granules denses*) diminue de 35 % et celle du CD107a (*marqueur des lysosomes*) diminue de 47 % alors que la diminution de ces GP en présence de faibles doses d'ASA n'est pas significative (McKenzie et al. 2003).

Une étude du groupe de Massimi et al. 2019 montre que l'ASA peut moduler l'expression de récepteurs de surface. Les gènes codants les récepteurs P2Y1 sont stimulés par l'ASA qui induit, après 8 semaines

de culture de lignées mégacaryocytaires et 2 mois de traitement de patients, une augmentation de l'expression des récepteurs P2Y1 (Massimi et al. 2019).

2.5 Effets mégacaryocytaires de l'aspirine

Si la morphologie des plaquettes traitées par ASA est sujet à étude, de même, l'impact de l'ASA sur la morphologie des mégacaryocytes (MK) est aussi recherché. Soutenues par de nouveaux moyens en microscopie électronique, les études mettent en évidence une différence morphologique des MK de rats traités *in vitro* par l'ASA. Cette différence implique un changement de forme et une variation de l'adhésion sous-tendus par des courants ioniques calciques augmentés, un courant potassique sortant transitoire à cause de la désensibilisation des récepteurs purinergiques et l'apparition d'invagination de la membrane plasmique rendue plus perméable (Young et al. 2010; Kazama et al. 2014).

L'administration de l'ASA aboutit à l'inhibition des COXs mégacaryocytaires de 80-97 % deux heures après administration de 40 à 500 mg d'ASA par voie orale (Pampus et al. 1993). L'inhibition des COXs des MK s'accompagne d'une baisse des TXA2 de 70 % et *in vivo* d'une baisse de la production de PGE-1 mégacaryocytaire d'un facteur 6 dans les 2 heures suivant le gavage (Demers et al. 1980; Worthington et al. 1982; Pampus et al. 1993). La baisse des TXA2 et de la PGE-1 serait concomitante avec une stimulation par l'ASA des précurseurs mégacaryocytaires sans variation du compte plaquettaire entre les groupes ASA et témoin (Dejana et al. 1980; Sullivan et al. 1990). La récupération *in vivo* d'une activité COXs mégacaryocytaire s'effectue par la synthèse de nouvelles COXs et passe à 80 % à 36 heures pour devenir complète à 72 heures après arrêt de l'ASA (Worthington et al. 1982).

Les études *in vitro* de l'ASA révèlent que l'inhibition des COXs mégacaryocytaires rend indétectable les TXA2 produits après stimulation à la thrombine et montrent un regain de production plus lente que *in vivo* avec une récupération de 16 % et 30 % de synthèse 24 et 48 heures après suppression de l'ASA (Huijgens et al. 1986, 1986; Pampus et al. 1993).

3 Résistance thérapeutique à l'aspirine

En clinique, l'utilisation au long terme de l'ASA conduit à une diminution de son effet plaquettaire comme le montrent les travaux de Pulcinelli *et al.* en 2004. Le suivi de patients, traités par ASA sur deux ans, révèle que l'inhibition de l'agrégation de plasma riche en plaquettes induite par le collagène et l'ADP tend à diminuer après un an de traitement (Pulcinelli *et al.* 2004; Patrono *et al.* 2007). La résistance à l'ASA est retrouvée chez 5 à 45 % des patients et est associée à une hausse d'un facteur 10 des événements cardiovasculaires (Grottemeyer *et al.* 1993; Freedman 2006).

3.1 Mesure de l'efficacité de l'aspirine

L'évaluation de la résistance thérapeutique à l'ASA se réalise par l'absence d'effet ou une baisse de son effet au cours du temps sur les tests biologiques. Son efficacité est évaluée par le dosage biologique des thromboxanes, le suivi de l'activation plaquettaire résiduelle par agrégométrie (*étude de la transmission lumineuse ou impédancemétrie*) et de tests « point-of-care ».

3.1.1 Dosage des thromboxanes

Le TXA₂ possède une demi-vie courte et ne peut pas être mesuré directement, cependant, une mesure indirecte permet d'estimer sa concentration à l'aide du dosage de ses métabolites, dont le thromboxane B₂ (TxB₂) sérique ou urinaire. Le TxB₂, d'une demi-vie de 7 minutes (Patrono et Rocca 2019), subit lui aussi un métabolisme qui aboutit à la formation de deux familles de composés, la première avec les dérivés hémiacétal avec le chef de file le 2,3-dinorTxB₂ (*métabolite urinaire le plus abondant*) ; la deuxième série avec des dérivés hémiacétal déshydrogénés avec le chef de file le 11-dihydro-TxB₂ (Roberts *et al.* 1981).

L'interprétation du dosage des TxB₂ doit cependant s'effectuer en rappelant le contexte clinique car l'excrétion du TxB₂ peut varier au cours de la vie. On observe des pics d'excrétion de TxB₂ lors d'états d'activation plaquettaire aigue (Koudstaal *et al.* 1993) ou chronique rencontrés pour une majorité au cours de pathologies cardiovasculaires telles que le diabète de type 2 (Davi *et al.* 1990), l'hypercholestérolémie (Davi *et al.* 1992), l'hypertension (Pietro *et al.* 2002) et des syndromes myéloprolifératifs (Landolfi *et al.* 1992).

3.1.2 Mesure de l'activité plaquettaire résiduelle

Le plasma riche en plaquette (PRP) de patient sous aspirinothérapie efficace présente une agrégation à l'AA abolie et montre, lors de l'agrégation à l'ADP à faible dose (en PRP anticoagulé avec un chélateur de calcium), une disparition de la seconde vague d'agrégation et présente un profil de désagrégation. Les principaux tests automatisés en sang total sont le PFA-100® et le Verify Now®-ASA. Le PFA-100® est un instrument qui permet de mesurer le temps d'occlusion d'une membrane, perforée et

recouverte d'une combinaison collagène-adrénaline, par l'agrégation plaquettaire. Il est peu sensible à la présence d'aspirine. Le Verify Now-ASA® est un instrument qui permet de mesurer l'agglutination de billes recouvertes d'activateurs plaquettaires (Samama et al. 2009). Bien que simple d'utilisation, leur manque de corrélation avec les événements cliniques limite leur utilisation en pratique courante (Harrison et al. 2008; Metz et al. 2009), seule l'agrégation à l'AA reste à ce jour la méthode de référence pour la mesure de l'activité plaquettaire résiduelle sous ASA.

3.2 Mécanismes de résistance

Le terme de « résistance à l'ASA » est employé pour les cas de non réponse thérapeutique souvent en corrélation avec une mauvaise observance du traitement, les interactions médicamenteuses délétères, une réponse plus faible du traitement due à la variabilité interindividuelle et comporte les cas de résistances pharmacologiques.

3.2.1 Variabilité de la réponse

Certains mécanismes physiologiques peuvent être impliqués dans la limitation de l'effet de l'ASA dont : 1) des enzymes de dégradation, des estérases, plus fortement exprimées au site d'absorption et de distribution, 2) un renouvellement accéléré des plaquettes, 3) une production de TXA2 extra-plaquettaire, et 4) la présence de certains micro ARN (Landry et al. 2009). Les miRNAs sont capables de moduler la réponse plaquettaire, notamment le miR-223 qui est élevé lors de non réponse thérapeutique à l'ASA et qui est capable de réguler l'activité des récepteurs P2Y12 à l'ADP (Chyrchel et al. 2015).

On retrouve également la présence de certains polymorphismes de gènes de protéines impliquées dans l'activité plaquettaire dont le polymorphisme PI^{A2} (*Leu59Pro*), qui au sein de la sous-unité $\beta 3$ de la glycoprotéine $\alpha IIb\beta 3$ (PI^{A1}), présent chez 12 % de la population, serait associée à une augmentation de la liaison du fibrinogène à $\alpha IIb\beta 3$ (Newman et al. 1989; Newman 1997). Ce polymorphisme, état $PI^{A1/A2}$ ou $PI^{A2/A2}$, se traduit par une augmentation de la formation de thrombus et est relié en clinique à une baisse de l'efficacité de l'ASA (Feng et al. 1999, 199; Goodall et al. 1999).

A ces mécanismes s'ajoutent les états d'hyper réactivité plaquettaire, diabète, inflammation, élévation de l'homocystéinémie, où les plaquettes sont à la fois plus facilement activables et moins sensibles à l'effet de l'ASA.

3.2.2 Résistances pharmacologiques

La résistance pharmacologique à l'ASA est associée à une hausse d'un facteur 3 des événements cardiovasculaires de types infarctus et accidents vasculaires cérébraux (Gum et al. 2003). Une des causes les plus souvent impliquées sont les polymorphismes de récepteurs et d'enzymes plaquettaires. Des études génétiques, menées chez des patients non répondeurs à l'ASA, ont conduit à l'identification de polymorphismes responsables de résistance pharmacologique. Elle serait principalement corrélée à des polymorphismes de certain récepteur de l'activation plaquettaire (*αIIbβ3*, *P2Y1* et *le TP*) et d'enzymes du métabolisme de l'AA (*COX-1*).

3.2.2.1 Polymorphisme du récepteur P2Y1

Les études cliniques montrent une association entre les polymorphismes 893C>T P2Y1 (*population caucasienne*) et 893C>C P2Y1 (*population chinoise*) avec une réduction de l'effet de l'ASA (Jefferson et al. 2005; Q. Li et al. 2007). En revanche, aucune donnée clinique n'associe l'implication de polymorphisme du récepteur P2Y12 avec une baisse de l'effet thérapeutique de l'ASA (Wurtz et al. 2012).

3.2.2.2 Polymorphisme du récepteur aux thromboxanes

Le récepteur TP, dont l'activation est principalement dépendante de la production de TxA plaquettaire, possède deux polymorphismes 795C>T et 924T>C qui, à l'état homozygote, confèrent une agrégation plaquettaire résiduelle (agrégation persistante) sous ASA plus importante. L'auteur suggère une hypersensibilité du récepteur aux TXA2 ou à d'autres composés tel que l'isoprostane (Fujiwara et al. 2007).

3.2.2.3 Polymorphisme de la COX-1

Le polymorphisme -842G de la COX-1, présent chez 12 % de la population, est associé à une augmentation de l'agrégation plaquettaire induite par l'AA chez des patients sous ASA sans variation significative de la production de TXA2 (Maree et al. 2005).

3.3 Implication de MRP4 dans la résistance pharmacologique à l'aspirine

Les premiers cas de résistance à l'ASA sont rapportés chez des patients ayant subi un pontage aorto-coronarien et qui présentent une mauvaise inhibition de la COX-1 et ce au 5^{ème} jour après intervention (Zimmermann et al. 2003). Cette résistance a ensuite été corrélée à une surexpression plaquettaire de MRP4 à la membrane plasmique comme c'est le cas pour les patients atteints par le « virus de l'immunodéficience humaine » (VIH) où MRP4 est surexprimé et pour ceux atteints de thrombocytémies essentielles où la surexpression plaquettaire de MRP4 est corrélée à une agrégation résiduelle, suite à un traitement par ASA, plus importante (Marcantoni et al. 2018; Giona et al. 2019).

Le mécanisme de surexpression de MRP4 consécutive d'un traitement par ASA a d'abord été étudié au sein de lignées mégacaryocytaires (*DAMI*), des mégacaryocytes (*MK*) puis dans des plaquettes de patients sous aspirine. Les *DAMI* incubées 48 heures avec 50 μ M d'ASA montrent une augmentation de 30 % de l'ARNm et une augmentation de la présence de MRP4 en immunofluorescence, augmentation qui disparaît 2 jours après suspension de l'ASA dans le milieu de culture. Les *MK* issus de culture de progéniteurs montrent quant à eux une surexpression plus lente de MRP4 d'un facteur 1,7 et 1,6 de l'ARNm et de la protéine après 4 jours de traitement par ASA 50 μ M (Massimi et al. 2014).

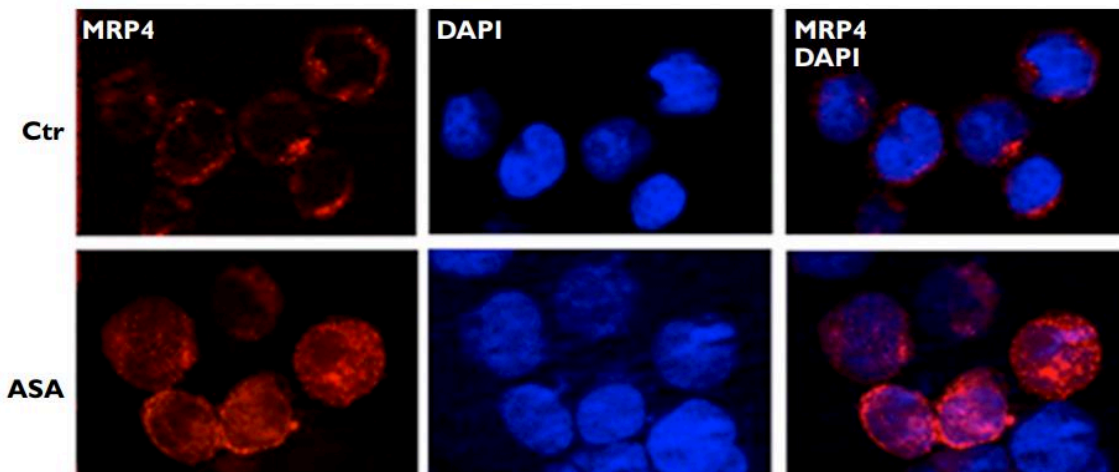


Figure 28. Mise évidence de la surexpression de MRP4 au sein de cellules *DAMI* selon (Massimi et al. 2014). MRP4 est marqué en rouge tandis que le noyau des cellules est marqué en bleu. Ctr : contrôle, ASA : aspirine.

La mise sous ASA de patients à forte (300 mg par jour) et faible dose (100 mg par jour) permet d'observer l'augmentation de l'expression de MRP4 au sein des plaquettes (Massimi et al. 2014; Alemanno et al. 2018). Ces plaquettes présentent, outre la surexpression de MRP4 à la membrane plasmique, une activité résiduelle plus importante que dans le groupe contrôle (Massimi et al. 2016).

Des essais fonctionnels sur des préparations de granules plaquettaires révèlent l'implication de MRP4 dans l'efflux de l'ASA et l'AS, efflux qui peut alors être bloqué, *in vitro*, par le dipyridamole ou un inhibiteur de MRP4, le MK571. A partir de l'utilisation du dipyridamole, les auteurs suggèrent que la baisse de l'efficacité de l'ASA, sur un traitement au long cours, serait reliée à la surexpression de MRP4 qui effluerait l'ASA hors des plaquettes et serait alors mesurable par une activité résiduelle plaquettaire plus importante et une baisse de l'inhibition de la COX-1 (Mattiello et al. 2011).

L'implication fonctionnelle de la surexpression MRP4 dans la variation de l'effet de l'ASA a été confirmée par Alemanno et al. 2018 qui montre que l'inhibition de MRP4 par le cilostazole permet 1) l'accumulation de l'ASA dans les plaquettes, 2) une meilleure inhibition de la COX-1 et 3) une baisse de l'agrégation résiduelle au collagène chez des patients résistant à l'aspirine (Alemanno et al. 2018).

De récents travaux supportent le rôle du miRNA-26b dans la régulation de l'expression de MRP4 au cours de la résistance à l'ASA. Le miRNA-26b est retrouvé diminué en cas de surexpression de MRP4 induite par l'ASA alors que sa surexpression, lors de transfection de MK et de cellules DAMI, implique une baisse de la protéine MRP4 basale et à l'incapacité de l'ASA d'induire une surexpression de MRP4 (La Rosa et al. 2018).

Résultats

Chapitre 1 : Role of membrane lipid rafts in MRP4 (ABCC4)-dependent regulation of the cAMP pathway in blood platelets.

Tiphaine BELLEVILLE-ROLLAND, **Alexandre LEUCI**, Alexandre MANSOUR, Benoit DECOUTURE, Fanny MARTIN, Sonia POIRault-CHASSAC, Margot ROUAUD, Hippolyte GUERINEAU, Blandine DIZIER, Dominique PIDARD, Pascale GAUSSEM, Christilla BACHELOT-LOZA

Soumis

Introduction

Dans un contexte physiologique, les plaquettes circulent au repos, repos qui est maintenu par la capacité de l'endothélium intact à produire des agents activateurs des nucléotides cycliques plaquettaires. L'endothélium produit, du NO, à partir de la L-arginine, et synthétise de la prostacycline (PGI-2) à partir de l'acide arachidonique. Le NO diffuse à travers la membrane plaquettaire et active la GCs qui produit du GMPc dont l'effet inhibiteur plaquettaire est médiée par la PKG. La PGI-2 active le récepteur IP et permet à la protéine Gs, couplée à ce dernier, d'activer l'AC ce qui aboutit à la formation d'AMPc dont l'activité inhibitrice plaquettaire est médiée par la PKA.

Le système de régulation de l'activité plaquettaire par l'AMPc est un système sensible où une faible variation de production de l'AMPc peut, par activation de PKA, réguler de façon négative et importante l'agrégation plaquettaire. Une étude d'Eigenthaler et al. qui étudie le rapport entre le taux des nucléotides cycliques et l'activation des protéines kinases, suggère que la quantité d'AMPc présente au sein des plaquettes au repos serait capable de maintenir activée 70 % de PKA et par conséquent il suffirait d'une faible augmentation de l'AMPc afin d'activer toutes les molécules de PKA alors qu'il faudrait une augmentation d'un facteur 30 du taux du GMPc pour activer toutes les molécules de PKG (Eigenthaler et al. 1992).

Afin de maintenir les plaquettes au repos sans provoquer d'état réfractaire, les plaquettes possèdent des mécanismes de régulation de la quantité et/ou de la disponibilité de l'AMPc que sont les PDEs, la protéine d'efflux MRP4 et, plus récemment mis en évidence dans divers types cellulaires, la compartimentation de la voie de l'AMPc/PKA. Il est en effet proposé depuis quelques années une organisation spatiotemporelle de la voie AC/AMPc/PKA appelée microdomaine à AMPc.

Ces microdomaines constitueraient un espace métabolique restreint et seraient composés des acteurs permettant la synthèse de l'AMPc et de ceux limitant sa diffusion, le tout localisé par les « A-Kinase Anchor Protein » (AKAPs), famille de protéines qui inclut entre autres la moésine. Cette organisation de l'AMPc sous forme de microdomaines permettrait alors de réguler localement l'activité de certains récepteurs. A ce jour, très peu de travaux se sont intéressés à ces microdomaines au sein des plaquettes et d'autres travaux suggèrent un lien entre microdomaines d'AMPc et radeaux lipidiques.

Pour définir le rôle des radeaux lipidiques et l'implication de la protéine MRP4 dans la régulation de la voie de l'AMPC nous avons d'abord étudié l'impact de la désorganisation des radeaux lipidiques par l'utilisation de la méthyl- β -cyclodextrine sur la répartition des acteurs de la voie de l'AMPC et sur le taux d'AMPC avant et après activation plaquettaire. Nous avons ensuite étudié l'implication de la protéine MRP4 au sein de ces radeaux lipidiques avec l'utilisation un modèle de souris invalidées pour MRP4.

Manuscrit

Role of membrane lipid rafts in MRP4 (ABCC4)-dependent regulation of the cAMP pathway in blood platelets.

Tiphaine BELLEVILLE-ROLLAND^{1,2}, Alexandre LEUCI², Alexandre MANSOUR², Benoit DECOUTURE², Fanny MARTIN², Sonia POIRault-CHASSAC², Margot ROUAUD², Hippolyte GUERINEAU², Blandine DIZIER², Dominique PIDARD², Pascale GAUSSEM^{*1,2}, Christilla BACHELOT-LOZA^{*2}

*PG and CBL share co-senior authorship

¹ Service d'hématologie biologique, AH-HP, Hopital Européen Georges Pompidou, F-75015 Paris, France

² Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM U1140, F-75006 Paris, France

Correspondance to : Dr Christilla Bachelot-Loza
INSERM UMR-S1140, Faculté de Pharmacie de Paris
4 Avenue de l'observatoire
F-75006 Paris, France
Email : christilla-bachelot-loza@parisdescartes.fr
Phone : +33 1 53 73 96 19

Key-words: platelets, MRP4 (ABCC4), cAMP, lipid rafts, microdomains

Category: original article, cellular haemostasis and platelets

Running Head: Role of MRP4 and lipid rafts in platelet cAMP regulation

Abstract

Background. Platelet cytosolic cAMP levels are balanced by synthesis, degradation, and efflux to dense granules or to the extracellular space. Efflux can occur via MRP4 (multidrug resistant protein-4, ABCC4) present on dense granule and/or plasma membranes. Our aim was to evaluate the relationship between the distribution and activity of MRP4 in lipid rafts and cAMP homeostasis.

Methods. Immunoblot characterization of MRP4 and of the effectors of the cAMP pathway present in lipid rafts, isolated by differential centrifugation, was performed using human platelets. Platelet activation and cAMP homeostasis were analyzed in wild-type or MRP4-deleted mouse platelets in the presence of methyl- β -cyclodextrin (M β CD) to disrupt rafts, and of activators of cAMP signaling pathways.

Results. MRP4 was mainly found outside lipid rafts but a small fraction (14%) was associated with rafts. Lipid rafts contained most of the inhibitory G-protein Gi, contrary to the stimulatory Gs-protein, the adenylate cyclase AC3, and the phosphodiesterases PDE2 and PDE3A that were all found as only trace amounts in rafts. M β CD dose-dependently inhibited platelet aggregation. An additive inhibitory effect existed between the AC activator forskolin and M β CD that was accompanied by an overincreased cAMP and was significantly augmented upon MRP4 deletion. Finally, an efflux of cAMP out of resting platelets was observed that was partly dependent on MRP4 and of raft integrity.

Conclusion. Our results are in favor of part of MRP4 being present at the platelet surface. Lipid raft integrity is necessary for cAMP signaling regulation, although most players of cAMP homeostasis are essentially located outside rafts.

Introduction

Platelets play a central role in hemostasis and thrombosis. In a physiological situation, circulating blood platelets are maintained functionally inactive to avoid any inappropriate stimulation and aggregate formation. This regulated resting state is mostly under the control of cyclic nucleotide homeostasis¹. Endothelial cells (EC) are the main source of two major platelet inhibitory molecules, namely prostacyclin (PGI₂, prostaglandin I₂) and adenosine, the latter being produced from extracellular ATP catabolized by ecto-ATPases such as CD39 and CD73 expressed on EC². PGI₂ and adenosine bind to specific platelet receptors, PGI₂ through IP receptor and adenosine through A_{2A} and A_{2B} receptors, through which they activate adenylate cyclases (AC) that generate cyclic adenosine monophosphate (cAMP)³. To date, only AC3 and AC5/6 isoforms of AC have been identified in platelets⁴. EC also release nitric oxide (NO), a free radical messenger that activates guanylate cyclase (GC) to produce cyclic guanosine monophosphate (cGMP)⁵.

Cyclic nucleotides stimulate cAMP- or cGMP-dependent protein kinases (PKA and PKG, respectively) to phosphorylate a broad panel of substrate proteins that maintain platelets in a resting state⁶. PKA activation inhibits cytoskeleton reorganization, integrin α IIb β 3 activation, granule secretion and Ca²⁺ mobilization, all processes implicated in and / or resulting from platelet activation. To limit the extent to which cAMP/cGMP-dependent pathways repress platelet activation, phosphodiesterases (PDE) can rapidly hydrolyse cyclic nucleotides and thus stop their downstream pathways⁷. In platelets, several PDE isoforms, PDE2, PDE3A and PDE5A⁴, are activated by various mechanisms, and in particular through PKC and PKA activities, leading to a negative control of cAMP homeostasis⁸. Similarly, cGMP induces a negative feedback on its own synthesis by activating PDE2A⁹ and PDE5A¹⁰.

Platelets are activated following vascular injury, as they first adhere to denuded sub-endothelium components, such as collagens or von Willebrand factor (VWF), or to an activated inflammatory endothelium. Then platelets undergo a shape change and a relocation of their granule content before secretion. Among secreted molecules is ADP that acts as a platelet agonist mostly by reducing the level of cytosolic cyclic nucleotides¹¹. Indeed, ADP binding to the G protein-coupled receptor (GPCR) P2Y₁₂, a G_i-coupled ADP receptor, inhibits AC *via* the G α_i subunit, thus rapidly lowering intraplatelet levels of cAMP and subsequently PKA activation. The balance between platelet activation and inhibition is thus largely under

the control of cAMP, as witnessed by the efficacy of pharmacological molecules targeting this pathway, such as anti-P2Y₁₂ antiplatelet drugs, PDE inhibitors, and PGI₂ analogues^{12,13}.

Although the major role of ADP, cAMP and cGMP in platelet activation and its regulation has been demonstrated for years¹, the underlying molecular mechanisms are only beginning to emerge. Besides synthesis and degradation, the platelet cytosolic cAMP levels are also balanced by transport out of the cytosol either to dense granules or to the extracellular space^{14,15}. The ATP-binding cassette (ABC) transporters have been reported to regulate cAMP homeostasis in several cell types, and notably the multidrug resistance protein-4 (MRP4, ABCC4) that can indeed transport cyclic nucleotides and nucleotide analogues^{14,16,17}. More recently, its implication has been established in platelet activation since several groups, including ours, have shown that MRP4 regulates platelet activation and clot formation by modulating the cAMP-PKA signaling pathway^{18–20}. Indeed, *in vivo* and *in vitro* platelet aggregation and thrombus formation are defective in transgenic MRP4-deficient mice due to an impaired MRP4-dependent efflux of cAMP and consequently, its accumulation in the cytosol^{15,19}. Different studies have localized MRP4 either on dense granule membranes, on the plasma membrane, or both^{15,21,22}. Although MRP4 localization in resting as well as in activated platelets remains a matter of debate, it is obvious that its diversified localization underlines the emerging concept of cAMP compartmentation in platelets. The so-called “cAMP-dependent microdomains” represent a major regulatory mechanism for the biological activities of this cyclic nucleotide in other cell types^{23–25}. In these specific microdomains, A-kinase anchoring proteins (AKAP) play a major role by assembling and colocalizing enzymes such as PDE, phosphatases, AC, PKA and receptors that together provide spatial regulation of cAMP generation and signaling. As a consequence, PKA activity can be focused on specific substrates in different subcellular compartments²⁶. In platelets, little is known about this structural and functional entity but it is likely that similar structures exist²⁷.

Lipid rafts are membrane microdomains identified as dynamic assemblies of sphingolipids and cholesterol that are present in all cell types including platelets²⁸. They play a critical role in maintaining multiprotein complexes at the cytoplasmic side of the plasma membrane²⁹. In platelets, the role of lipid rafts has been described in critical signaling mechanisms, such as activation induced by G-protein-coupled receptors²⁸. So far, only one group has linked lipid rafts to the cAMP pathway in platelets, showing that lipid rafts are

important in the regulation of platelet-VWF interactions²⁷ and in the inhibitory effect on platelet activation of PGI₂ or forskolin³⁰. Thus, cAMP microdomains, whether or not associated with lipid rafts, could regulate the availability and / or distribution of cAMP in platelets, controlling the resting state of platelets by assembling the players of the cAMP pathway both for synthesis, degradation and efflux. However, nothing is known on the presence of MRP4 in lipid rafts, and /or in cAMP microdomains.

The main objective of the present work was to clarify the relationship between the role of MRP4, lipid rafts and the regulation of cAMP homeostasis in platelets with the aim to further analyze whether the cAMP microdomains belong to, or are related to lipid rafts, particularly for what is concerned with the compartmentation of cAMP.

Results

Evaluation of the presence of MRP4 and of proteins involved in the platelet cAMP pathway in membrane lipid rafts

To characterize the potential relationship between lipid rafts, MRP4, and their role in the maintenance of the intracellular cAMP homeostasis, we first investigated whether or not MRP4 could be localized in lipid rafts, together with various effectors that can operate in the cAMP signaling pathway.

Membrane lipid rafts were isolated from human washed platelets at rest or after activation with PAR1-ap, using ultracentrifugation on sucrose density gradients as detailed in the Methods section. Lipid rafts are characterized by their enrichment with specific proteins, in particular the transmembrane protein LAT^{31,32}. In platelets at rest, LAT was mainly found in fractions of intermediate density in sucrose gradients (Figure 1, top panel), similar to those previously described as containing lipid rafts insoluble in 0.5 % Triton X-100³³. Approximately two thirds of LAT protein were associated with lipid rafts, whereas the residual amount was recovered in the high-density sucrose fractions.

When platelets were preexposed to M β CD for depletion of membrane cholesterol, the consequent disruption of lipid rafts was ascertained by the disappearance of LAT from the intermediate density sucrose fractions and its shift to high-density fractions (Figure 1, middle panel). Upon platelet activation, the distribution of LAT protein in sucrose gradients was similar to that seen for resting platelets, suggesting that activation does not notably alter lipid rafts (Figure 1, bottom panel).

For what is concerned with MRP4, our results showed that a minor fraction ($\leq 15\%$) of the total platelet MRP4 was present in lipid rafts in both resting and activated platelets (Figure 1). We then investigated if the proteins responsible for the synthesis of cAMP (Gs and AC3), for the inhibition of its synthesis or for its degradation (Gi, PDE2 and PDE3A), as well as its principal effector (PKA) were detectable in the lipid rafts. Gs as well as PDE2 and 3A isoforms were found as traces ($\leq 5\%$ of the total proteins) in the lipid raft fractions in both resting and activated platelets (Figure 1). The Gi protein and the regulatory subunit I of PKA were, in turn, notably present in the lipid raft fractions, accounting for $\approx 50\%$ and $\approx 70\%$ of the total proteins, respectively. After platelet activation, a similar part of the PKA-RI and of the Gi proteins remained associated with rafts (Figure 1). The presence of the scaffold AKAP family member

moesin was evaluated in these fractions. Interestingly, the bulk ($\geq 95\%$ of the total protein) of moesin was found outside the lipid rafts, suggesting that moesin was not the major AKAP for localization of PKA into lipid rafts.

MRP4 deletion enhances the combined effect of cAMP activation and of lipid raft disruption on inhibition of platelet aggregation

Given the reported respective roles of MRP4 and lipid rafts on cAMP homeostasis as detailed in the introduction, and the present observation that part of MRP4 is localized in these lipid rafts, we investigated the links between these factors in the regulation of platelet activation. For this purpose, transgenic MRP4-deficient mouse platelets were compared to those of WT animals for PAR4-ap-induced aggregation (i) in the presence of M β CD that, by depleting membranes from their cholesterol, is able to disturb lipid rafts, and (ii) upon the addition of an activator of the cAMP pathway. We previously showed that MRP4-deficient platelets exhibit a diminished aggregation response when activated by low PAR4-ap concentrations, due to increased basal levels of cytosolic cAMP¹⁹. In the present study, to overcome this defect of activation, platelet aggregation was induced by high PAR4-ap concentrations, i.e. 100 μ M. In these conditions, aggregations did not differ between genotypes with values of 69% [54-74] and 62% [53-69] for WT and MRP4-deficient platelets, respectively.

When platelets were previously exposed to increasing amounts of M β CD, a concentration-dependent inhibition of aggregation was observed. Low M β CD concentrations (0.25 mM) did not significantly inhibit platelet aggregation, with 17% inhibition [1-38] for WT and 24% [0-38] for MRP4-deficient platelets, respectively ($p > 0.05$ when compared to control condition without M β CD) (Figure 2, left panel). At 0.5 mM M β CD, a significant inhibition of platelet aggregation was evidenced for both genotypes, with 27% inhibition [20-61] for WT and 46% [12-68] for MRP4-deficient platelets, respectively. This effect increased with M β CD concentration to reach more than 90% inhibition with 1 mM M β CD. It is of note that no significant differences were denoted between genotypes whatever the M β CD concentration, suggesting that under such conditions of strong platelet activation, aggregation depending on the maintenance of lipid rafts is not or poorly dependent on MRP4 activity.

Similar experiments were conducted in parallel in the presence of forskolin that activates AC and thus induces cAMP generation. When lipid rafts were first disturbed with M β CD, the

inhibition of platelet activation induced by forskolin was markedly enhanced when compared to that in the absence of M β CD (Figure 2, right panel). These results suggest that cAMP signaling resulting from AC activation does not need the integrity of lipid rafts to develop its inhibitory activity, but even more that this activity is increased in the absence of lipid rafts. In these conditions of strong platelet activation, the inhibition produced by 1 μ M forskolin in the absence of M β CD did not differ between genotypes, with 34% [25-39] inhibition for MRP4-deficient platelets vs 24% [19-28] for WT platelets ($p>0.05$). However, with the pre-exposure of platelets to M β CD 0.5 or 0.75 mM, the inhibition of MRP4-deficient platelet aggregation was significantly higher compared to that of WT platelets (79 % [72-93] vs 62% [51-70] ($p=0.01$) and 94 % [92-97] vs 70 % [46-75] ($p<0.05$ and $p<0.001$), respectively). Thus, whereas no interaction was observed between the inhibitory effect of M β CD and that due to the absence of MRP4 in the absence of forskolin as described above ($p>0.05$, Figure 2 right panel), a significant interaction existed in the presence of forskolin ($p=0.026$). These results suggest that the absence of MRP4 increases the inhibitory effect of cAMP on platelet activation, as seen consecutively to the destruction of lipid rafts by M β CD, and when AC is activated by forskolin.

Quantification of cAMP according to lipid raft integrity and MRP4 deletion

We next quantified the effect of M β CD on cAMP level in platelets at rest and after activation. Under basal conditions, in the absence of forskolin or PGE₁, total cAMP level was very low, whether or not platelets were treated with M β CD (9.2 [7.2-19.6] and 8.6 [6.1-18.3] pmol/10⁹platelets, with and without M β CD, respectively; $p>0.05$ $n=10$). Therefore, all experiments comparing WT and MRP4-deficient platelets for cAMP levels were performed after activation of the cAMP pathway. Platelets were thus pre-incubated with PGE₁ to activate the Gs protein-coupled receptor IP, leading to AC activation with the aim to take into account the entire signaling pathway. As previously reported¹⁹, deletion of MRP4 did not impact total cAMP level in platelets following PGE₁ addition, with concentrations of 58.7 [32.6-113.7] and 55.5 [18.8-104.7] pmol/10⁹platelets for WT and MRP4-deficient platelets, respectively ($p=0.92$) (Figure 3A). When platelets were pretreated with 0.5 mM M β CD, then exposed to PGE₁, total cAMP levels significantly increased to 140.4 [80.5-236.8] and 121.4 [39.3-192.3] pmol/10⁹platelets for WT and MRP4-deficient platelets, respectively ($p<0.001$ and $p=0.0016$ compared to WT and MRP4-deficient platelets respective control values without M β CD)

(Figure 3A), with no difference between genotypes ($p=0.76$). The 0.5 mM M β CD concentration was chosen as it exerted an additive effect of inhibition of platelet aggregation in the presence of forskolin in MRP4-deficient platelets as compared to WT platelets (Figure 2). These results thus suggest that, if maintenance of membrane lipid rafts plays a role in the regulation of total cAMP levels in platelets at rest, it occurs independently of MRP4, notwithstanding cAMP intracellular distribution. Similar results were obtained using forskolin instead of PGE₁ (data not shown).

MRP4 present on the platelet dense granule membrane has been reported to efflux cAMP from cytosol to granules. However, the presence of MRP4 on the platelet plasma membrane remains discussed. Interestingly, when quantifying cAMP levels in the extracellular space of mouse platelet suspensions at rest in the presence of PGE₁, we measured a basal release of this cyclic nucleotide for WT platelets, amounting 12 [8.5-16.3] pmol/10⁹platelets (Figure 3B, white boxes), which represented 17.3% [12.2-23.5] of the total cAMP of the platelet suspension. The cAMP spontaneously released by MRP4-deficient platelets (7.3 [2.3-10.2] pmol/10⁹platelets) was significantly lower compared to WT platelets ($p=0.006$) (Figure 3B, hatched boxes), corresponding to 10.4% of the total cAMP [3.3-14.5] ($p<0.001$ compared to release by WT platelets), thus suggesting that this basal efflux of cAMP was partially dependent on the presence of MRP4 on the platelet surface at rest. Of note, platelets were prepared in the presence of inhibitors (see Methods section) to avoid activation during isolation, as ascertained by the absence of CD62P exposure on plasma membrane, a marker of alpha granule exocytosis (data not shown).

Interestingly, addition of 0.5 mM M β CD that significantly increased total cAMP in combination with PGE₁ (see Figure 3A), did not modify the basal cAMP release in resting platelets (WT: 13.7 [7.9-20.2] in the absence of M β CD vs 12 [8.5-16.3] in its presence, $p=0.09$; MRP4^{-/-}: 9 [5.9-11.7] vs 7.3 [2.3-10.2] pmol/10⁹platelets, $p=0.17$) (Figure 3B), suggesting a saturable transport of cAMP outside the cells. As a consequence, when expressed as a percentage of total cAMP, efflux was found significantly lower in the presence of M β CD, as compared to that seen for platelets with intact lipid rafts, with values of 9.4% [5.5-13.8] ($p<0.001$) for WT platelets and 5.1% [3.3-6.7] ($p=0.0087$) for MRP4-deficient platelets. Interestingly, the difference between genotypes in basal efflux, in the presence of PGE₁, observed in the absence of M β CD was

maintained after preexposure to M β CD ($p=0.004$ for absolute values and $p=0.017$ for percentages), suggesting that lipid rafts integrity does not play a major role in the part of basal cAMP-release that is mediated by MRP4.

In a last step, cAMP was quantified after activation of platelets with PAR4-ap. Upon activation, total cAMP rapidly (data not shown) and significantly decreased compared to resting state (20.4 [15.2-23.7] vs 58.7 [32.6-113.7] pmol/ 10^9 platelets for WT, $p=0.007$ and 15.9 [13-20.4] vs 55.5 [18.8-104.7] pmol/ 10^9 platelets for MRP4-deficient platelets, $p=0.0028$) (compare Figures 4 and 3A) with no difference between genotypes (Figure 4, left panels, $p=0.71$).

As in resting platelets, total cAMP present in PAR4-ap-activated platelet suspension 90 sec after addition of PGE₁ was significantly higher when WT platelets were preincubated with M β CD (36.3 [17.5-46.2] vs 20.4 [15.2-23.7], $p=0.008$). In MRP4-deficient platelets, the increase in total cAMP due to M β CD was less obvious and did not reach significance (16.8 [14-57.2 vs 15.9 [13-20.4] ($p=0.065$)). However, no significant differences existed between genotypes ($p=0.25$).

Discussion

The aim of our study was to characterize the potential relationship between membrane lipid rafts and the MRP4 transporter in the maintenance of the intracellular cAMP homeostasis. Indeed, in other cell types, the cAMP pathway is regulated at the molecular level through involvement of many actors, including MRP4, and to be structurally organized into submembrane microdomains associated or not with the lipid raft domains^{24,34}. However, if the interdependence between these processes has been addressed previously³⁰, the potential location of MRP4 within rafts and/or cAMP microdomains and its interactions with the regulation of the cAMP pathway remain to be characterized.

When analysing the location of MRP4 within lipid rafts in human platelets, we found that most part of the MRP4 protein was detected outside lipid rafts. However, 15 % of MRP4 was present in these membrane structures. To decipher the specific roles of MRP4 within lipid rafts in the regulation of cAMP, we further analysed the presence of some of other players of this signaling pathway in human membrane lipid rafts. This would allow hypothesizing the existence of cAMP microdomains associated to platelet lipid rafts if markers of cAMP microdomains such as the AKAP moesin, AC and PDE would be found in lipid rafts. Considering that it was already shown that a minor fraction of the platelet AC5/6 isoforms of adenylate cyclase are present in the lipid rafts³⁰, we focused on the AC3 isoform since it has been formerly identified in human platelets³⁵. It appears from our results that AC3, but also PDE2A and PDE3A could be detected only as trace amounts in lipid rafts of resting as well as activated platelets. By contrast, and in agreement with previous reports³⁶, we identified the major fraction of the platelet Gi protein in the lipid rafts, where it should be theoretically able to inactivate the small fraction of AC isoforms present in rafts. On the opposite, the Gs protein was found outside lipid rafts. This is in line with previous data showing Gs as well as the PGI₂ receptor IP to be entirely located outside of the rafts³⁰. Our results are therefore in favor of players in the synthesis and degradation of cAMP being essentially outside the membrane lipid rafts and MRP4 shows a minor fraction in lipid rafts. The signaling activity of cAMP being dependent of its effector PKA, the presence of the latter in the lipid rafts was also evaluated.

We found PKA-R1 to be located both inside and outside lipid rafts, thus confirming previous data²⁷.

Given the complex distribution of the different players of the cAMP pathway, in and/or outside lipid rafts, we sought to characterize more precisely the potential interaction between rafts and MRP4 in cAMP homeostasis. We therefore used platelets from WT or MRP4-deficient mice pre-exposed to M β CD, a compound known to deplete biological membranes from their cholesterol and thus to disrupt lipid rafts³⁷.

Our results showed a concentration-dependent inhibitory effect of M β CD on PAR4-ap-induced mouse platelet aggregation, confirming that lipid raft disorganization alters platelet reactivity³⁸. Of note, the same features were observed for PAR1-ap-induced human platelet activation upon exposure to similar concentration of M β CD (data not shown). In these conditions, no difference was observed between mouse platelet expressing or not MRP4, supporting that regulation of aggregation depending on the integrity of lipid rafts did not depend on MRP4. To further evaluate the relationship between lipid rafts, MRP4 and the cAMP pathway, platelets previously treated with M β CD were exposed to forskolin in order to stimulate cAMP synthesis. In such conditions, the extent of inhibition of platelet aggregation significantly exceeded that produced by M β CD or forskolin used separately for both WT and MRP4-deficient platelets (compare figure 2 left and right panels). Whereas no interaction was observed between the inhibitory effect of M β CD and that due to the absence of MRP4 in the absence of forskolin, a significant interaction existed between these two variables in the presence of forskolin. Overall, these results suggest that lipid rafts participate to the control of cAMP homeostasis and that the absence of MRP4 increases the inhibitory effect of cAMP on platelet activation.

We further evaluated the platelet cAMP levels and efflux in MRP4-deficient *versus* WT mice in the presence of M β CD. At rest, it was found that destruction of lipid rafts induced a three-fold increase in total cAMP in platelet suspensions exposed to PGE₁, which is in agreement with the observed inhibition of aggregation described above. MRP4 deficiency did not modify total cAMP levels, whatever the presence or the absence of M β CD, which is in favor of the absence of a role for MRP4 in the regulation of cAMP metabolism within lipid rafts.

Whereas we and others^{15,19} have identified the major role for MRP4 in the regulation of cytosolic cAMP level, its presence on plasma membrane and/or on the dense granule membrane remains a matter of debate. To investigate this particular aspect, we used washed platelets isolated from WT mouse and evidenced a basal release of cAMP from platelets at rest in the presence of PGE₁, corresponding to about one fifth of the total platelet cAMP. We provide evidence that this basal release of cAMP is partly dependent on MRP4, since it was markedly diminished in MRP4-deficient platelets (see figure 3B) despite the fact that MRP4-deficient platelets have similar total cAMP level than WT platelets. These results are in favor of the presence of MRP4 on the platelet plasma membrane where it may participate to the efflux of cAMP when cytosolic concentrations are increased through Gs-AC activation. The detection of a fraction of MRP4 in the rafts, which we are currently demonstrating, seems to be in agreement with this hypothesis. Since MRP4-deficient resting platelets were still able to release part of cAMP, it is likely that another transporter is also involved in this basal efflux. Of note, the present results does not allow confirming the presence of MRP4 on dense granule membrane, nor gives informations on the potential existence of lipid rafts in dense granule membrane, which is a limitation of the study.

Noteworthy, results obtained using M β CD to disrupt lipid rafts bring further informations. Indeed, the fact that the increase in total platelet cAMP observed in such conditions, which is similar in normal and in MRP4-deficient resting platelets (see figure 3A), did not result in corresponding increased basal efflux would suggest a saturable transport for this efflux. Other explanation would be that the MRP4-independent fraction of the efflux is partially dependent on the integrity of the rafts. Furthermore, the fact that the difference in cAMP basal release between WT and MRP4-deficient platelets, incubated with PGE₁, was still observed after exposure to M β CD suggests the MRP4-dependent basal efflux of cAMP is independent of lipid raft integrity. Furthermore, we also investigated the relationships between raft, cAMP homeostasis and MRP4 during activation. Upon activation of platelets by PAR4-ap, and whether considering WT or MRP4-deficient platelets, total cAMP was drastically diminished (see Figure 4). This suggests that the observed inhibitory effect of M β CD does not depend on elevated residual cytosolic cAMP levels, but rather on its increase before activation. This increase is utmost inhibitory for MRP4-deficient platelets than cannot effluate cAMP from cytosol with the same efficacy as WT.

Thus, our present results together with previously published data³⁹ are in favor of cAMP microdomains, if they exist, to be spatially distinct from lipid rafts in platelets. Lipid rafts would in contrast play a downregulatory role on cAMP-signaling pathway, as previously suggested³⁰. Indeed, the major players of cAMP synthesis were found outside the rafts, and the bulk of PDE2 and PDE3 that is localized outside rafts could represent a “barrier” regulating the cAMP available in the cytosol as previously proposed in nuclear cells such as cardiomyocytes or smooth muscle cells, as part of a cAMP microdomain^{40,41}.

Besides, lipid raft integrity would be necessary to maintain cAMP homeostasis in response to physiological stimulation of cAMP production, for instance by endothelial PGI₂, thus maintaining the appropriate balance between inhibition and activation of platelets. One possibility is that by trapping part of the PKA-R1 platelet pool, lipid rafts would keep it non available for activation by cAMP. Therefore, the potentiation of the inhibitory effect of forskolin after lipid raft disruption, both in human platelets and in WT or MRP4-deficient mouse platelets, could be explained by a release of PKA-R1 from the rafts that would reinforce the in situ activity of the PKA-R1 present outside rafts. PKA-R1 location near the cytosolic leaflet of the plasma membrane by scaffold AKAP has been proposed to be essential to its function²⁷, and moesin may be one of the AKAP responsible for this process in platelet lipid rafts⁴². In a model involving platelet activation via the von Willebrand factor/platelet GPIb receptor axis, the use of a peptide blocking the binding of PKA to AKAP resulted in a decreased activity of PGI₂ as an antagonist of platelet activation, thus underlining the importance of the binding of PKA by AKAP for a full biological activity of cAMP, at least in this model²⁷. However, our results establish that moesin is barely detectable in lipid rafts of resting platelets, and thus should not be the major AKAP that allows localization of PKA-R1 at least in rafts. Therefore, further identification, characterization and distribution of platelet AKAPs remain important goals to get further insights about the spatial regulation of cAMP pathway.

Our present study was designed to characterize the role of lipid rafts during cAMP pathway activation in platelets, pathway that is, in physiological situations, activated by molecules released by endothelial cells. However, cAMP is also negatively regulated following secretion of ADP during early steps of platelet activation and exocytosis and the integrity of lipid rafts,

which contains most of the platelet Gi protein, as shown in our present study, appears also essential to this amplification mechanism. Indeed, Quinter et al. showed a defect of ADP signaling when platelets are depleted in cholesterol⁴³. Our results showing an increase of total cAMP in the presence of M β CD may also be in line with this hypothesis: Gi, which would spread out of lipid rafts during their disruption by M β CD, would thus not be activated by the GPCR receptor P2Y₁₂ following binding of ADP, resulting in a defective inhibition of AC and a cAMP production. Thus, differential spatial distribution of all players and lipid raft integrity are both necessary for maintaining cAMP homeostasis in platelets. However, we cannot exclude an alternative effect of M β CD, which depletes cholesterol from membranes, and then would not only disrupt lipid rafts, but also destabilize putative cAMP microdomains. PDEs would therefore be released from the protecting « barriers » that are part of these particular functional microdomains, explaining the increase of total platelet cAMP upon exposure of the cells to a combination of M β CD and forskolin.

In conclusion, our results confirm a role for lipid rafts on cAMP signaling homeostasis in platelets. However, MRP4, that has the capacity to efflux cAMP outside the cells and that is partly associated to lipid rafts, was not or only slightly involved in this particular mechanism. We also propose the existence of cAMP microdomains containing AKAP and PDE outside lipid rafts in the membrane of resting platelets. However, independently of rafts, the transporter MRP4 plays a positive role in platelet activability, by decreasing cytosolic cAMP, not only by its capacity to allow storage of cAMP in dense granules^{19,21}, but also, as shown here and previously by others, by participating to a basal cAMP release from resting platelets^{15,19}. All these data point to MRP4 as a potential target for an antithrombotic agent with vascular properties¹⁴, beside molecules targeting directly the platelet cAMP pathway at the production level, such as anti-P2Y₁₂ and PDE inhibitors^{12,13}.

References

1. Smolenski A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2012;10:167-176.
2. Marcus A, Broekman M, Drosopoulos J, et al. Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:178-182.
3. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999;79:1193-1226.
4. Burkhart J, Vaudel M, Gambaryan S, et al. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood.* 2012;120:73-82.
5. Makhoul S, Walter E, Pagel O, et al. Effects of the NO/soluble guanylate cyclase/cGMP system on the functions of human platelets. *Nitric oxide Biol Chem.* 2018;76:71-80.
6. Tasken K, Aandahl E. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev.* 2004;84:137-167.
7. Nagy Z, Smolenski A. Cyclic nucleotide-dependent inhibitory signaling interweaves with activating pathways to determine platelet responses. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2:558-571.
8. Hunter R, Mackintosh C, Hers I. Protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of PDE3A regulate cAMP levels in human platelets. *J Biol Chem.* 2009;284:12339-12348.
9. Stroop S, Beavo J. Structure and function studies of the cGMP-stimulated phosphodiesterase. *J Biol Chem.* 1991;266:23802-23809.
10. Turko I, Francis S, Corbin J. Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochem J.* 1998;329:505-510.
11. Hechler B, Gachet C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal.* 2011;7:293-303.
12. Gurbel P, Tantry U. Combination antithrombotic therapies. *Circulation.* 2010;121:569-583.
13. Gresele P, Momi S, Falcinelli E. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72:634-646.
14. Belleville-Rolland T, Sassi Y, Decouture B, et al. MRP4 (ABCC4) as a potential pharmacologic target for cardiovascular disease. *Pharmacol Res.* 2016;107:381-389.
15. Cheepala S, Pitre A, Fukuda Y, et al. The ABCC4 membrane transporter modulates platelet aggregation. *Blood.* 2015;126:2307-2319.
16. Russel F, Koenderink J, Masereeuw R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29:200-207.
17. Sassi Y, Abi-Gerges A, Fauconnier J, et al. Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *FASEB J.* 2012;26:1009-1017.
18. Borgognone A, Pulcinelli F. Reduction of cAMP and cGMP inhibitory effects in human platelets by MRP4-mediated transport. *Thromb Haemost.* 2012;108:955-962.
19. Decouture B, Dreano E, Belleville-Rolland T, et al. Impaired platelet activation and cAMP homeostasis in MRP4-deficient mice. *Blood.* 2015;126:1823-1830.
20. Jedlitschky G, Tirschmann K, Lubenow L, et al. The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules,

- indicating a role in mediator storage. *Blood*. 2004;104:3603-3610.
21. Jedlitschky G, Cattaneo M, Lubenow L, et al. Role of MRP4 (ABCC4) in platelet adenosine nucleotide-storage: evidence from patients with delta-storage pool deficiencies. *Am J Pathol*. 2010;176:1097-1103.
 22. Mattiello T, Guerriero R, Lotti L, et al. Aspirin extrusion from human platelets through multidrug resistance protein-4-Mediated transport: evidence of a reduced drug action in patients after coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:752-761.
 23. Edwards H, Christian F, Baillie G. cAMP: Novel concepts in compartmentalised signalling. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23:181-190.
 24. Fischmeister R, Castro L, Abi-Gerges A, et al. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res*. 2006;99:816-828.
 25. Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*. 2002;295:1711-1715.
 26. Esseltine J, Scott J. AKAP signaling complexes: Pointing towards the next generation of therapeutic targets? *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34:648-655.
 27. Raslan Z, Magwenzi S, Aburima A, Taskén K, Naseem K. Targeting of Type I Protein Kinase A to lipid rafts is required for platelet inhibition by the cAMP-signalling pathway. *J Thromb Haemost*. 2015;13:1721-1734.
 28. Bodin S, Tronchère H, Payrastra B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2003;1610:247-257.
 29. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18:361-374.
 30. Raslan Z, Naseem K. Compartmentalisation of cAMP-dependent signalling in blood platelets: The role of lipid rafts and actin polymerisation. *Platelets*. 2015;26:349-357.
 31. Zhang W, Tribble R, Samelson L. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*. 1998;9:239-246.
 32. Wonerow P, Oberfell A, Wilde J, et al. Differential role of glycolipid-enriched membrane domains in glycoprotein VI- and integrin-mediated phospholipase Cy2 regulation in platelets. *Biochem J*. 2002;364:755-765.
 33. Rabani V, Davani S, Gambert-Nicot S, Meneveau N, Montange D. Comparative lipidomics and proteomics analysis of platelet lipid rafts using different detergents. *Platelets*. 2016;27:634-641.
 34. Nikolaev V, Moshkov A, Lyon A, et al. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science*. 2010;327:1653-1657.
 35. Katsel P, Tagliente T, Schwarz T, Craddock-Royal B, Patel N, Maayani S. Molecular and biochemical evidence for the presence of type III adenylyl cyclase in human platelets. *Platelets*. 2003;14:21-33.
 36. Quinton T, Kim S, Jin J, Kunapuli S. Lipid rafts are required in Gi signaling downstream of the P2Y12 receptor during ADP-mediated platelet activation. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1036-1041.
 37. Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2007;1768:1311-1324.
 38. Gousset K, Wolkers W, Tsvetkova N, et al. Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets. *J Cell Physiol*. 2002;190:117-128.

39. Raslan Z, Aburima A, Naseem K. The spatiotemporal regulation of cAMP signaling in blood platelets—old friends and new players. *Front Pharmacol*. 2015;6:1-8.
40. Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:323-329.
41. Steinberg S, Brunton L. Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:751-773.
42. Burgers P, Ma Y, Margarucci L, et al. A small novel A-kinase anchoring protein (AKAP) that localizes specifically protein kinase a-regulatory subunit I (PKA-RI) to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2012;287:43789-43797.
43. Quinter P, Dangelmaier C, Quinton T, Kunapuli S, Daniel J. Glycoprotein VI agonists have distinct dependences on the lipid raft environment. *J Thromb Haemost*. 2007;5:362-368.

Figure Legends

Figure 1: Determination of lipid raft fractions and distribution of the different players of cAMP signaling pathway

Resting (upper panel) or activated (PAR1-ap 20 μ M, 4 min, 37°C; lower panel) human washed platelets (500 μ l at 10^9 /mL) were lysed in the presence of 0.5% Triton X- 100 and submitted to insoluble lipid raft isolation through ultracentrifugation on sucrose density gradients as described in Materials and Methods. In some experiments, a sample of resting washed platelets was preincubated 30 min with M β CD to disrupt lipid raft domains (middle panel). Twelve fractions were harvested starting from the top of the sucrose density gradient. Proteins from each fraction of the gradient were precipitated by trichloroacetic acid (TCA) and acetone, submitted to PAGE and immunoblotted with specific antibodies directed against LAT (36 kDa), Gi (41 kDa), PKA (48 kDa), MRP4 (150 kDa), AC 3 (130 kDa), PDE3A (125 kDa), PDE2A (100 kDa), moesin (75 kDa) and Gs (46 kDa). Visualization was obtained with Dylight-800 or -680 goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies and then the bands were quantified using the software ImageJ and expressed as the percentage in or outside the raft fractions (right tables; mean \pm SEM). Blots are representative of 10 independent experiments using platelets from 10 donors.

Figure 2: Inhibition of WT and MRP4-deficient platelet aggregation following exposure to M β CD

Washed platelets of WT (empty boxes) and MRP4-deficient mice (plain boxes) were treated with increasing M β CD concentrations for 30 min at 37°C and thereafter incubated with vehicle (left panel) or 1 μ M forskolin (right panel) for 15 sec. Activation was then induced by 100 μ M PAR4-ap. Results are expressed as the percentage of inhibition of platelet aggregation at 120 sec relative to aggregation obtained in the presence PAR4-ap alone ($n \geq 5$).

Figure 3. Quantification of cAMP in resting platelets of WT and MRP4-deficient mice

WT (empty boxes) or MRP4-deficient (hatched boxes) washed platelets were treated with 0.5 mM M β CD or vehicle for 30 min at 37°C. At the end of the incubation, 1 μ M PGE₁ was added for 90 sec. cAMP was quantified either on total unstimulated platelet lysates obtained

by addition of lysis buffer containing 4 mM IBMX and 20 mM EGTA (**A**) or on released fraction obtained by centrifugation (30 sec at 16000 g) of the platelet suspension supplemented with 20 mM EGTA and then collection of supernatants and addition of lysis buffer with IBMX (**B**). cAMP from total lysates (**A**) or supernatants (**B**) was quantified using cAMP Dynamic 2 kit (Cisbio Bioassays). Results are expressed as pmol/10⁹ platelets (n≥7).

Figure 4. Quantification of cAMP in activated platelets of WT and MRP4-deficient mice

WT (empty boxes) or MRP4-deficient (hatched boxes) washed platelets were treated with 0.5 mM MβCD or vehicle for 30 min at 37°C. At the end of the incubation, 1 μM PGE₁ was added. Then, 30 sec later, 400 μM PAR4-ap was added for a further 60 sec. cAMP quantification was performed on total activated platelet lysates as detailed in the legend of Figure 3A. Results are expressed as cAMP pmol/10⁹ platelets (n≥7).

Authors' Contributions

TBR conceived the study, designed and performed research, analysed data and wrote the manuscript.

AL, AM, BD, FM, SC, MR, HG, BD, CBL performed research and, together with DP, revised the manuscript and gave final approval.

CBL and PG conceived the study, designed research, analysed data and wrote the manuscript.

Conflicts of interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank the Promex Stiftung für die Forschung foundation for generous funding. Dominique Pidard is Chargé de Recherche at the Institut National des Sciences du Vivant from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France).

Summary table

A. What is known on this topic?	<ul style="list-style-type: none">- MRP4 is a transporter for cyclic nucleotides- MRP4 localization on platelet dense granules and/or plasma membrane is still a matter of debate- Nothing is known on the presence of MRP4 in lipid rafts
B. What this paper adds?	<ul style="list-style-type: none">- MRP4 is present, at least partly, on platelet plasma membrane- MRP4 is present at 14% in lipid rafts- Most of players of cAMP pathway in platelets are located outside lipid rafts

Figure Legends

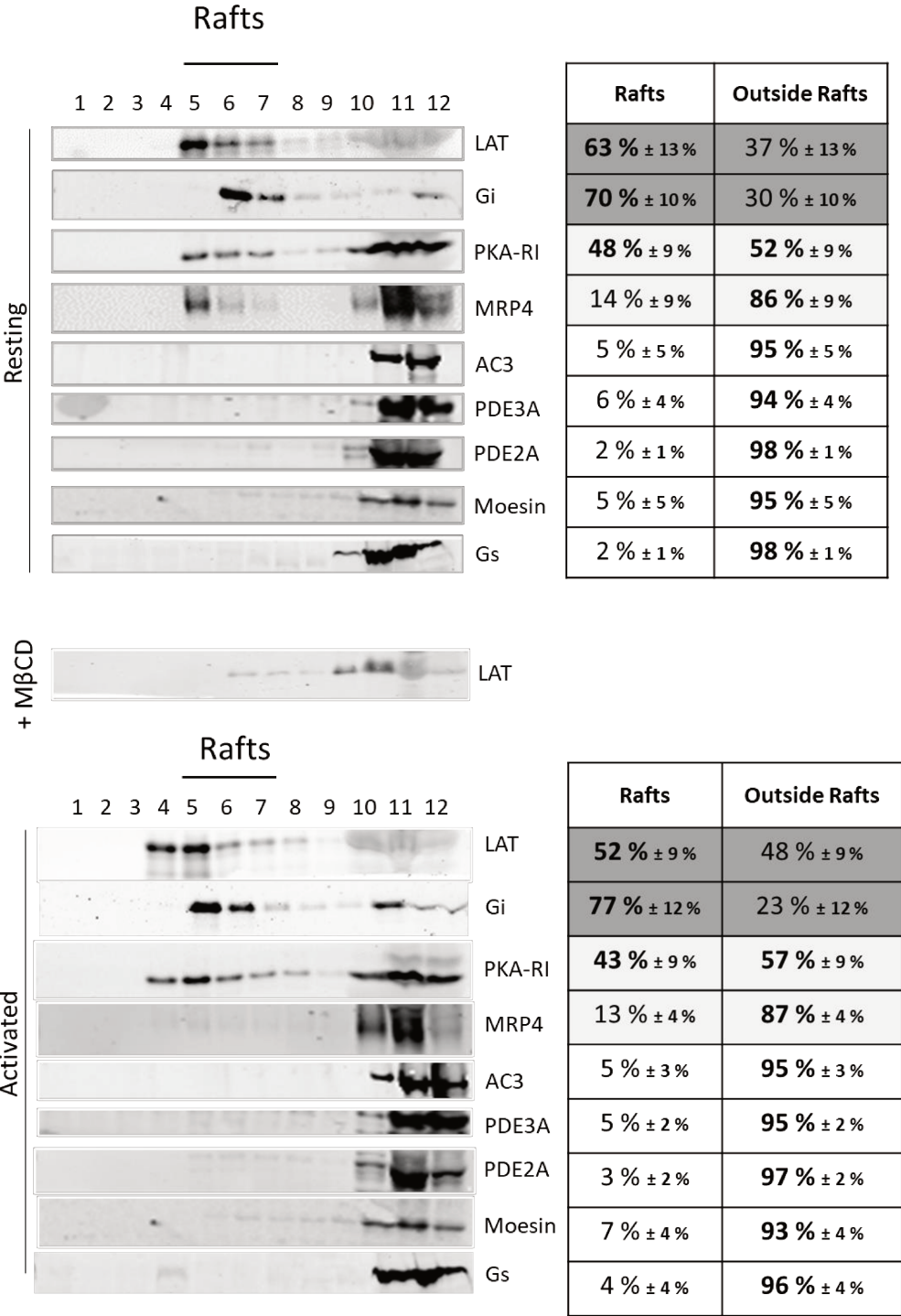


Figure 1: Determination of lipid raft fractions and distribution of the different players of cAMP signaling pathway

Resting (upper panel) or activated (PAR1-ap 20 μ M, 4 min, 37°C; lower panel) human washed platelets (500 μ l at 10^9 /mL) were lysed in the presence of 0.5% Triton X- 100 and submitted to insoluble lipid raft isolation through ultracentrifugation on sucrose density gradients as described in Materials and Methods. In some experiments, a sample of resting washed platelets was preincubated 30 min with M β CD to disrupt lipid raft domains (middle panel). Twelve fractions were harvested starting from the top of the sucrose density gradient. Proteins from each fraction of the gradient were precipitated by trichloroacetic acid (TCA) and acetone, submitted to PAGE and immunoblotted with specific antibodies directed against LAT (36 kDa), Gi (41 kDa), PKA (48 kDa), MRP4 (150 kDa), AC 3 (130 kDa), PDE3A (125 kDa), PDE2A (100 kDa), moesin (75 kDa) and Gs (46 kDa). Visualization was obtained with Dylight-800 or -680 goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies and then the bands were quantified using the software ImageJ and expressed as the percentage in or outside the raft fractions (right tables; mean \pm SEM). Blots are representative of 10 independent experiments using platelets from 10 donors.

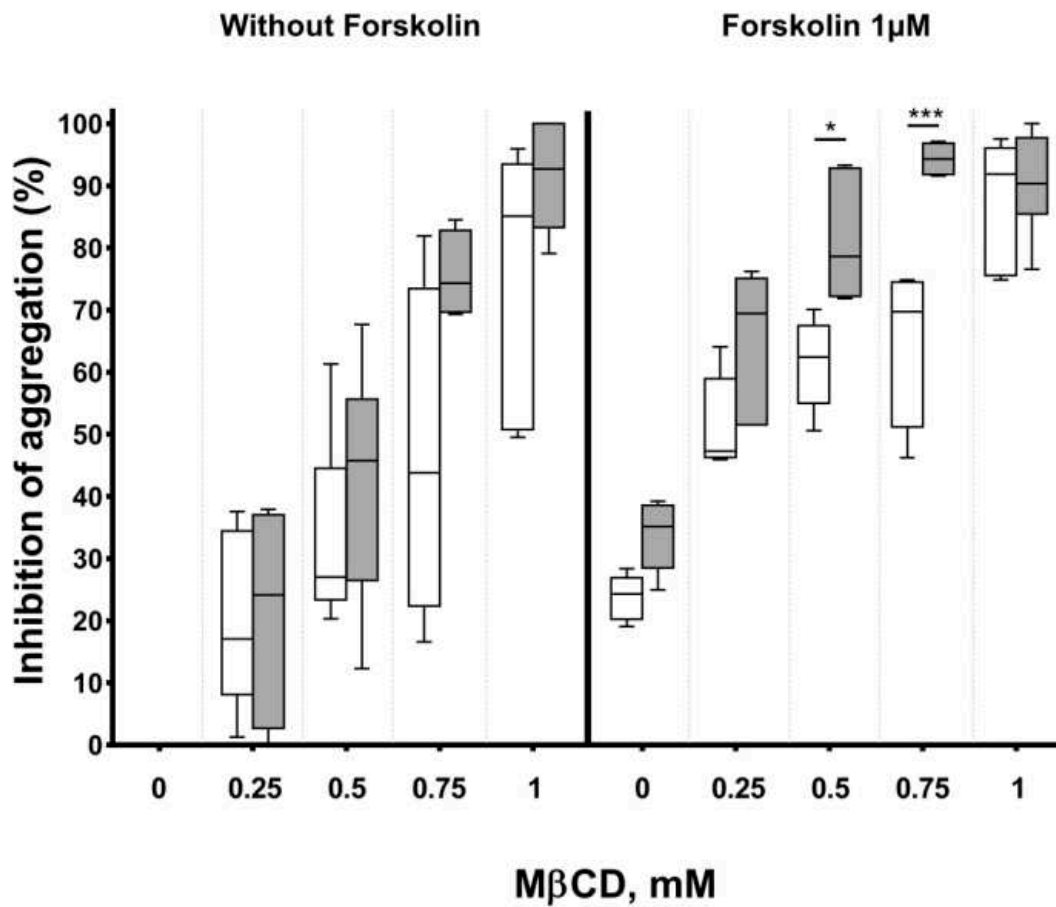


Figure 2: Inhibition of WT and MRP4-deficient platelet aggregation following exposure to MβCD

Washed platelets of WT (empty boxes) and MRP4-deficient mice (plain boxes) were treated with increasing MβCD concentrations for 30 min at 37°C and thereafter incubated with vehicle (left panel) or 1 μM forskolin (right panel) for 15 sec. Activation was then induced by 100 μM PAR4-ap. Results are expressed as the percentage of inhibition of platelet aggregation at 120 sec relative to aggregation obtained in the presence PAR4-ap alone (n≥5).

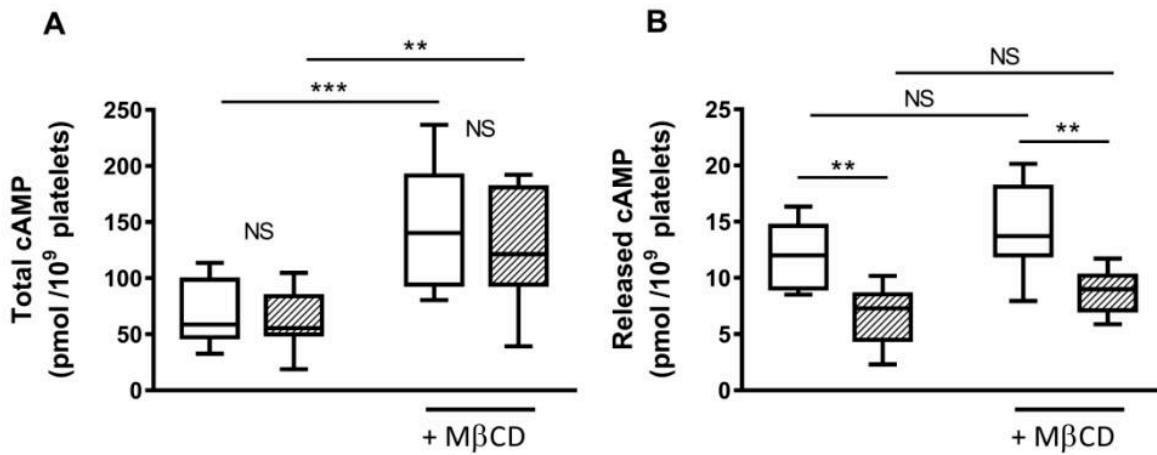


Figure 3. Quantification of cAMP in resting platelets of WT and MRP4-deficient mice

WT (empty boxes) or MRP4-deficient (hatched boxes) washed platelets were treated with 0.5 mM MβCD or vehicle for 30 min at 37°C. At the end of the incubation, 1 μM PGE₁ was added for 90 sec. cAMP was quantified either on total unstimulated platelet lysates obtained by addition of lysis buffer containing 4 mM IBMX and 20 mM EGTA (**A**) or on released fraction obtained by centrifugation (30 sec at 16000 g) of the platelet suspension supplemented with 20 mM EGTA and then collection of supernatants and addition of lysis buffer with IBMX (**B**). cAMP from total lysates (**A**) or supernatants (**B**) was quantified using cAMP Dynamic 2 kit (Cisbio Bioassays). Results are expressed as pmol/10⁹ platelets (n≥7).

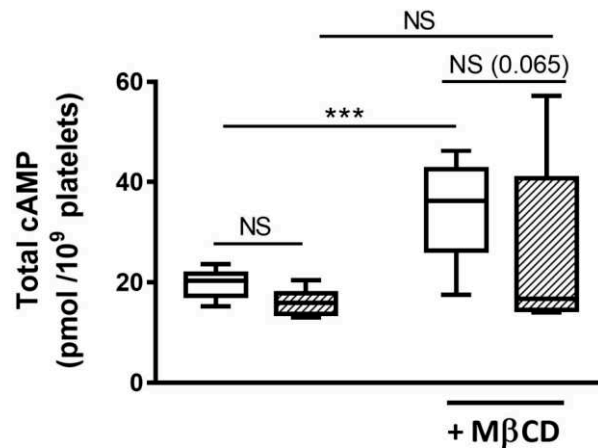


Figure 4. Quantification of cAMP in activated platelets of WT and MRP4-deficient mice

WT (empty boxes) or MRP4-deficient (hatched boxes) washed platelets were treated with 0.5 mM M β CD or vehicle for 30 min at 37°C. At the end of the incubation, 1 μ M PGE₁ was added. Then, 30 sec later, 400 μ M PAR4-ap was added for a further 60 sec. cAMP quantification was performed on total activated platelet lysates as detailed in the legend of Figure 3A. Results are expressed as cAMP pmol/10⁹ platelets (n \geq 7).

Authors' Contributions

TBR conceived the study, designed and performed research, analysed data and wrote the manuscript.

AL, AM, BD, FM, SC, MR, HG, BD, CBL performed research and, together with DP, revised the manuscript and gave final approval.

CBL and PG conceived the study, designed research, analysed data and wrote the manuscript.

Conflicts of interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank the Promex Stiftung für die Forschung foundation for generous funding. Dominique Pidard is Chargé de Recherche at the Institut National des Sciences du Vivant from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France).

Supplementary materials

Animals

MRP4-deficient mice (*Abcc4*^{-/-}, also named MRP4^{-/-}) were originally generated in the laboratory of Dr. John Schuetz (*Abcc4*^{tm1Jsch})¹ and were repeatedly backcrossed to Friend virus B-type (FVB) mice to greater than 99% FVB genetic background. All our experiments compared MRP4^{-/-} mice with age- and gender-matched FVB wild-type (WT) mice (Janvier Labs, France). Anaesthesia was performed by intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) plus xylazine (10 mg/kg). All animal studies were approved by the Ethics Committee on Animal Resources of Paris Descartes University (registration number CEEA34.CBL.131.12)

Mouse platelet preparation

Blood was collected by cardiac puncture into ACD-C. Diluted platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation (170 g for 7 min) of blood diluted in the washing buffer (2V/1V; 36 mM citric acid, 5 mM D-glucose, 5 mM potassium chloride, 2 mM calcium chloride, 1 mM magnesium chloride, 103 mM sodium chloride, pH 6.5) containing 0.03 U/ml apyrase (Agro-bio, France) and 1 μM prostaglandin E₁ (PGE₁, Sigma-Aldrich, France). Washed platelets were prepared by centrifugation (750 g for 10 min) of diluted-PRP further diluted in the washing buffer (1V/1V) containing 1 μM PGE₁ and 0.03 U/ml apyrase. Then, the platelet pellet was resuspended in the washing buffer and centrifuged under the same conditions as above. Finally, platelets were re-suspended in the assay buffer (10 mM HEPES, 140 mM sodium chloride, 3 mM potassium chloride, 5 mM sodium bicarbonate, 0.5 mM magnesium chloride, 10 mM D-glucose buffer, pH 7.35) and adjusted to a platelet count dependent on the experiment to be performed. Calcium chloride 2 mM was then added and experiments were started within half an hour.

Human platelet preparation

Venous blood from informed healthy donors who had not taken any anti-platelet medications in the past two weeks was provided by the French blood bank institute (EFS) under an agreement with the Paris Descartes University (C CPSL UNT N° 12/EFS/064). Venous blood was collected in Vacutainer® tubes (Ozyme, France) containing ACD-A (final concentrations 13 mM citric acid, 12.6 mM sodium citrate, 11 mM D-glucose). Diluted platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation (210 g for 11 min) of blood diluted in washing buffer (3V/1V). Then, washed platelets were prepared by centrifugation (1240 g for 12 min) of diluted PRP

containing 0.2 μM PGE₁ and 0.06 U/ml apyrase. The platelet pellet was resuspended in the washing buffer and centrifuged under the same conditions as above. Finally, platelets were re-suspended in the assay buffer and adjusted to a platelet count dependent on the experiment to be performed. Calcium chloride 2 mM was then added and experiments were started within half an hour.

Exposure of washed platelets to the cholesterol-depleting drug M β CD

Cholesterol depletion of resting platelet membranes was obtained by exposing cells to the compound methyl- β -cyclodextrine (M β CD, Sigma Aldrich), essentially as previously described². M β CD stock solution (40 mM in distilled water) was diluted extemporaneously into assay buffer and maintained at 37°C until use. Washed human or mouse platelets maintained at room temperature were incubated for 30 min at 37°C with assay buffer alone or with various concentrations of M β CD in the range 0.25 to 1 mM aggregation assays by adding to platelet suspensions a one-tenth volume of tenfold concentrated solutions of M β CD. M β CD solutions were gently mixed with platelets. All experiments described below were started exactly after 30 min incubation, and after control of the absence of spontaneous activation by checking that platelet suspensions have retained a swirling appearance.

Isolation of membrane lipid rafts and Immunoblot analysis

Resting or activated (PAR1-ap 20 μM for 4 min at 37°C under stirring) human washed platelets (500 μl at 10⁹/mL) were lysed on ice for 30 min in lysis buffer (1V/1V; 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 30 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium glycerophosphate, 0.01% sodium azide, 0.5% (v/v) Triton X-100, 1 mM sodium vanadate, protease and phosphatase inhibitor cocktails, pH = 8, final concentrations in platelet lysate), then an equal volume of an ice-cold 80% (w/v) sucrose solution was added³. Samples were placed at the bottom of ultracentrifuge tubes (Beckman, France) and overlaid with 6 ml of a 30% sucrose solution and finally 6 ml of a 5% sucrose solution, and then were ultracentrifuged at 4°C for 18 h at 200,000 g in a SW41 rotor (Beckman, France). After centrifugation, twelve 1-ml fractions were collected manually from the top to the bottom of the gradients.

For protein content analysis, each fraction was incubated at 4°C for 30 min with 100% trichloroacetic acid (20V/1V). Precipitated proteins were pelleted by centrifugation at 16,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was discarded, then ice-cold acetone was added to the protein pellet and the mixture was centrifuged again. The supernatant was discarded, and the

pellet was air-dried, then resuspended in 60 μ L of NuPAGE 1X electrophoresis sample buffer (Invitrogen, USA). Proteins were separated by PAGE on precast 3-8% polyacrylamide gradient gels (Invitrogen), then transferred to nitrocellulose membranes, which were blocked with 5% skimmed milk prepared in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST), and then incubated with primary antibodies. Mouse anti-moesin mAb (ab52490) and rat anti-MRP4 mAb (Ab15602) were purchased from Abcam (UK), rabbit anti-LAT pAb (#06-807) was from Upstate (USA), rabbit anti-PKA-RI pAb (#39275) from Cell Signaling Technology (USA), rabbit anti-AC3 pAb (PA5-72985) from Invitrogen, rabbit anti-PDE3A pAb (HPA014492) from Sigma, rabbit anti-Gi pAb (PA5-27520) from Sigma, rabbit anti-Gs pAb (HPA018122 from Merck) and rabbit anti-PDE2A pAb (ABN1486) from Millipore. Secondary labelling was obtained with Dylight-800-coupled or Dylight680-coupled goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Invitrogen), and detection of the fluorescent signals was obtained using an Odyssey CLx Imager (LI-COR Biotechnology – GmbH, Germany).

For each protein, bands contained in the various fractions were selected and quantified using the software ImageJ. For the fractions corresponding to the location of 0.5% Triton X-100-insoluble lipid rafts in the sucrose gradient, intensities of bands were summed and expressed as the percentage of the intensity of all bands, corresponding to 100% of the protein. The same was done for the non-raft fractions. The measure was done in resting platelets in the presence or in the absence of M β CD as well as in activated platelets.

Platelet aggregation studies

Immediately at the end of incubation with vehicle alone (assay buffer) or M β CD, platelet suspensions were added in wells (45 μ L per well of a 96-well half-area flat bottom microplate; Greiner Bio-One, Dutscher, France) prewarmed at 37°C and incubated for 2 min under stirring in a microplate reader set at 37°C (MWGt Discovery HT-R reader, Germany, controlled by the software KC4TM, BIO-TEK, USA). Aggregation was then induced by adding 5 μ L of PAR4-ap at 100 μ M (Bachem, Germany), and was monitored for 5 min. Extent of platelet aggregation was expressed as the percentage of maximal aggregation calculated as the change in absorbance at 405 nm relative to the absorbance in resting condition and after full platelet aggregation obtained with 100 μ M PAR4-ap.

For some experiments, platelets in microplate wells were incubated for 15 sec with forskolin (Sigma Aldrich) immediately before adding PAR4-ap.

Platelet cAMP measurement

cAMP was quantified in mouse washed platelet (resuspended at 10^9 platelets/ml) with the cAMP Dynamic 2 kit (Cisbio Bioassays, France), a competitive immunoassay based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer between the fluorescent reporters cAMP-d2 and anti-cAMP-cryptate. Assays were performed either on total platelet suspension lysates or on platelet suspension extracellular supernatants. Platelets were first incubated for 30 min at 37°C with vehicle or with M β CD 0.5 mM. Immediately after, platelets were incubated with 1 μ M PGE₁ for 30 sec and then for 1 min either with assay buffer or with 400 μ M PAR4-ap. For total platelet suspension lysates, platelet activation was stopped by adding an equal volume of ice-cold cAMP lysis buffer (containing 4 mM IBMX for blocking PDE activity and 20 mM EDTA), followed by an immediate centrifugation at 16,000 g for 30 sec at 4°C to discard insoluble fraction. For platelet suspension supernatants, platelet activation was stopped by adding ice-cold 20 mM EGTA, and the platelets were discarded by immediate centrifugation (16,000 g for 30 sec at 4°C). The supernatant was immediately removed and an equal volume of lysis buffer containing 4 mM IBMX was added to homogenise the composition of all the samples before cAMP measurement assay. All the samples were stored à -80° until cAMP assay was performed. For assay, samples were thawed at room temperature and transferred to flat bottom 384-well microplates (Greiner Bio-One, Dutscher, France) before adding cAMP-d2 and anti-cAMP-cryptate. Each condition was assayed in triplicate. Incubation for 1 h at room temperature was followed by a 1 min centrifugation at 1,730 g. The plates were read out with a FlexStation® 3 (Molecular Devices, USA). Data processing and quantification of cAMP were performed according to the manufacturer's instructions. cAMP levels were reported as pmol/ 10^9 platelets.

Statistical analysis

All data were expressed as median [min-max]. Distribution of data was tested for normality. Group comparisons were made using one-way and two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons test. Prism 7 (GraphPad Software Inc, USA) was used for all statistical analysis.

References

1. Leggas M, Adachi M, Scheffer G, et al. Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Mol Cell Biol.* 2004;24:7612-7621.

2. Bodin S, Tronchère H, Payrastre B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2003;1610:247-257.
3. Raslan Z, Naseem K. Compartmentalisation of cAMP-dependent signalling in blood platelets: The role of lipid rafts and actin polymerisation. *Platelets.* 2015;26:349-357.

Discussion du manuscrit

Répartition des acteurs de la voie de l'AMPc. Dans le but de caractériser les microdomaines à AMPc et leur présence potentielle dans les radeaux lipidiques, nous avons recherché la présence des acteurs de la voie de l'AMPc après ultracentrifugation de préparations de plaquettes lavées humaines sur un gradient de sucrose. Le gradient nous a permis d'isoler les radeaux lipidiques des membranes plaquettaires comme le montre l'enrichissement de la protéine LAT dans les fractions intermédiaires (fractions 5, 6 et 6) et sa disparition de ces fractions lors de la pré incubation des plaquettes avec la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD), molécule déstabilisant les radeaux lipidiques membranaires par déplétion du cholestérol.

L'étude par immunoempreinte des fractions provenant du gradient de sucrose, indique une répartition non homogène des acteurs de la voie de l'AMPc dans ou hors des radeaux lipidiques. En effet, nous identifions les protéines Gi et PKA-RI comme étant majoritairement retrouvées dans les radeaux lipidiques (> 70 %) alors que les autres acteurs de la voie, AC3, PDE3A, PDE2A et Gs sont majoritairement retrouvées hors de ces radeaux lipidiques (> 90 %). Nos résultats montrent qu'une faible, mais significative, fraction de la protéine d'efflux de l'AMPc (15 %), MRP4, est présente dans les radeaux lipidiques. L'activation plaquettaire par le Par1-ap ne modifie pas la répartition des acteurs de la voie de l'AMPc au sein des radeaux lipidiques.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Raslan *et al.* 2015. En effet, dans cette étude effectuée à partir de plaquettes au repos, les auteurs montrent la présence de PKA-RI dans les fractions de densités intermédiaires, fractions dans lesquelles sont localisés les radeaux lipidiques. Par ailleurs, les auteurs montrent la présence de l'AC 5/6 et l'absence des récepteurs IP au sein de ces mêmes radeaux lipidiques. La présence de l'AC 5/6 reste cependant sujet à controverse ; en effet la présence de cette AC n'est pas unanimement reconnue dans les plaquettes et l'emploi, au sein de notre groupe, de l'anticorps dirigé contre l'AC 5/6, utilisé dans l'étude précitée, ne nous permet pas d'assurer la spécificité de l'anticorps au sein des plaquettes comme en témoigne la présence de multiples bandes révélées après immunoempreinte de lysats totaux de plaquettes (résultats non montrés).

Le groupe de Raslan *et al.* observe la présence d'une partie de l'AKAP moésine dans les fractions intermédiaires et retrouvent la sous-unité RI de PKA immunoprécipitée avec la moésine. A partir de ces deux résultats, les auteurs émettent l'hypothèse que la moésine serait responsable de la localisation de PKA-RI dans les rafts. Cependant, leurs immunoempreintes révèlent que la quantité de moésine présente dans les radeaux lipidiques ne représente qu'une très faible fraction de la moésine totale. De même, nos résultats montrent que la moésine est quasi absente des radeaux lipidiques (5%)

ce qui suggère que celle-ci ne serait pas la seule AKAP intervenant dans la localisation de PKA retrouvée à hauteur de 45 % au niveau de ces structures.

La faible présence de la moésine dans les radeaux lipidiques implique une conception de l'organisation de la voie de l'AMPc structurée autour d'une AKAP différente. Une seconde AKAP devrait alors être présente et jouer le rôle de protéine d'ancrage pour PKA-RI identifiée dans les radeaux lipidiques dans nos travaux. Parmi les nouvelles protéines identifiées au sein des plaquettes, il a été récemment mis en évidence la présence d'une nouvelle famille d'AKAP que sont les petites AKAP (smAKAP), candidat potentiel à la localisation de PKA-RI dans les radeaux lipidiques, qu'il conviendra d'analyser par la suite.

Implication des radeaux lipidiques dans la voie de l'AMPc. Afin d'étudier l'impact des radeaux lipidiques membranaires dans la réactivité plaquettaire, nous avons mesuré l'agrégation plaquettaire et le taux d'AMPc dans des conditions natives et dénaturantes vis-à-vis de ces structures. Les plaquettes de souris pré-incubées avec des doses croissantes de M β CD montrent une inhibition de l'agrégation dose dépendante.

A la dose de 0,5 mM, le M β CD n'induit pas par lui-même d'augmentation du taux de l'AMPc ou d'augmentation de l'AMPc libéré hors des plaquettes au repos. Ce n'est qu'en présence d'un agent activateur de la voie de l'AMPc (FSK ou PGE-1) que le M β CD induit une augmentation du taux d'AMPc supérieure à celle de l'activateur incubé seul et ce sans induire une augmentation de la quantité d'AMPc efflué hors des plaquettes. Une augmentation de l'AMPc, induite par le M β CD incubé avant un agent activateur de la voie de l'AMPc, est également observée après activation plaquettaire au Par-4ap.

L'augmentation de l'AMPc dans les plaquettes au repos incubées avec du M β CD semble indiquer que la présence des radeaux lipidiques est nécessaire pour contrôler le taux d'AMPc. La régulation du taux de l'AMPc peut être assurée par la protéine Gi (identifiée dans les radeaux lipidiques), avec un rôle inhibiteur sur l'AC, rôle qui serait diminué lors de la déstructuration des radeaux lipidiques permettant une augmentation de la production de l'AMPc.

Implication de la protéine MRP4 dans la voie de l'AMPc et dans les radeaux lipidiques. Afin d'étudier l'impact de la déstructuration des radeaux lipidiques membranaires sur l'activité de MRP4 interférant sur l'homéostasie de l'AMPc, nous avons utilisé des souris dépourvues de MRP4 (MRP4 -/-). Les plaquettes témoins et MRP4 -/- ne présentent pas de différence d'augmentation de l'AMPc total après stimulation à la PGE-1 et l'incubation de 0,5 mM M β CD en présence de PGE-1 induit une augmentation similaire de l'AMPc entre les deux groupes. Le dosage révèle cependant un efflux de l'AMPc hors de la plaquette au repos incubée en présence de PGE-1. Cet efflux est significativement moins important

quand MRP4 est absent, ce qui démontre que MRP4 participe en partie à la libération basale d'AMPC. La destruction des radeaux lipidiques ne semble pas modifier cet efflux d'AMPC dépendant de MRP4 ce qui suggère que l'efflux de MRP4 serait indépendant des radeaux lipidiques. Lors de l'activation plaquettaire, la préincubation de 0,5 mM M β CD en présence de PGE-1 induit une inhibition de l'agrégation plaquettaire plus importante pour les plaquettes des souris MRP4 $-/-$ que pour les plaquettes contrôles et ce malgré un taux d'AMPC total similaire entre ces deux modèles.

Ceci suggère que l'AMPC présent dans les plaquettes MRP4 $-/-$ est plus actif in situ. Ceci pourrait s'expliquer par une répartition intraplaquettaire de l'AMPC différente au sein des plaquettes témoins et MRP4 $-/-$. Ainsi, dans les plaquettes témoins, grâce à l'activité de MRP4, l'AMPC serait en partie à l'intérieur de compartiment de stockage en particulier les granules denses (Jedlitschky et al. 2004), et l'absence de MRP4 serait à l'origine d'une désorganisation de cette homéostasie avec une augmentation du taux cytoplasmique de l'AMPC où il exprimerait son effet inhibiteur.

Discussion. Au vu de la répartition des acteurs de la voie de l'AMPC selon les immunoempreintes de Raslan *et al* et les nôtres, nous pouvons émettre l'hypothèse de l'existence d'au moins deux modèles d'organisation de la voie de l'AMPC comme proposé dans l'article de Conti *et al.* 2014. Le premier modèle sous forme de microdomaines, localisé hors des radeaux lipidiques, présente la voie de synthèse de l'AMPC avec la protéine Gs qui stimule l'AC3, l'effecteur principal de l'AMPC, PKA, la voie de métabolisation représentée par les PDE3A et 2A. Ce premier modèle de microdomaine serait alors compatible avec le modèle de compartiment métabolique, d'où l'AMPC ne diffuse pas, ce qui engendrerait une réponse inhibitrice de l'AMPC localisée aux protéines membranaires présentes au sein de ce microdomaine. Les travaux de Raslan *et al.* 2015 suggèrent également la présence du récepteur IP hors des radeaux lipidiques plaquettaire. La présence d'IP au sein de ces microdomaines AMPC compléterait ainsi la voie de signalisation de l'AMPC, voie qui serait activée par la PGI-2 produite par l'endothélium (Figure 29).

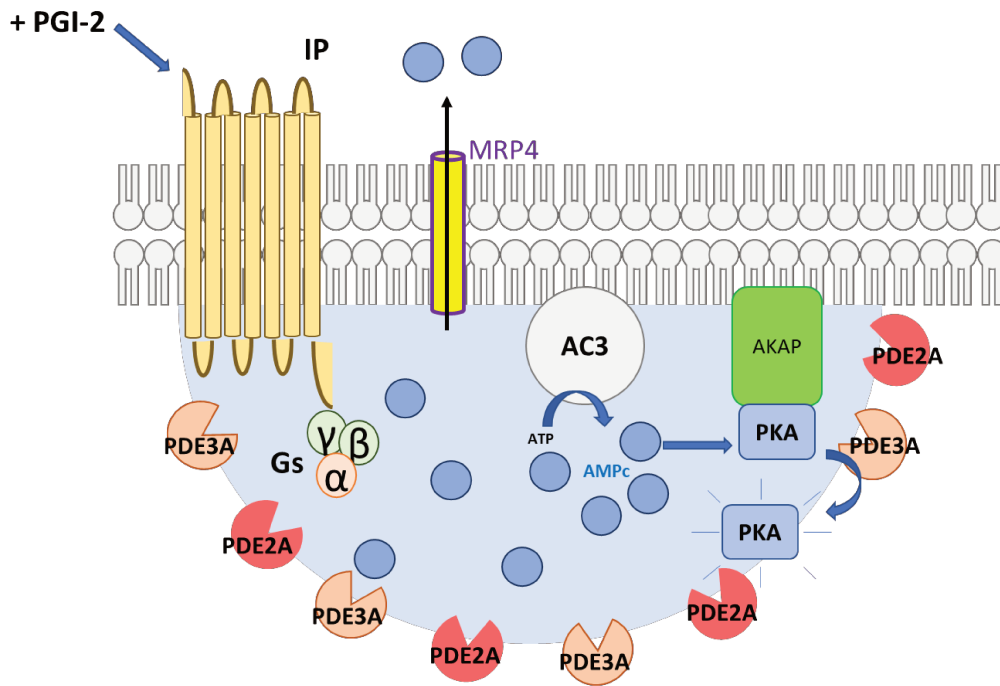


Figure 29. Hypothèse de l'organisation de la voie de l'AMPc en microdomaines. Au sein du microdomaine, la stimulation du récepteur IP par la PGI-2 induit l'activation de l'AC3 via la protéine Gs. S'ensuit la production de l'AMPc qui ne peut pas diffuser hors de l'espace métabolique matérialisé par les PDE 2A et 3A. L'AMPc agit alors au sein du microdomaine où il active son effecteur principal PKA.

La deuxième organisation de la voie de l'AMPc, possiblement présente dans les radeaux lipidiques serait composée de la synthèse de l'AMPc avec l'AC5 (si sa présence plaquettaire est confirmée), d'une fraction de son effecteur principal PKA, de la modulation de sa production par la protéine Gi. L'absence de PDEs au sein des radeaux lipidiques est compatible avec le modèle de production de l'AMPc à la membrane plasmique. Les principaux acteurs de la voie de l'AMPc, dont AC, permettrait une production de l'AMPc depuis les radeaux lipidiques avant sa diffusion et activation de PKA, les PDEs seraient alors localisées autour des effecteurs de PKA au niveau sous membranaire pour réguler la réponse intraplaquettaire de l'AMPc. La question de savoir quels récepteurs pourraient stimuler la protéine Gi au sein des radeaux lipidiques se pose et sa réponse est nécessaire pour compléter le deuxième modèle. Nos travaux initiaux ne permettent pas d'identifier les récepteurs couplés à la protéine Gi au sein des radeaux lipidiques et c'est le groupe de Quinton *et al* 2005 qui identifie les récepteurs P2Y12 au sein des radeaux lipidiques plaquettaires (Quinton et al. 2005). La présence de ces récepteurs, inclus dans les radeaux lipidiques, permet de compléter le modèle avec la stimulation de la protéine Gi, par les récepteurs P2Y12 à l'ADP, induisant la régulation négative de l'AC et la baisse de la production d'AMPc, baisse d'AMPc qui est observée suite à l'activation plaquettaire.

Nous pouvons émettre l'hypothèse, construite sur l'organisation de la voie de l'AMPC à la membrane, qu'en condition native, c'est-à-dire en présence des radeaux lipidiques, l'AC5 produirait de l'AMPC qui activerait PKA présent dans et hors des radeaux lipidiques et jouerait ainsi son rôle inhibiteur plaquettaire et ce ne serait qu'au cours de l'activation plaquettaire que la protéine Gi serait activée par un récepteur inclus dans les radeaux lipidiques, aboutissant à l'inhibition de l'AC5, limitant la production de l'AMPC et son effet inhibiteur. Une telle organisation est également compatible avec l'observation de la baisse de l'AMPC après activation plaquettaire (Figure 30).

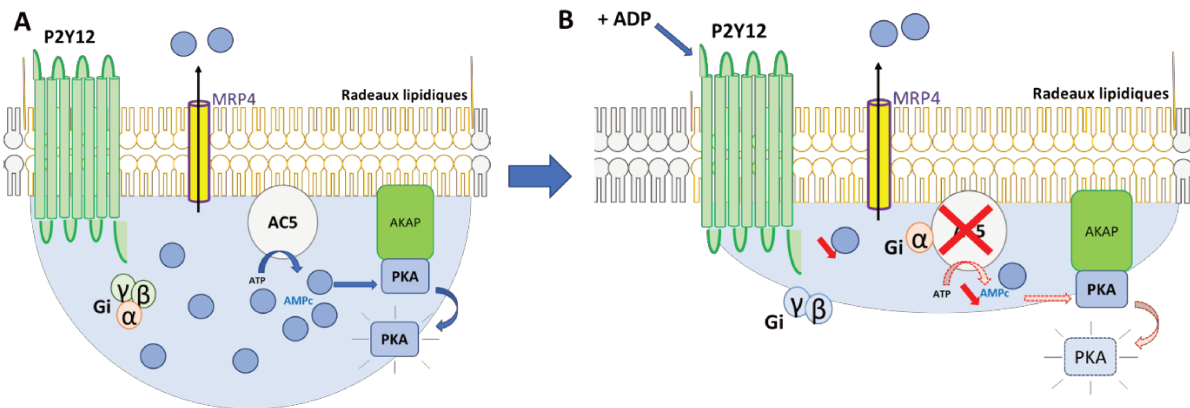


Figure 30. Hypothèse de l'organisation de la voie de l'AMPC au sein des radeaux lipidiques. En conditions natives au repos (A), l'AMPC, produit par l'AC5, diffuse et peut : 1/ être efflué hors des plaquettes par MRP4, 2/ activer son effecteur PKA ou diffuser dans le cytoplasme. Au cours de l'activation plaquettaire à l'ADP (B), la protéine Gi couplé au récepteur P2Y12 inhibe l'AC5 et induit une baisse de la production de l'AMPC.

En condition dénaturante des radeaux lipidiques, par ajout de M β CD, la stimulation plus importante de la voie de l'AMPC par la PGE-1 pourrait s'expliquer par le fait que la déstructuration des radeaux lipidiques entraîne une levée de l'inhibition de Gi sur l'AC5, au repos comme au cours de l'activation plaquettaire, induisant une plus grande synthèse de l'AMPC qui pourrait stimuler le pool de PKA à proximité et/ou diffuser dans le cytosol et ainsi atteindre l'ensemble des PKA, limitant ainsi l'activation et l'agrégation plaquettaire (Figure 31).

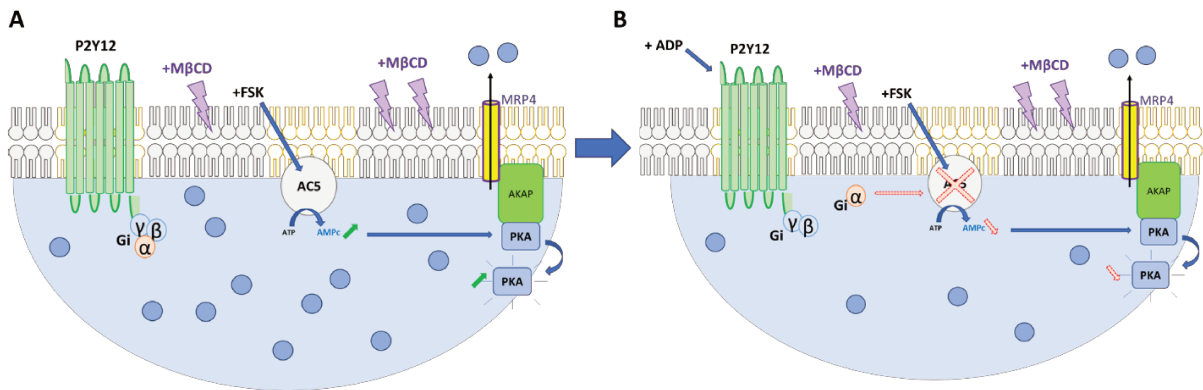


Figure 31. Hypothèse de l'organisation de la voie de l'AMPc au sein des radeaux lipidiques en conditions dénaturantes au repos et au cours de l'activation plaquettaire. La déstructuration des radeaux lipidiques induit une baisse de l'inhibition de l'AC5 par la protéine Gi ce qui aboutit à une augmentation du taux d'AMPc. Au cours de l'activation de plaquettes incubées avec du MβCD, l'inhibition de l'AC5 par la protéine Gi ne serait pas complète, ce qui aboutirait à un taux d'AMPc plus élevé qu'au cours de l'activation plaquettaire sans MβCD.

La caractérisation de ces modèles doit se poursuivre avec l'identification de récepteurs pouvant activer l'AC5 au sein des radeaux lipidiques afin d'aboutir à un modèle comportant l'activation et la régulation de la synthèse de l'AMPc. Cependant quelques limitations techniques ralentissent l'étude des microdomaines :

- 1) la possibilité technique d'étudier l'AMPc en temps réel à l'aide d'imagerie cellulaire afin de suivre l'évolution des concentrations et de visualiser les microdomaines,
- 2) la possibilité d'isoler des radeaux lipidiques fonctionnels provenant d'un compartiment précis (membrane plasmique, granulaire) afin de définir le rôle de chacun d'entre eux et
- 3) l'existence d'anticorps spécifiques vis-à-vis de protéines d'intérêt au sein des plaquettes.

Malgré ces limitations, l'accumulation d'arguments indirects permet d'être en faveur de l'hypothèse d'une organisation de la voie de l'AMPc en microdomaines, reliées ou non aux radeaux lipidiques, au sein des plaquettes.

Chapitre 2 : Evaluation of commonly used tests to measure the effect of single-dose aspirin on mouse hemostasis

Benoit Decouture, **Alexandre Leuci**, Blandine Dizier, Tiphaine Belleville-Rolland, Alexandre Mansour, Fanny Martina, Dominique Pidard, Pascale Gaussem, Christilla Bachelot-Loza

Publié dans PLEFA 2019, 149.

Introduction

Utilisée à faible dose, l'aspirine (ASA) est capable de limiter la mortalité vasculaire et de prévenir la survenue d'évènements cardiovasculaires occlusifs de type accidents vasculaires cérébraux ou cardiaques. L'ASA est un acide faible, qui dans les 30 minutes après ingestion par voie orale, inhibe la COX plaquettaire dans la circulation portale. Cette inhibition induit une baisse de la production des thromboxanes (TXA₂) suite à l'activation plaquettaire induite par les agonistes primaires tels que le collagène ou la thrombine, activation également amplifiée par l'ADP sécrété.

L'ASA, en acétylant la sérine 529 induit une inhibition irréversible de la COX1. Il faut attendre le renouvellement des plaquettes par les mégacaryocytes pour retrouver une synthèse plaquettaire de TXA₂, soit 7 à 10 jours chez l'Homme et 4 à 6 jours chez la souris. Bien que l'ASA ait démontré son efficacité, il existe dans la population des cas de résistances pharmacologiques à l'ASA qui entraînent une mauvaise inhibition des plaquettes et un risque de récurrence de thrombose.

Depuis quelques années, divers travaux suggèrent une corrélation entre la résistance à l'ASA et l'augmentation de l'expression de la protéine d'efflux qu'est MRP4. En effet, au cours d'une exposition supérieure à 2 semaines à l'ASA, il est retrouvé chez des patients une augmentation de l'expression plaquettaire de MRP4. Par ailleurs, chez des patients résistants à l'ASA, l'inhibition *in vitro* de leur MRP4 est reliée à une accumulation intraplaquettaire de l'ASA. L'augmentation de MRP4 semblent être retrouvée au sein de progéniteurs et de lignées mégacaryocytaires mis en culture avec de l'ASA avec une augmentation de l'ARNm et de l'expression de la protéine au bout quelques jours.

Bien que sa pharmacologie en clinique soit documentée, l'utilisation de l'ASA dans les études fondamentales et précliniques varie grandement d'un groupe à l'autre, tant par la dose administrée que par la voie d'administration. En effet, l'analyse d'une trentaine de publications étudiant l'effet de l'administration d'ASA sur l'hémostase (thrombose, saignement et inhibition plaquettaire) révèle une grande disparité de méthode. La majeure partie des études administre l'ASA par voie sanguine (I.V.) (24 études) puis par ordre décroissant par injection intra péritonéale (I.P.) (6 études), par voie orale (P.O.) (4 études) et enfin par injection intra musculaire (I.M.) (3 études) (Figure 31).

La dose est également un facteur important de disparité et ce toutes voies confondues, les doses utilisées allant de 1 à 100 mg/Kg/jour et aucune n'apparaît privilégiée. Chaque voie d'administration possède des propriétés pharmacocinétiques qui lui sont propres, ce qui rend hasardeuse la comparaison d'une étude utilisant la même dose mais par voie d'administration différente.

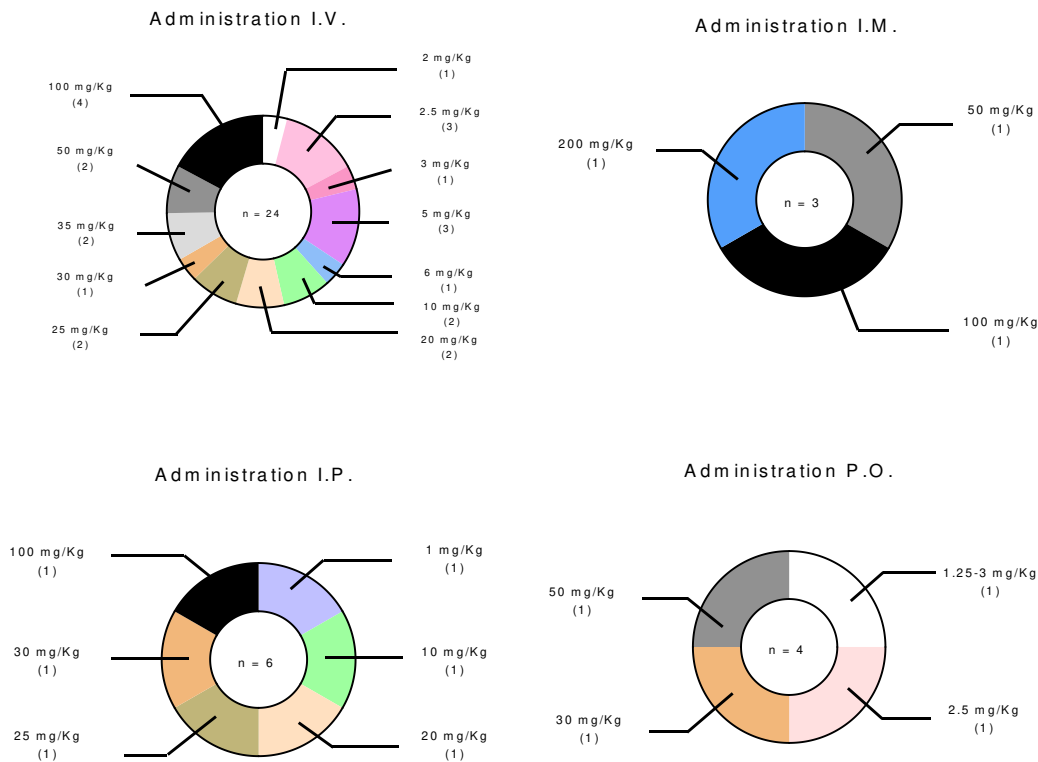


Figure 32. Répartition de la dose d'aspirine administrée selon la voie d'administration. La voie I.V. représente la voie la plus utilisée pour l'étude de l'aspirine *in vivo* bien qu'aucune dose ne semble privilégiée dans les études de l'effet plaquettaire de l'aspirine.

La première partie de notre étude a donc consisté à définir la voie d'administration et la dose les plus adaptées pour l'étude de l'effet de l'ASA à long terme sur l'activation plaquettaire. Pour ce faire, nous avons comparé les voies I.P. et P.O. (Article présenté ci-dessous). Ce travail a permis de définir la voie d'administration, la dose ainsi que le temps d'incubation les plus adéquats pour obtenir une inhibition reproductible des fonctions plaquettaires. Cette étude préliminaire a ainsi permis de définir les bases de l'étude principale qui concerne la relation entre MRP4 et la résistance à l'aspirine. Ce projet en cours de réalisation consistera à étudier l'impact d'une administration quotidienne durant 4 jours d'ASA chez la souris afin de rechercher la possible surexpression de MRP4 et consécutivement l'impact de cette surexpression sur l'activité des plaquettes et la résistance à l'aspirine.

Manuscrit



Original research article

Evaluation of commonly used tests to measure the effect of single-dose aspirin on mouse hemostasis



Benoit Decouture^{a,1}, Alexandre Leuci^{a,1}, Blandine Dizier^a, Tiphaine Belleville-Rolland^{a,b}, Alexandre Mansour^a, Fanny Martin^a, Dominique Pidard^a, Pascale Gaussem^{a,b,*,2}, Christilla Bachelot-Loza^{a,2}

^a Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, F-75006 Paris, France

^b Service d'Hématologie Biologique, AH-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Aspirin
Hemostasis
Platelets
Preclinical study
Thrombosis

ABSTRACT

Discrepancies in preclinical studies of aspirin (ASA) antiplatelet activity in mouse models of bleeding and arterial thrombosis led us to evaluate commonly reported methods in order to propose a procedure for reliably measuring the effects of single dose ASA on mouse hemostasis.

FVB and C57Bl6 mice received 100 mg/kg of ASA or vehicle orally 30 min or 3 h prior to investigate either hemostasis using the tail bleeding assay or carotid thrombosis induced by FeCl₃, or to blood sampling for isolated platelet aggregation and TXB₂ generation.

Expected inhibition of COX1 by ASA was ascertained by a strong decrease in TXB₂ production, and its effect on platelet function and hemostasis, by decreased collagen-induced aggregation and increased bleeding time, respectively. Strikingly, we determined that anti-hemostatic effects of ASA were more predictable 30 min after administration than 3 h later. Conversely, ASA did not alter time to arterial occlusion of the carotid upon FeCl₃-induced thrombosis, suggesting ASA not to be used as reference inhibitor drug in this model of arterial thrombosis.

1. Background

Acetyl salicylic acid (ASA or aspirin) at low dose is broadly used for its antiplatelet effect in primary and secondary prevention of cardiovascular diseases [1]. ASA irreversibly acetylates the Ser529 residue of COX1, thereby leading to a steric hindrance of the COX channel that prevents access of the substrate to the catalytic site of the enzyme [2]. COX1 is responsible for the conversion of arachidonic acid into prostaglandins, that are precursors of thromboxane A₂ (TXA₂) in platelets [3]. By binding the thromboxane and prostanoid receptor (TP receptor), platelet-secreted TXA₂ enhances platelet activation initially triggered by agonists such as collagen. By limiting one major amplification pathway of platelet activation [4], ASA is therefore a relevant comparator for preclinical studies of antiplatelet agents under development.

Interestingly, whereas ASA pharmacology is well known in humans, its antiplatelet activity is inconsistently described in mouse models. The discrepancies between studies, such as inconsistent effects on mouse

arterial thrombosis or bleeding time, could be the consequence of differences regarding the animal strain, the route of administration and ASA doses, as well as the hemostatic parameters evaluated *in vivo* and *ex vivo*. Doses most frequently found in the literature may vary from 1 to 100 mg/kg, given as single or repeated doses [5–10]. Various routes are also reported: intravenous, oral, intraperitoneal or subcutaneous. Whereas the most used bleeding model is the tail-tip transection, arterial thrombosis models in use are more diverse. Indeed, arterial thrombosis of carotid, cremaster or mesenteric artery may be induced by FeCl₃, laser or mechanical injury [11]. Finally, the delay of testing the effect of ASA after administration may vary from 10 min to 24 h after administration [7,9,12].

2. Objectives

Starting from commonly used experimental conditions concerning delivery of ASA and testing its antiplatelet effects in mice, our aim was

* Corresponding author at: Inserm UMR_S1140, Faculté de Pharmacie, 4 av de l'Observatoire, F-75006 Paris, France.

E-mail address: pascale.gaussem@aphp.fr (P. Gaussem).

¹ These authors equally contributed to the work.

² PG and CBL share equal senior authorship.

to determine a procedure for reliably measuring the effects of single dose ASA on mouse hemostasis.

3. Methods

3.1. Animals

FVB and C57Bl6 (C57BL/6NRj) mice (males, 8–12 weeks old; weight 27.6 gr \pm 2.3, mean \pm SD) were from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Anesthesia was induced by intraperitoneal injection of 80 mg/kg ketamine (Clorketam® 1000, Vetoquinol, Lure, France) and 10 mg/kg xylazine (Rompun® 2%, Bayer, La Garenne-Colombe, France), or with 2.5% inhaled isoflurane (Vetflurane®, Virbac, Carros, France) when performing tail bleeding time experiments. ASA (DL-lysine acetylsalicylate, Aspegic®, Sanofi-Aventis, Gentilly, France) dissolved in distilled water was administered orally by force-feeding or by intraperitoneal (i.p.) injection (100 mg/kg, 10 μ l/gr). In vivo experiments were done by an observer blinded to the treatment group. All animal studies were approved by the Ethics Committee on Animal Resources of Paris Descartes University (registration number: CEEA34.CBL.131.12).

3.2. Platelet preparation

Blood was collected by cardiac puncture into ACD-C solution (13 mM citric acid, 12.6 mM sodium citrate, 11 mM D-glucose) and diluted with wash buffer (36 mM citric acid, 5 mM D-glucose, 5 mM potassium chloride, 2 mM calcium chloride, 1 mM magnesium chloride, 103 mM sodium chloride, pH 6.5) containing apyrase (0.1 U/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and prostaglandin E₁ (PGE₁, 1 μ M; Sigma-Aldrich). Diluted platelet-rich plasma (PRP) was obtained by 7 min centrifugation at 170g. Platelets were washed twice with wash buffer containing apyrase and PGE₁, and then centrifuged for 10 min at 750g. The pelleted platelets were resuspended in assay buffer (10 mM HEPES, 140 mM sodium chloride, 3 mM potassium chloride, 5 mM sodium bicarbonate, 0.5 mM magnesium chloride, 10 mM D-glucose, pH 7.35) to a concentration of 3.5×10^8 /ml. Calcium chloride 2 mM was then added.

3.3. Platelet aggregation studies

Platelet aggregation was measured on a Discovery HT-R microplate reader (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany) coupled to the KC4 software for analysis of the data. FVB mouse washed platelets (3.5×10^8 /ml) were incubated for 2 min at 37 °C under stirring in wells of a 96-well microplate (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) in a volume of 90 μ l, then aggregation was induced by adding 5 μ g/ml fibrillar type-I collagen from equine Achilles tendon (Horm, Nycomed, Linz, Austria) or 1 μ M U46619, a TP synthetic agonist (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany). Aggregation was monitored for 5 min and expressed as the percentage change in absorbance at 405 nm as previously described [13].

3.4. Bleeding assay

Tails of anaesthetized mice were pre-incubated in a 37 °C saline solution during 5 min to homogenize vessel dilatation between animals. Then, bleeding time was measured following a 3-mm tail-tip transection, and immediate immersion of the tail in 10 ml of isotonic saline at 37 °C. Bleeding time was set at cessation of blood leakage for at least 1 min. Blood loss was estimated by measuring the hemoglobin concentration in the saline, using the Drabkin method.

3.5. Thrombosis assay

Mice were anaesthetized and maintained at 37 °C on a heating plate.

The left carotid artery was exposed and dissected away from the vagus nerve and surrounding tissues. Carotid artery blood flow was monitored with a Doppler flow meter equipped with a Transonic flow probe (Model MA0.5PSB, Transonic System Inc, Ithaca, NY). Arterial thrombosis was induced by placing a 15% FeCl₃-saturated filter paper on the artery, 5 mm upstream the flow probe, for 2 or 4 min. Monitoring of blood flow was maintained for 5 min after the cessation of flow, and the time required for occlusion was recorded.

3.6. Thromboxane assay

Thromboxane B₂ (TXB₂) level was measured with the thromboxane assay kit from R&D system (Abingdon, UK). Assays were performed on washed platelet supernatant obtained after collagen-induced platelet aggregation. Ten min after the addition of collagen, 20 mM EDTA was added and the sample were centrifuged 2 min at 12,000 g. The supernatant was kept frozen at –20 °C until tested.

3.7. Data analysis

Data were expressed as medians [95% confidence interval (CI)] for non-normally distributed variables. Statistical analysis was performed with the Prism software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The Mann-Whitney test was used to compare each parameter. Differences were considered significant when $P < .05$.

4. Results

The impact of ASA administration on mouse hemostasis was assessed by varying the time elapsed between ASA administration and testing (30 min versus 3 h), as well as the mouse strain (FVB versus C57Bl6).

4.1. Bleeding experiments

FVB mice. The impact of the period of time between oral ASA administration and bleeding time measurement was first tested in FVB mice. When ASA was given 30 min before measuring bleeding time, this hemostatic parameter was strongly increased compared to vehicle (88 s [95% CI, 44–95] vs 343 s [95% CI, 250–600] for vehicle and ASA respectively; $P < .0001$; Fig. 1A). Conversely, when administered 3 h before the bleeding assay, ASA inconsistently modified the bleeding time compared to vehicle (161 s [95% CI, 45–600] vs 213 s [95% CI, 99–600] for vehicle and ASA respectively; $P > .05$; Fig. 1A), mostly because a high variability in values. However, no significant difference in bleeding time between the ASA groups was observed (30 min vs 3 h, $p = .16$).

Compared to bleeding time, measuring blood loss to evaluate the anti-hemostatic effect of ASA was not informative since it did not significantly differ from controls neither 30 min (14 μ l [95% CI, 6–29] vs 21 μ l [95% CI, 11–97] for control and ASA respectively; $P > .05$; Fig. 1B) nor 3 h after ASA administration (15 μ l [95% CI, 6–23] vs 36 μ l [95% CI, 10–73] for control and ASA respectively; $P > .05$; Fig. 1B).

C57Bl6 mice. To evaluate the potential relevance of the animal genetic background on responsiveness to ASA, we tested whether the widely used C57Bl6 (C57BL/6NRj) strain could give comparable results than the FVB strain. When ASA was given to C57Bl6 mice 30 min before the assay, the bleeding time was also found strongly increased (44 s [95% CI, 5–83] vs 320 s [95% CI, 205–600] for control and ASA respectively; $P < .01$; Fig. 1C). On another hand, blood loss was significantly, although slightly, increased by ASA (7.5 μ l [95% CI, 5.8–9.7] vs 10.5 μ l [95% CI, 9–18] for control and ASA respectively; $P < .05$; Fig. 1D). However, such as for FVB mice, ASA administered 3 h before the tail cutting did not modify the bleeding time (53 s [95% CI, 44–64] vs 128 s [95% CI, 5–600] for control and ASA respectively; $P > .05$; Fig. 1C) nor blood loss values (5.5 μ l [95% CI, 3.6–13.3] vs 10.4 μ l [95%

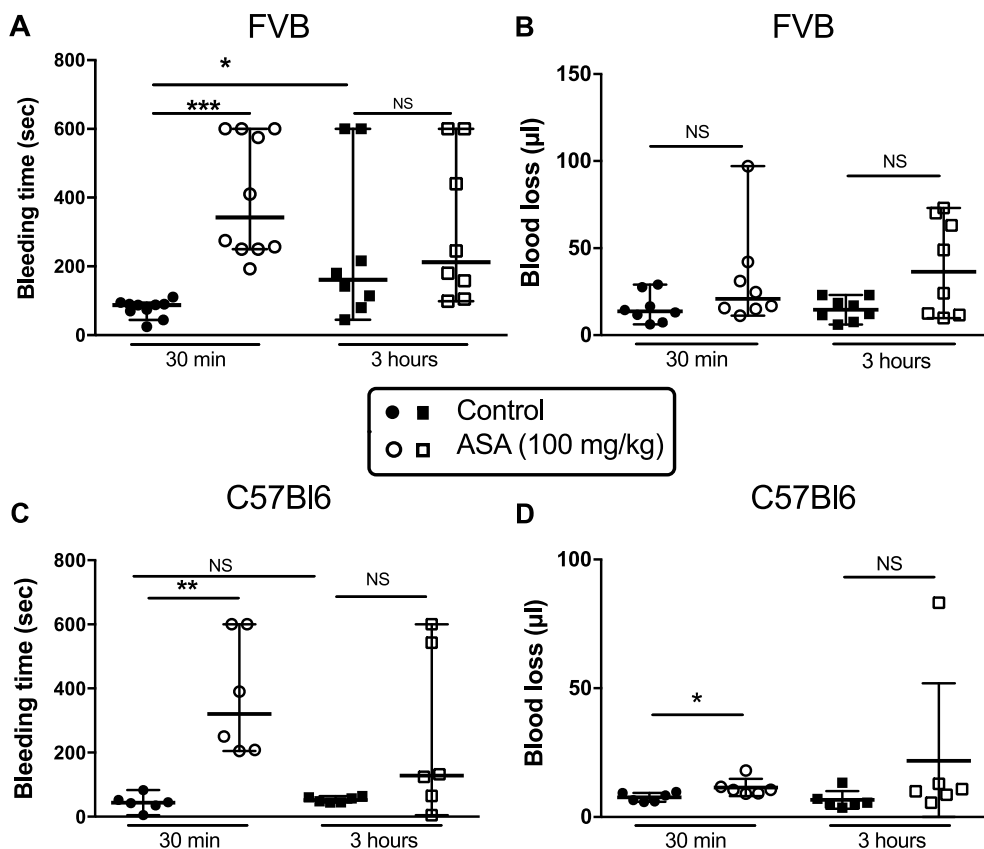


Fig. 1. In vivo ASA effect on bleeding time and blood loss. Bleeding time was measured 30 min or 3 h after vehicle (closed circles) or ASA at 100 mg/kg oral administration (open circles) for FVB (A; $n \geq 8$) or C57Bl6 (C; $n \geq 6$) mice. Hemoglobin concentration in the chamber effluent (containing 10 ml NaCl 0.9%) following bleeding time was measured for FVB (B; $n \geq 8$) and C57Bl6 (D; $n \geq 6$) mice.

CI, 5.5–83.2] for control and ASA respectively; $P > .05$; Fig. 1D). No significant difference in bleeding time between the ASA groups was observed (30 min vs 3 h, $p = .18$, Fig. 1C).

4.2. Carotid artery thrombosis

We next tested the impact of ASA on the most commonly used *in vivo* artery thrombosis model: the FeCl₃-induced injury of the carotid artery [11]. Surprisingly, ASA administered by oral route 30 min or 3 h before the experiment did not modify the time to the total occlusion whatever the mouse strain, FVB or C57Bl6 (Table 1).

Then, we tested a repeated administration of ASA for 4 days in C57Bl6 mice. In order to check if the absence of effect of aspirin on the thrombosis model was not due to a lack of sensitivity of our method, the FeCl₃ patch was left during only 2 min. Again, no difference in the time to occlusion was evidenced between aspirin and placebo groups (17 min [95% CI, 13.8–19.5] vs 16.3 min [95% CI, 15.1–17.3], respectively) (Supplemental Fig. 1A).

Moreover, in order to verify that the route of administration was not responsible for the absence of anti-thrombotic activity of ASA in this

model, we reproduced experiments using the *i.p.* route, which is largely used in preclinical pharmacology in mice, including ASA studies [6,9,14]. Similarly to the results obtained with the oral route, and whatever the time to assay after ASA administration (30 min or 3 h), we did not observe any effect of *i.p.*-administered ASA on carotid artery thrombosis, neither for FVB nor for C57Bl6 mice (Table 1).

4.3. Platelet aggregation and thromboxane generation

To ensure that the absence of anti-thrombotic effect was not due to a pharmacological inefficacy of a single oral ASA administration for COX-1 inhibition, platelet response to ASA exposure was also evaluated by testing platelet functions *ex vivo*. Aggregation assays were performed on washed platelets isolated from FVB mice, in response to 5 µg/ml collagen or 1 µM U46619, a specific agonist of the TP receptor.

When platelet isolation was done 30 min after ASA had been administered by the oral route, and in line with the results obtained for bleeding time measurement, collagen-induced platelet aggregation was significantly reduced compared to control animals receiving vehicle alone (76% [95% CI, 62–88] vs 34% [95% CI, 20–83] for control and

Table 1
In vivo ASA effect on artery thrombosis.

	30 min Control	ASA (100 mg/Kg)		3 h Control	ASA (100 mg/Kg)	
Oral						
FVB	14.7 [10.7–21.2]	17.4 [10.3–25]	NS	12.8 [9.6–16.5]	14.0 [10.5–25]	NS
C57Bl6	11.7 [8.0–21.1]	14.2 [12.3–25]	NS	11.1 [9.4–25]	14.4 [10.5–16.1]	NS
I.P.						
FVB	11.9 [8.9–15.7]	12.5 [10.1–17]	NS	10.6 [10–11]	11.8 [9.6–14.9]	NS
C57Bl6	11.4 [7.3–14.6]	12.7 [7.9–16.2]	NS	10.4 [8.2–13.4]	12.5 [10.4–15]	NS

Vehicle or ASA were administered to FVB or C57Bl6 mice by the oral or intraperitoneal route (I.P.). Thirty min or 3 h after ASA administration, carotid artery thrombosis was induced and the time to occlusion was recorded. Results are in minutes and expressed as median [95% CI].

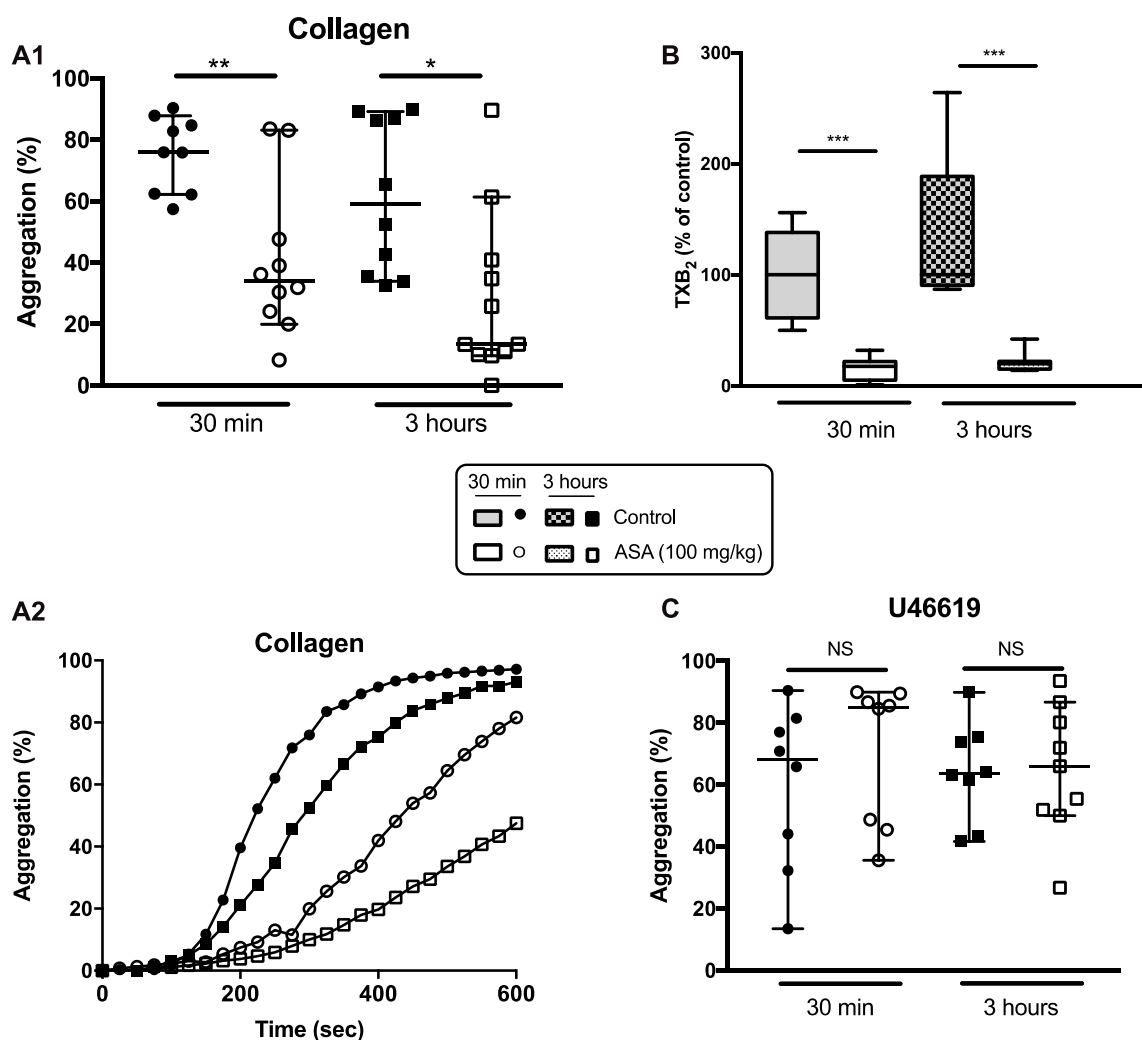


Fig. 2. *Ex vivo* ASA effect on platelet aggregation and TXB₂ synthesis. Blood from FVB mice was taken 30 min or 3 h after vehicle (closed symbols) or ASA at 100 mg/kg oral administration (open symbols). Washed platelet aggregation was measured by monitoring OD (405 nm) variations of a platelet suspension at a concentration of 3.5×10^8 platelets per milliliter under stirring conditions in response to 5 μ g/ml collagen (A1; $n \geq 9$; A2: typical aggregation curves) or 1 μ M U46619 (C; $n \geq 8$). Results are expressed as the percentage of aggregation (seen as a decrease in OD) 300 s after agonist addition. After collagen-induced aggregation and a centrifugation step, TXB₂ was quantified in the supernatant (B; $n \geq 5$), and results are normalized relative to the vehicle condition (Control, grey bars) for each time point.

ASA respectively; $P < .01$; Fig. 2A). This inhibition of platelet aggregation was associated with a high and significant reduction of about 85% TXB₂ generation by platelets of the ASA group (563 pg/ 10^8 platelets [95% CI, 356–1430] vs 81 pg/ 10^8 platelets [95% CI, 12–297] for control and ASA respectively; $P < .001$; Fig. 2B).

When ASA was administered 3 h before platelet isolation, collagen-induced platelet aggregation was still significantly reduced compared to control platelets without ASA (59% [95% CI, 34–89] vs 13% [95% CI, 10–61] for control and ASA respectively; $P < .05$; Fig. 2A). Of note, and whereas TXB₂ generation in platelet supernatant was also significantly decreased at 3 h (1058 pg/ 10^8 platelets [95% CI, 545–1532] vs 210 pg/ 10^8 platelets [95% CI, 82–270] for control and ASA respectively; $P < .05$; Fig. 2B), the effect of ASA on platelet response to collagen was less significant compared to the 30 min time point (Fig. 2A). Notably, there was no significant difference in collagen-induced aggregation between the ASA groups (30 min vs 3 h; $p = .25$).

The efficacy of aspirin after 4 days administration was also checked by a significant inhibition of collagen-induced washed platelet aggregation (82% \pm SEM 12% inhibition) and TXB₂ generation in the supernatant (97% \pm SEM 0.4% inhibition) (Supplemental Fig. 1B–C). Overall, platelet inhibition measured *ex vivo* was more pronounced

after ASA repeated administration compared to the single dose.

As a control for platelet responsiveness, aggregation induced by 1 μ M U46619, which directly activates platelets *via* the TP receptor independently of TXA₂ synthesis, did not differ whatever the time of blood sampling after ASA delivery to animals (68% [95% CI, 30–88] vs 85% [95% CI, 49–92] and 64% [95% CI, 50–78] vs 66% [95% CI, 46–22] at 30 min and 3 h respectively, for control and ASA, respectively; $P > .05$; Fig. 2C).

5. Discussion

Since aspirin remains the gold standard of antiplatelet treatment and an unavoidable reference for other antiplatelet molecules under development, this work was designed to settle appropriate in-house conditions to evidence its effects under a single dose regimen on mouse hemostasis. Indeed, there are major discrepancies found in the literature concerning *in vivo* effects of aspirin in mice. Our present results actually support other studies that failed to demonstrate the antiplatelet effect of ASA in various experimental setups. The two main parameters we chose to evaluate and to settle were (i) the period elapsed between ASA administration and bleeding or thrombosis assays, and (ii) the *in*

vivo test to evaluate drug efficacy.

Regarding the ASA doses to be administered *per os* in such an evaluation, those that can be found in the literature are more frequently between 5 and 100 mg/kg [6,7,9,14–17]. We show here that a 100 mg/kg ASA dose increased bleeding time as well as efficiently inhibited platelet activation *in vitro*, as evaluated by two recognized assays [18]: washed platelet aggregation and TXB₂ production. We also used a tenfold lower single dose of ASA (10 mg/kg) in some experiments, which turned to result in a high and unacceptable variability in read out data values (data not shown).

Importantly, we analyzed the influence of the period elapsed between ASA administration and assays, and how it can affect evaluation of the ASA effect. In some previously reported studies, assays for ASA efficacy were performed between 16 and 24 h after drug administration [12,19]. However Evangelista et al. have shown that a significant amount of newly released platelets with a fully active COX were present in the circulation 24 h after ASA administration [20]. Therefore, and as they are frequently used in published procedures, we focused on two short periods of time, 30 min and 3 h after ASA was administered orally. These time-points are in agreement with the rapid ASA effect reported for humans after an oral single dose [21]. Whatever the *in vivo* or *ex vivo* endpoint hemostatic test (bleeding time or platelet aggregation), our results show that the 30 min time point ensures more reproducible results as compared to 3 h. In these conditions, we also show that bleeding time is a better parameter than the blood loss to evidence an effect of ASA on hemostasis.

Considering the demonstration by Schiviz et al. of a variability for hemostatic parameters in mice in the absence of drug exposure, depending on the genetic background even between different strains of C57Bl6 [22], we compared the basal and ASA-modulated bleeding parameters in FVB and in C57Bl6 (C57BL/6NRj) mice, all males aged 8–12 weeks. We used these genetic backgrounds that correspond to the KO models currently used in our and many other labs [13,23]. Interestingly, in the absence of ASA treatment, bleeding time was significantly about twice shorter for control C57Bl6 as compared to FVB mice at 30 min, and thrice shorter at 3 h (Fig. 1A vs 1C, black dots). In line, blood loss was also always higher in FVB as compared to C57Bl6 mice at either 30 min or 3 h (Fig. 1B vs 1D, black dots). In the whole, bleeding experiments appeared to be more predictable using the C57Bl6 (C57BL/6NRj) strain within the limits of the conditions tested.

Finally, we investigated the impact of ASA on arterial thrombus formation with a commonly used model, the carotid artery thrombosis induced by FeCl₃ [11]. Although we used a 15% FeCl₃ concentration for 4 min, we obtained similar results (see Table 1) than Li et al. who found a time to occlusion of 11.3 ± 3.16 min when using 7.5% FeCl₃ on C57Bl6 [24]. Whatever the delay after ASA administration and the mouse strain used, no anti-thrombotic effect of the drug was observed. Therefore, we wondered if this negative result could be due to the administration route. Huang et al. have shown that doses of ASA up to 150 mg/kg given intravenously were not sufficient to increase the time for occlusion of the mesenteric venule exposed to fluorescein sodium, and that 250 mg/kg was needed to observe an effect of ASA [15]. In the same study, however, the 150 mg/kg dose was, nevertheless, found to efficiently increase the tail bleeding time [15]. The same study showed, however, an effect of 40 mg/kg oral ASA on occlusion time. To note, the study used male ICR mice, a strain we did not use in the present work. Intraperitoneal administration being a commonly used route in pharmacological studies in murine models and ASA treatment [6,9,12,14,16,19,25], we also evaluated this type of administration. However, we did not either observe any effect of ASA on thrombus formation under this particular condition. On the whole, and given that an effective inhibitory activity of ASA on platelet functions was observed *ex vivo* at 30 min and at 3 h (see Fig. 2A and B), we can conclude that the carotid artery thrombosis induced by FeCl₃ is not a suitable model for the evaluation of ASA anti-platelet effects, at least within the frame of our experimental conditions. Using the FeCl₃ injury model,

some authors also failed to show any effect or a very moderate effect of ASA on thrombosis, if any [6,9,25,26]. In a model of femoral artery thrombosis, Kondo et al. showed that ASA can increase the time to occlusion of the artery when thrombosis is induced photochemically by using rose Bengal [7], while Nonne et al. failed to show any effect of intravenous ASA in laser-injured mesentery thrombosis in C57Bl6 strain [17]. More recently, Adili et al. showed that ASA induced a decreased platelet recruitment into the arterial wall thrombus in a model of laser-induced cremaster artery thrombosis, without affecting the increase in platelet surface P-selectin-expression within thrombi [27]. Thus, taken together, the already published and our current data show a wide variability in response to ASA treatment in arterial thrombosis models in mice. Data currently converge to a lesser contribution of platelets in the FeCl₃ injury model compared to mechanical injury; indeed, FeCl₃ injury induces significant damage of subendothelial proteins and attachment of platelets to bodies containing ferric ions and exposing large amounts of tissue factor [28].

Limitations of our study are (i) that models using laser to induce carotid injury were not considered, and (ii) that thrombus formation was not monitored using real-time intravital microscopy. Major reason for this is that we wanted to use the more commonly FeCl₃ injury model. On purpose, testing of a single ASA administration was firstly considered mostly because the objective of the present study was to evaluate this frequently used procedure, and after having verified that a strong TXA₂ generation inhibition was reached after a single dose. However, we cannot exclude that a daily administration of ASA could be more effective in limiting thrombosis. Indeed in a model of thrombus formation induced by *in vivo* injection of platelet agonist, Armstrong et al. observed that a chronic ASA dosing (300 mg/kg/day for 7 days) reduced thrombus formation [29]. However, more pathophysiologically relevant studies carried out in models of atherothrombosis did not observe an effect of daily administration of ASA on the lesion [5,10]. To address this controversy, we tested the repeated administration of ASA for 4 days in C57Bl6 mice. Interestingly, whereas global platelet inhibition measured *ex vivo* was more pronounced 4 days after ASA repeated administration compared to the single dose, again no difference in time to occlusion was evidenced between aspirin and placebo groups in the carotid thrombosis model (Supplemental Fig. 1).

Moreover, it must be noted that, upon completion of our study, a recent publication suggested that the time to occlusion might not be the best parameter in order to analyze arterial thrombosis, and authors suggested including reflow events to maximize data interpretation [30].

Third limitation of our study is that the high dosage of aspirin used is not the one used in chronic treatment in patients with high cardiovascular risk.

We have thus demonstrated that specific experimental conditions are required in order to observe and adequately evaluate the effect of ASA on mouse hemostasis. Here, we show that the most relevant endpoint is the tail bleeding time performed with a cut at 3 mm of the tip and at 30 min after oral 100 mg/kg ASA administration to C57Bl6 mice, as our optimal in-house experimental conditions. We do not recommend time to occlusion of FeCl₃-induced carotid arterial thrombosis as an index of ASA efficacy on platelets since it is inconsistently altered by ASA. A future consensus debate should define the more relevant method to explore the ASA antithrombotic effect.

CRedit authorship contribution statement

Benoit Decouture: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Writing - original draft. **Alexandre Leuci:** Investigation, Writing - review & editing. **Blandine Dizier:** Data curation. **Tiphaine Belleville-Rolland:** Investigation, Data curation. **Alexandre Mansour:** Investigation, Data curation. **Fanny Martin:** . **Dominique Pidard:** Writing - review & editing. **Pascale Gaussem:** Conceptualization, Supervision, Data curation, Funding acquisition, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Christilla Bachelot-Loza:**

Conceptualization, Supervision, Data curation, Funding acquisition, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

We thank Promex Stiftung für die Forschung for generous funding and for having supported BD as a post-doctoral fellow. We also thank Sonia Poirault-Chassac and Fanny Martin for excellent technical assistance. I Dubail, V Bertrand, C Kharchi and all the technicians from the animal facilities (UMS 3612 CNRS - US25 Inserm, Paris Descartes University).

Fundings

This work was supported by INSERM, University Paris Descartes and Promex Stiftung für die Forschung Foundation. DP is Chargé de Recherche at the Institut National des Sciences du Vivant from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.plefa.2019.08.002.

References

- [1] C. Patrono, J. Morais, C. Baigent, et al., Antiplatelet agents for the treatment and prevention of coronary atherothrombosis, *J. Am. Coll. Cardiol.* 70 (2017) 1760–1776.
- [2] G.J. Roth, N. Stanford, P.W. Majerus, Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3073–3076.
- [3] M. Hamberg, J. Svensson, B. Samuelsson, Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2994–2998.
- [4] N. Nakahata, Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology, *Pharmacol. Ther.* 118 (2008) 18–35.
- [5] A.J. Cayatte, Y. Du, J. Oliver-krasinski, et al., The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 1724–1729.
- [6] S.S. Smyth, E.D. Reis, H. Väänänen, W. Zhang, B.S. Coller, Variable protection of β3-integrin-deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms, *Blood* 98 (2001) 1055–1062.
- [7] K. Kondo, Y. Suzuki, Y. Ikeda, K. Umemura, Genistein, an isoflavone included in soy, inhibits thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery and *in vitro* platelet aggregation, *Eur. J. Pharmacol.* (2002) 53–57.
- [8] S. Grüner, M. Prostredna, B. Aktas, Anti-glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis in mice with reduced α2β1 levels or concomitant aspirin therapy, *Circulation* 110 (2004) 2946–2951.
- [9] X. Wang, P.L. Smith, M.Y. Hsu, M.L. Ogletree, W.A. Schumacher, Murine model of ferric chloride-induced vena cava thrombosis: evidence for effect of potato carboxypeptidase inhibitor, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 403–410.
- [10] C. Schulz, I. Konrad, S. Sauer, et al., Effect of chronic treatment with acetylsalicylic acid and clopidogrel on atheroprotection and atherothrombosis in apoE-deficient mice *in vivo*, *Thromb. Haemost.* 99 (2008) 190–195.
- [11] D. Cherpokova, B. Nieswandt, Mouse models of thrombosis, in: P. Gresele, P. Kleiman, N.S. Lopez, J.A. Page (Eds.), *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders. Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*, C. Springer International Publishing, 2017, pp. 681–698.
- [12] M. Allende, E. Molina, E. Guruceaga, et al., Hsp70 protects from stroke in atrial fibrillation patients by preventing thrombosis without increased bleeding risk, *Cardiovasc. Res.* 110 (2016) 309–318.
- [13] B. Decouture, E. Dreano, T. Belleville-rolland, et al., Impaired platelet activation and cAMP homeostasis in MRP4-deficient mice, *Blood* 126 (2015) 1823–1830.
- [14] V. Molina, M.L. Arruzazabala, D. Carbajal, R. Más, Synergistic effect of D-003 and aspirin on experimental thrombosis models, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat Acids* 68 (2003) 305–310 2003.
- [15] S.W. Huang, H.L. Kuo, M.T. Hsu, et al., A novel thromboxane receptor antagonist, nstppb5185, inhibits platelet aggregation and thrombus formation in animal models, *Thromb. Haemost.* 116 (2016) 285–299.
- [16] Y. Kalish, Z. Malyutin, E. Shai, et al., A mouse model to study thrombotic complications of thalassemia, *Thromb. Res.* 135 (2015) 521–525.
- [17] C. Nonne, N. Lenain, B. Hechler, et al., Importance of platelet phospholipase Cγ2 signaling in arterial thrombosis as a function of lesion severity, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 1293–1298.
- [18] G. Born, C. Patrono, Antiplatelet drugs, *Br. J. Pharmacol.* 147 (2006) S241–S251.
- [19] G.J. Broze, A tail vein bleeding time model and delayed bleeding in hemophilic mice combined fresh frozen plasma with recombinant factor VIIa in restoring hemostasis for invasive procedures in children with liver diseases, *Thromb. Haemost.* 85 (2001) 747–748.
- [20] V. Evangelista, S. Manarini, A. Di Santo, et al., De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin, *Circ. Res.* 98 (2006) 593–595.
- [21] J. Nagelschmitz, M. Blunck, J. Kraetzschmar, M. Ludwig, G. Wensing, T. Hohlfeld, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetylsalicylic acid after intravenous and oral administration to healthy volunteers, *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* 6 (2014) 51–59.
- [22] A. Schiviz, D. Magirr, P. Leidenmühler, M. Schuster, E.M. Muchitsch, W. Höllriegel, Influence of genetic background on bleeding phenotype in the tail-tip bleeding model and recommendations for standardization: communication from the SSC of the ISTH, *J. Thromb. Haemost.* 12 (2014) 1940–1942.
- [23] E. Tarantino, P. Amadio, I. Squellerio, et al., Role of thromboxane-dependent platelet activation in venothrombosis: aspirin effects in mouse model, *Pharmacol. Res.* 107 (2016) 415–425.
- [24] W. Li, M. Nieman, A. Sen Gupta, Ferric chloride-induced murine thrombosis models, *J. Vis. Exp.* 115 (2016) 1–12.
- [25] Y. Kawamura, Y. Takahari, N. Tamura, et al., Imaging of structural changes in endothelial cells and thrombus formation at the site of FeCl₃-induced injuries in mice cremasteric arteries, *J. Atheroscler. Thromb.* 16 (2009) 807–814.
- [26] N. Faraday, K. Schunke, S. Saleem, et al., Cathepsin G-dependent modulation of platelet thrombus formation *in vivo* by blood neutrophils, *PLoS One* 8 (2013) e71447.
- [27] R. Adili, B.E. Tourdot, K. Mast, et al., First selective 12-LOX inhibitor, ML355, impairs thrombus formation and vessel occlusion *in vivo* with minimal effects on hemostasis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (2017) 1828–1839.
- [28] A. Eckly, B. Hechler, M. Freund, et al., Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis, *J. Thromb. Haemost.* 9 (2011) 779–789.
- [29] P.C. Armstrong, N.S. Kirkby, Z.N. Zain, M. Emerson, J.A. Mitchell, T.D. Warner, Thrombosis is reduced by inhibition of COX-1, but unaffected by inhibition of COX-2, in an acute model of platelet activation in the mouse, *PLoS One* 6 (2011) e20062.
- [30] B. Kastetter, A.B. Matrai, B.C. Cooley, Optimizing outcome measurement with murine ferric chloride-induced thrombosis, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 29 (2018) 636–643.

Discussion du manuscrit

Administration de l'aspirine. Après gavage (voie P.O.) et injection I.P. d'ASA, nos résultats montrent que chez des souris de souches FVB et C57/BL6, l'administration d'ASA n'induit pas de protection vis-à-vis de la thrombose artérielle. En effet, le groupe ASA 100mg/Kg/jour et le groupe témoin ne montrent pas de différence de temps d'occlusion artériel et ce à 30 minutes comme à 3 heures après administration bien que la production des TXA2 soit bien inhibée de 85 % chez le groupe ASA. L'absence d'effet de l'ASA sur la thrombose artérielle est également retrouvée en comparant la voie P.O. et I.P., ce qui semble indiquer que les variations pharmacocinétiques de chaque voie ne seraient pas les facteurs limitant l'effet de l'ASA.

Après administration de l'ASA 100mg/Kg/jour, l'agrégation au collagène 5 µg/mL est inhibée à 30 min et reste inhibée mais moins significative après 3 heures. Afin de s'assurer que l'inhibition de l'agrégation au collagène dans le groupe ASA et la baisse de significativité à 3 heures ne soient pas due à un défaut de la signalisation de la voie des TXA2, nous avons utilisé un agoniste direct du récepteur TP, le U46619. L'agoniste induit une agrégation plaquettaire similaire entre le groupe témoin et ASA, indiquant que la voie de signalisation médiée par le récepteur TP est bien fonctionnelle dans le groupe ASA et que la baisse de l'agrégation au collagène résulte bien de l'inhibition de la production de TXA2 par inhibition de la COX1 plaquettaire. L'agoniste induit également une agrégation similaire entre les groupes 30 minutes et 3 heures après administration de l'ASA ce qui indique que la baisse de l'agrégation observée à 3 heures pour le groupe ASA n'est pas due à une baisse de la réactivité.

Les précédents résultats nous ont permis de définir que la voie P.O., une dose de 100mg/Kg et l'étude des plaquettes 30 minutes après administration comme étant les paramètres d'étude optimaux de l'effet antiplaquettaire de l'ASA. Par ailleurs, nous avons vérifié que des résultats similaires étaient obtenus suite à une administration quotidienne durant 4 jours d'ASA.

Résultats complémentaires

Etude de la surexpression de MRP4. Dans le but de vérifier si l'administration au long cours d'ASA induit une surexpression de la protéine MRP4, nous avons administré l'ASA sur une période suffisamment longue pour obtenir le renouvellement des plaquettes et ainsi observer la possible surexpression de MRP4. Chez la souris, la période de renouvellement des plaquettes correspond à environ 4 jours, nous avons donc par la suite réalisé un gavage par ASA 100mg/Kg sur une durée de 4 jour consécutifs. Lors du dernier jour de gavage, les deux groupes (placebo et ASA) ont reçu de l'ASA ce qui nous permet de nous affranchir de l'effet inhibiteur de l'ASA sur la voie des TXA2 et l'activation plaquettaire et de n'observer que l'impact de cette surexpression sur l'activité plaquettaire.

Des résultats préliminaires montrent une augmentation de l'expression protéique de MRP4 au sein des plaquettes dans le groupe ASA comparé au groupe placebo.

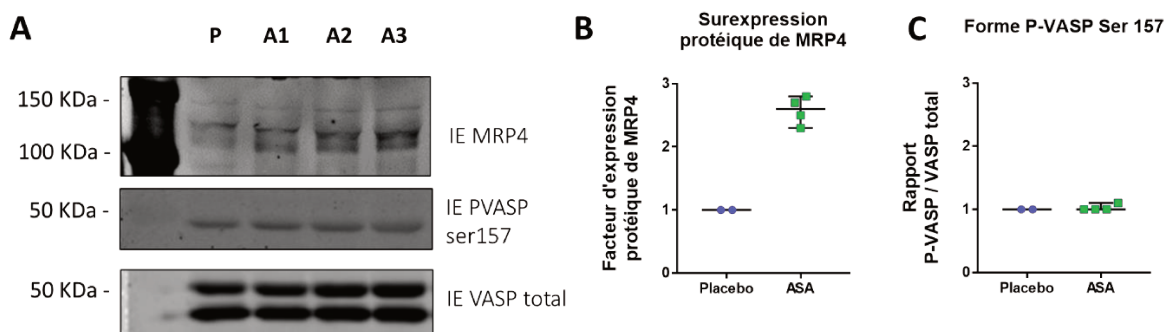


Figure 33. Immunoempreinte de plaquettes issues de souris après gavage par l'aspirine. (A) Expression de la protéine MRP4 chez la souris révélée par immunoempreinte (IE). (B) Quantification de l'expression de MRP4, normalisée à l'aide du rapport intensité de MRP4 sur intensité de la VASP total ($n \geq 2$). (C) Quantification de l'expression de la forme P-VASP Ser 157 normalisée à l'aide du rapport intensité de P-VASP Ser 157 sur intensité de VASP total ($n \geq 2$)., P : placebo (3 jours de sérum physiologique et ASA 100mg/Kg le dernier jour 30 minutes avant prélèvement), A1, A2, A3 : souris sous ASA 100mg/Kg durant 4 jours.

Bien que les plaquettes contiennent toute la machinerie nécessaire pour la synthèse protéique dont l'ARNm, la synthèse protéique se fait essentiellement, voire exclusivement en fonction des protéines, au niveau du mégacaryocyte (MK). Il sera donc nécessaire par la suite de confirmer la surexpression de MRP4 au sein des mégacaryocytes.

La surexpression de MRP4 au sein des plaquettes suggère une augmentation de son activité globale, soit un efflux de l'AMPc plus important, diminuant ainsi le taux cytosolique de ce nucléotide, ce qui induirait une baisse de 1) l'activation de PKA et 2) une baisse de la phosphorylation de VASP sur la Ser157. L'analyse par immunoempreinte de la phosphorylation de la Ser157 de VASP ne révèle cependant pas de différence de phosphorylation basale entre les groupes ASA et témoin. Comme l'ont

montré nos précédents résultats, l'étude de l'efflux de l'AMPc par MRP4 nécessite la sensibilisation de la voie de l'AMPc par la PGE-1 ou la FSK. Ainsi, ces expériences devront être reconduites en présence de PGE-1 afin d'être dans une condition optimale de l'étude de l'efflux de MRP4 et ce pour détecter des différences de phosphorylation phospho-VASP sur la Ser157.

Etude de l'impact de l'aspirine sur des cultures de mégacaryocytes murins. Outre la surexpression de MRP4 dans les MK, nous cherchons aussi à définir l'impact de l'ASA sur la maturation des MK, qui peut se traduire par des modifications morphologiques de ces cellules. En effet, les travaux de Young *et al.* et Kazama *et al.* suggèrent que suite à l'incubation d'ASA, les MK ont une perte d'adhésion et des invaginations de la membrane plasmique qui deviennent également plus perméable (Young et al. 2010; Kazama, Maruyama, et Nakamichi 2014). Pour ce faire, nous avons placé en culture des progéniteurs mégacaryocytaires isolés de la moelle osseuse de souris témoins et de souris MRP4 *-/-* en présence d'ASA.

Nos résultats préliminaires suggèrent que ces modifications morphologiques induites par l'ASA ne sont pas visibles en microscopie optique. En revanche, l'ajout de l'ASA 100 μ M dès le début de la culture induit une inhibition de la croissance des progéniteurs comme le suggère la baisse de la proportion de grandes cellules à 3 et 6 jours de culture (Figure 33).

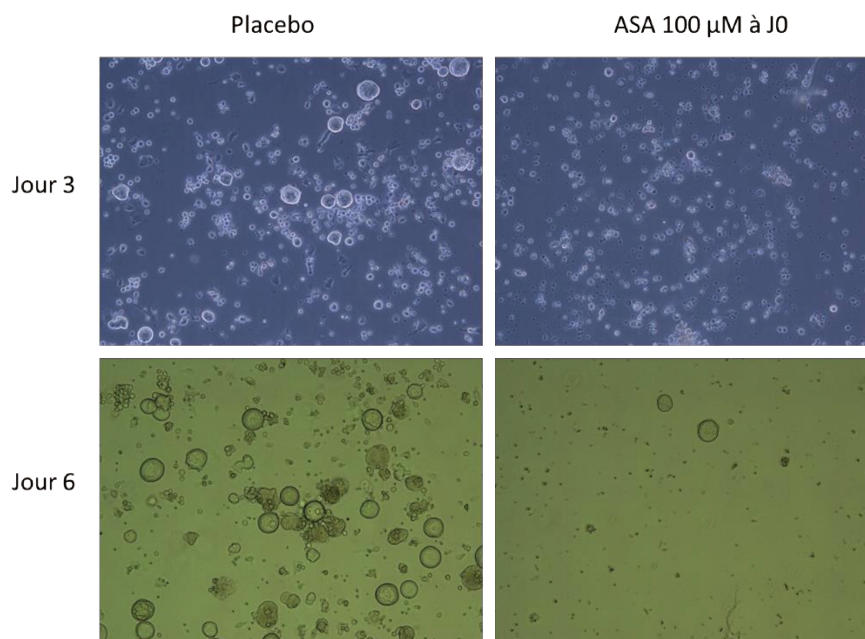


Figure 34. Observation en microscopie optique à 3 et 6 jours de culture avec aspirine 100 μ M (n=2).

Discussion. Après avoir déterminé que la voie P.O. et la dose de 100mg/Kg/jour sont les paramètres optimaux pour inhiber de façon efficace la synthèse des thromboxanes, nous cherchons à confirmer les résultats de Massimi *et al* qui suggèrent qu'une aspirinothérapie au long cours induit une augmentation de MRP4. La plus-value de ce travail est comparer l'impact de l'aspirinothérapie chez des souris sauvages et des souris déficientes pour MRP4. Ceci afin de déterminer :

- 1) si l'aspirine, en dehors de contexte pathologique, peut induire la surexpression de MRP4 et
- 2) quelle est la part de MRP4 incriminée dans la résistance à l'ASA.

L'augmentation de l'expression protéique de MRP4 est dépendante de la fréquence de renouvellement des plaquettes et demande 2 semaines pour être mesurable pour l'ARNm et la protéine chez l'Homme. La souris possédant un taux de renouvellement plus court, nous nous attendions à observer cette surexpression dans un délai plus court. Conformément à notre hypothèse, nous retrouvons l'augmentation de l'expression de MRP4 chez les souris témoins au bout de 4 jours de gavage.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de résistance à l'ASA induit par la surexpression de MRP4 consécutive à un traitement par l'ASA, nous avons comparé l'activité plaquettaire du groupe ASA au groupe témoin. Comme cité plus haut, le groupe témoin a reçu de l'ASA le dernier jour afin de nous affranchir de l'effet inhibiteur de l'ASA sur la synthèse des TXA₂.

Les résultats préliminaires montrent que, comme attendu, l'agrégation au collagène très dépendante des TXA₂, est abolie que l'ASA soit administrée 4 jours consécutifs ou uniquement 30 min avant le prélèvement sanguin. En revanche, l'agrégation plaquettaire induite à la thrombine n'est que partiellement inhibée mais, au moins dans les conditions testées, nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux groupes. Cela suggère que la surexpression de MRP4, observée dans les plaquettes de souris du groupe ASA, n'induirait pas de modification de l'activation plaquettaire par la thrombine et que l'agrégation au collagène ne serait pas non plus modifiée, du moins avec l'utilisation de ces tests.

Afin de compléter le mécanisme de l'impact de la surexpression de MRP4 induite par un traitement par ASA sur l'homéostasie de l'AMPc, nous avons recherché la modification des taux d'AMPc basal mais également après stimulation par la PGE-1 au sein des MK mis en culture en présence d'ASA. Les premiers essais de culture en présence d'aspirine (100 µM final) semblent montrer un effet trop inhibiteur sur la croissance des cellules ce qui ne nous permet pas de distinguer des différences morphologiques entre les MK à divers stades de maturation issus des groupes témoin et ASA.

L'utilisation d'une dose d'ASA plus faible, 50 μ M final, semble induire une baisse de la proportion de grandes cellules à 3 jours de culture.

Nous pouvons émettre deux hypothèses, la première hypothèse est que la voie des TXA2 serait impliquée dans le développement des MK ; la deuxième hypothèse est que le pic d'AMPc nécessaire à la mégacaryopoïèse, décrit par le groupe de Begonja *et al*, serait perturbé au cours d'un traitement par ASA. En effet, la surexpression de MRP4, induite par l'administration d'ASA durant 4 jours, conduirait à l'augmentation de l'efflux l'AMPc hors du mégacaryocyte pouvant alors prévenir de l'apparition et/ou raccourcir la durée de ce pic d'AMPc.

Conclusions et perspectives

Les résultats présentés dans cette thèse ont permis de mieux caractériser l'implication de la protéine MRP4 dans la voie de l'AMPc et de définir les conditions nécessaires à l'étude de son rôle au cours de la résistance à l'aspirine. Nous montrons que, dans les plaquettes, les acteurs de la voie de l'AMPc ne sont pas répartis de façon homogène. Une partie des acteurs, dont la protéine Gi, PKA et une fraction de MRP4, sont retrouvés dans les radeaux lipidiques alors que les autres acteurs, les PDEs 2A, 3A, l'AC3, MRP4 et une fraction de PKA sont retrouvés hors de ces radeaux lipidiques.

L'étude de la répartition des acteurs de la voie de l'AMPc fait suite aux travaux réalisés dans d'autres types cellulaires, dont les cardiomyocytes, qui montrent une organisation spatiale de la voie de l'AMPc. Un premier modèle ressort de l'étude de ces cellules où l'AC, PKA et les PDE4D3 sont localisées au sein d'un même domaine par l'intermédiaire de protéines d'ancrage que sont les mAKAPs. L'AC, ancrée à la membrane permet la synthèse de l'AMPc et ce sont les mAKAP qui maintiendraient PKA au voisinage de l'AC afin que PKA puisse être activée par l'AMPc. L'activité de l'AMPc est cependant limitée par la présence des PDE4D3 ce qui en fait une barrière métabolique, constituant alors un domaine restreint d'où l'AMPc ne peut pas diffuser.

Au sein des plaquettes, la présence de microdomaines à AMPc n'est pas totalement démontrée bien que certains travaux soient en faveur de cette hypothèse. Les travaux de Bilodeau et al montrent la présence de pools d'AMPc, régulant de façon négative l'agrégation suite à l'activation des récepteurs à la thrombine. Les auteurs montrent également que l'effet inhibiteur est majoré par l'IBMX, un inhibiteur non spécifique des PDEs (Bilodeau et Hamm 2007) ce qui est en faveur de l'existence de la barrière métabolique représentée par les PDEs. **L'identification de tous les acteurs de la voie de l'AMPc (AC3, protéine Gi, PKA, MRP4) dont les PDEs hors des radeaux lipidiques et l'implication des PDEs comme barrière métabolique de l'AMPc sont en faveur de l'hypothèse de l'organisation de la voie de l'AMPc sous la forme de microdomaines au sein des plaquettes.**

Il est reconnu, au sein des plaquettes, que les radeaux lipidiques contiennent des protéines de la voie de signalisation de GPVI et que lors de l'activation plaquettaire, les radeaux lipidiques sont modifiés pour regrouper les effecteurs de la signalisation de GPVI. L'identification de la protéine Gi, d'une fraction de PKA et l'absence de PDEs au sein des radeaux lipidiques ne semble pas cohérent avec le modèle de microdomaine évoqué précédemment. Un second modèle correspond cependant à une organisation, où l'on retrouve la synthèse de l'AMPc par une AC, pouvant être régulée par la protéine Gi, AMPc qui peut activer par la suite PKA ou, grâce à l'absence de PDEs, diffuser au sein des plaquettes. Nous n'identifions pas, à ce jour, d'AC dans les radeaux lipidiques, bien que Raslan identifie l'AC5 plaquettaire comme y étant présente. Bien que la présence de l'ACV soit sujet à controverse, la

présence d'une AC au sein des radeaux lipidiques est nécessaire pour compléter ce second modèle d'organisation de la voie de l'AMPc comme proposé par Conti *et al.* Ce modèle propose la synthèse de l'AMPc par une AC, AMPc qui peut alors activer la PKA des radeaux lipidiques ou diffuser dans la cellule où les PDEs sont localisées proches des cibles de l'AMPc et de PKA au niveau des différents compartiments. **L'absence de l'identification des PDEs au sein des radeaux lipidiques est cohérente avec le modèle de l'organisation de la voie de l'AMPc induisant une production d'AMPc qui diffuse et pouvant être régulé par l'action de la protéine Gi. La destruction des radeaux lipidiques par le M β CD induirait alors une levée de l'inhibition de la protéine Gi sur l'AC5.**

Bien que la répartition des acteurs de la voie de l'AMPc soit compatible avec les modèles de microdomaines hors des radeaux lipidiques et avec l'organisation d'acteurs de la voie de l'AMPc à la membrane, des arguments supplémentaires sont nécessaires à la validation de ces modèles. Dans un premier temps, il sera nécessaire de compléter l'identification des acteurs pouvant moduler la voie de l'AMPc et leur possible colocalisation. Certains travaux suggèrent en effet la présence du récepteur IP hors des radeaux lipidiques plaquettaires (Z. Raslan et al. 2015) ce qui permet de compléter le modèle en y incluant la stimulation du microdomaines AMPc. D'autres travaux identifient les récepteurs P2Y12 au sein des radeaux lipidiques plaquettaires ce qui permet de lier l'activation plaquettaire à la baisse de la production de l'AMPc induite par la protéine Gi au cours de l'activation à l'ADP (Quinton et al. 2005).

Dans un second temps, la visualisation de la colocalisation entre les différents acteurs de la voie peut nous indiquer la présence de différents acteurs dans un espace donné de la membrane avec la possibilité de distinguer leur présence à la membrane plaquettaire et ou au niveau des membranes internes dont celle des granules. Des études de FRET (Förster resonance energy transfer) devraient permettre de localiser l'AMPc au sein des plaquettes à condition de pouvoir transfecter les mégacaryocytes et ensuite produire, *in vitro*, des plaquettes contenant cette sonde. **L'identification de microdomaines à AMPc, au sein des plaquettes, pourra être possible en associant une colocalisation des acteurs de la voie entre eux (AC, protéine Gs, PKA, PDEs) avec une augmentation de l'AMPc localisée au niveau de ces colocalisations protéiques.**

L'étude de l'effet de l'administration de l'aspirine chez la souris nous a permis 1) de définir les conditions d'administration de l'aspirine permettant d'obtenir une inhibition de la production des thromboxanes et 2) de confirmer la surexpression de MRP4 au sein des plaquettes au cours d'un traitement prolongé par de l'aspirine.

Montrée dans des études de suivi de patients sous aspirine, la surexpression de MRP4 au sein des plaquettes est corrélée à une résistance plaquettaire à l'aspirine (Zimmermann et al. 2003; Massimi et al. 2014). Cette résistance se traduit *in vitro* par une agrégation à l'AA des plaquettes humaines non inhibée et un taux de TXA2 normal. Nous avons développé un modèle préclinique d'administration d'aspirine reproductible chez la souris afin de pouvoir par la suite confirmer le rôle de MRP4 dans la même souche BL6 déficiente en MRP4, modèle dont j'ai assuré le suivi de la construction. L'administration de l'aspirine 100 mg/Kg durant 4 jours chez des souris sauvages induit une augmentation d'un facteur 2,5 de MRP4, ceci semble confirmer le rôle de l'aspirine, *in vivo*, à induire une surexpression de MRP4 plaquettaire.

La mise en culture de progéniteurs des mégacaryocytes de souris en présence d'aspirine, 100 μ M final, dès le premier jour de culture montre une inhibition de la proportion de grandes cellules. Afin de confirmer l'implication de la surexpression de MRP4 sur la perturbation du pic de l'AMPc, décrit au cours de la mégacaryopoïèse par Begonja *et al*, le suivi du taux de l'AMPc est à réaliser en culture au sein de progéniteurs surexprimant MRP4, suite à un traitement *in vivo* par ASA, et maintenus sous aspirine.

Afin de bien caractériser la surexpression de MRP4, l'étude de l'expression protéique mais également de l'ARNm de MRP4 à différents temps de gavage permettront de déterminer avec plus de précision le temps nécessaire à l'aspirine pour induire cette surexpression. La recherche de cette surexpression au sein des mégacaryocytes en parallèle des plaquettes nous permettra d'identifier la cinétique de la surexpression protéique de MRP4.

Bien que nous ayons identifié une surexpression plaquettaire de MRP4, les études de l'effet de l'aspirine sur l'homéostasie de l'AMPc seront à compléter avec le dosage de l'AMPc. Ce dosage 4 jours après le gavage permettra de déterminer si la surexpression de MRP4, protéine d'efflux de l'AMPc, induit une variation du taux basal d'AMPc au sein de plaquettes et des mégacaryocytes. L'étude de l'impact fonctionnel, de la surexpression de MRP4, sur l'activité plaquettaire doit se poursuivre sur 1) l'activation plaquettaire et 2) pourra se faire grâce à l'étude de l'efflux de l'aspirine par MRP4 plaquettaire. Ces études seront également à conduire au sein des souris MRP4 déficientes afin de confirmer la part de MRP4 dans l'effet inhibiteur de l'aspirine au cours d'un traitement par aspirine.

Annexes

Annexe 1 : Murine platelet production is suppressed by S1P release in the hematopoietic niche, not facilitated by blood S1P sensing.

Hira Niazi, Nesrine Zoghiani, Ludovic Couty, **Alexandre Leuci**, Anja Nitzsche, Maria L. Allende, Boubacar Mariko, Rameez Ishaq, Yetki Aslan, Pierre Hadrien Becker, Salome L. Gazit, Sonia Poirault-Chassac, Benoit Decouture, Veronique Baudrie, Erica De Candia, Mari Kono, Ammar Benarab, Pascale Gaussem, Pierre-Louis Tharaux, Jerold Chun, Sylvain Provot, Najet Debili, Patrice Therond, Richard L. Proia, Christilla Bachelot-Loza, and Eric Camerer.

Publié dans Blood advances, 2019

Introduction

Il a été précédemment montré, par notre groupe, que S1P n'est que partiellement efflué des plaquettes par MRP4 comme le montre la persistance de cet efflux chez les souris déficientes en MRP4 (Decouture et al. 2018). La poursuite de l'étude de la voie de S1P, au sein des lignées hématopoïétiques, a permis de montrer que S1P ne facilite pas la production de plaquettes et qu'une sécrétion anormale de S1P induirait une restriction de la mégacaryopoïèse au sein de la niche hématopoïétique. Ma participation à ce travail m'a permis d'acquérir les techniques d'étude de l'adhésion plaquettaire dont l'analyse du changement de forme en microscopie électronique à balayage.

Manuscrit

Murine platelet production is suppressed by S1P release in the hematopoietic niche, not facilitated by blood S1P sensing

Hira Niazi,^{1,2,*} Nesrine Zoghiani,^{1,2,*} Ludovic Couty,^{1,2} Alexandre Leuci,^{2,3} Anja Nitzsche,^{1,2} Maria L. Allende,⁴ Boubacar Mariko,^{1,2,5} Rameez Ishaq,^{6,7} Yetki Aslan,⁸ Pierre Hadrien Becker,^{9,10} Salomé L. Gazit,^{1,2} Sonia Poirault-Chassac,^{2,3} Benoit Decouture,^{2,3} Veronique Baudrie,^{1,2} Erica De Candia,¹¹ Mari Kono,⁴ Ammar Benarab,^{1,2} Pascale Gaussem,^{2,3} Pierre-Louis Tharaux,^{1,2} Jerold Chun,¹² Sylvain Provot,⁸ Najet Debili,⁶ Patrice Therond,^{9,10} Richard L. Proia,⁴ Christilla Bachelot-Loza,^{2,3} and Eric Camerer^{1,2}

¹INSERM U970, Paris Cardiovascular Research Centre, Paris, France; ²Department of Medicine, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ³INSERM U1140, Faculté de Pharmacie, Paris, France; ⁴Genetics of Development and Disease Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD; ⁵College of Agronomy and Veterinary Science, University of Ségou, Ségou, Mali; ⁶INSERM Unité Mixte de Recherche 1170, Université Paris-Saclay & Gustave Roussy, Villejuif, France; ⁷Gustave Roussy Cancer Campus, Université Paris Diderot, Paris, France; ⁸INSERM, Hôpital Lariboisière–Centre Viggo Petersen, Paris, France; ⁹Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service de Biochimie, Le Kremlin Bicêtre, France; ¹⁰Université Paris-Sud, Équipes d'Accueil 7357 Lipides: systèmes analytiques et biologiques, Unité de Formation et de Recherche de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France; ¹¹Servizio Malattie Emorragiche e Trombotiche, Polo Oncologia ed Ematologia, Istituto di Medicina Interna, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy; and ¹²Neuroscience Drug Discovery, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA

Key Points

- The vascular S1P gradient is dispensable for platelet formation in mice.
- Instead, local S1P production restrains megakaryopoiesis via S1P₁ and can further suppress platelet production via S1P₂ when deregulated.

The bioactive lipid mediator sphingosine 1-phosphate (S1P) was recently assigned critical roles in platelet biology: whereas S1P₁ receptor-mediated S1P gradient sensing was reported to be essential for directing proplatelet extensions from megakaryocytes (MKs) toward bone marrow sinusoids, MK sphingosine kinase 2 (Sphk2)–derived S1P was reported to further promote platelet shedding through receptor-independent intracellular actions, and platelet aggregation through S1P₁. Yet clinical use of S1P pathway modulators including fingolimod has not been associated with risk of bleeding or thrombosis. We therefore revisited the role of S1P in platelet biology in mice. Surprisingly, no reduction in platelet counts was observed when the vascular S1P gradient was ablated by impairing S1P provision to plasma or S1P degradation in interstitial fluids, nor when gradient sensing was impaired by *S1pr1* deletion selectively in MKs. Moreover, S1P₁ expression and signaling were both undetectable in mature MKs in situ, and MK *S1pr1* deletion did not affect platelet aggregation or spreading. When *S1pr1* deletion was induced in hematopoietic progenitor cells, platelet counts were instead significantly elevated. Isolated global Sphk2 deficiency was associated with thrombocytopenia, but this was not replicated by MK-restricted *Sphk2* deletion and was reversed by compound deletion of either *Sphk1* or *S1pr2*, suggesting that this phenotype arises from increased S1P export and S1P₂ activation secondary to redistribution of sphingosine to Sphk1. Consistent with clinical observations, we thus observe no essential role for S1P₁ in facilitating platelet production or activation. Instead, S1P restricts megakaryopoiesis through S1P₁, and can further suppress thrombopoiesis through S1P₂ when aberrantly secreted in the hematopoietic niche.

Introduction

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a lipid mediator that plays critical roles in the homeostasis of vascular and immune systems.¹ Although most of its functions are mediated by 5 cognate G protein-coupled receptors (S1P₁₋₅; encoded by *S1pr1-5*), S1P also plays intracellular receptor-independent roles.¹

Submitted 21 January 2019; accepted 17 April 2019. DOI 10.1182/bloodadvances.2019031948.

*H.N. and N.Z. contributed equally to this study.

For original data, please contact eric.camerer@inserm.fr.

The full-text version of this article contains a data supplement.

Sphingosine is phosphorylated to S1P by sphingosine kinases (Sphk) 1&2.^{2,3} Compound deletion of *Sphk1&2* results in a tissue-wide loss of S1P, isolated *Sphk1* deletion in a ~50% reduction in plasma S1P and complete loss of red blood cell (RBC) S1P, and *Sphk2* deletion in a paradoxical doubling of plasma S1P and near-complete loss of megakaryocyte (MK)/platelet S1P.⁴⁻⁹ While RBCs and endothelial cells continuously export S1P to plasma and lymph through transporters *Mfsd2b* and *spinster 2*, respectively, S1P is actively broken down and removed from interstitial fluids by S1P lyase (encoded by *Sgpl1*) and lipid phosphatases.¹⁰⁻¹⁵ Platelets store abundant S1P, roughly equivalent to the plasma pool, that can be exported by *Mfsd2b* on activation.^{6,11,14}

Combined with a short half-life, tight control of export and degradation thus allows the maintenance of a steep gradient of S1P between blood and interstitial fluids that is used by hematopoietic cells to gauge their proximity to blood and lymph.^{10,16} When sensed by S1P₁, S1P drives lymphocytes into circulation by activation of *Gαi* and *Rac*; when sensed by S1P₂, it confines lymphocytes within germinal centers through *Gα_{12/13}* and *RhoA*.¹⁷⁻¹⁹ Plasma membrane receptor expression thereby dictates how a cell responds to S1P. S1P₁ is internalized once cells reach the circulation and are exposed to receptor-saturating S1P levels, and reexpressed after cells are attracted back to S1P-poor environments by other chemokines.¹⁰ The clinically approved multiple sclerosis drug fingolimod (AKA FTY720, Gilenya) induces immunosuppression by disruption of S1P₁-mediated gradient sensing. Once phosphorylated by Sphk2, fingolimod acts as a functional antagonist of S1P₁, first activating and then rapidly desensitizing the receptor.^{10,16} Fingolimod also targets S1P₃₋₅.¹

MKs were recently proposed to use S1P₁ to direct proplatelet (PP) extensions along the S1P gradient toward bone marrow sinusoids, and for subsequent platelet shedding, as schematically presented in Figure 1A.^{20,21} A parallel, MK-intrinsic receptor-independent role for S1P was proposed in platelet shedding (Figure 1A),²² and platelet-derived S1P and S1P₁ have been further implicated in the amplification of platelet aggregation during arterial thrombosis.⁷ S1P₄ is also involved in terminal differentiation of MKs, although S1P₄-deficient animals have normal platelet counts.²³ Together, these studies position S1P as a key player in platelet production and function. Fingolimod and S1P₁-selective modulators are being explored for the treatment of a range of disease conditions, some of which are associated with risk of hemorrhage and thrombosis.^{1,24} Sphks and S1P lyase are also emerging as potential drug targets for treatment of cancer, pulmonary hypertension, bone loss, and sickle cell disease.²⁴⁻²⁶ Should it be a concern that these drugs also target S1P production and signaling in MKs and platelets? In this regard, it is reassuring that case reports of thrombocytopenia and bleeding in patients with MS receiving fingolimod are rare, and that pilot trials with fingolimod for ischemic and hemorrhagic stroke have not revealed an increase in bleeding propensity.^{27,28} Whether this reflects on the complex mechanisms of action of fingolimod or if experimental studies have overestimated the role of S1P₁ in platelet production and function is unclear.

The role for S1P gradient sensing in lymphocyte trafficking was demonstrated by rendering either interstitial fluids S1P-rich by

inhibiting S1P lyase, or blood and lymph S1P-poor by tissue-specific *Sphk1&2* deletion.¹⁰ A key role for S1P₁ was suggested using S1P₁-modulating drugs and established by hematopoietic or lymphocyte selective deletion of *S1pr1*.^{10,29,30} Using similar tools to interrogate the role of S1P in platelet biology, we fail to confirm a critical role for the S1P gradient and S1P₁ in platelet production or function, consistent with clinical observations. We instead reveal that S1P₁ signaling in the hematopoietic compartment restrains megakaryopoiesis, and that aberrant S1P₂ activation can further suppress platelet production when S1P is released in the hematopoietic niche.

Materials and methods

Generation and validation of conditional (f) and global (-) knock-outs of *Sphk1*, *Sphk2*, *S1pr1*, and *Sgpl1* (encoding Sphk1, Sphk2, S1P₁, and S1P lyase, respectively), plasma S1Pless mice (*Sphk1^{f/f}:2^{f/f}:Mx1Cre⁺*), platelet S1Pless mice (*Sphk1^{f/f}:2^{f/f}:P14Cre*), S1P₁ ECKO mice (*S1pr1^{f/f}:PdgbCre⁺*), and S1P₁ signaling reporter mice (*S1pr1^{GFP}*) has been described.^{6,11,31-34} Mice deficient in *S1pr1* or *Sphk2* in MKs and platelets (*S1pr1^{f/f}:P14Cre⁺*; *Sphk2^{f/f}:P14Cre⁺*) were generated with Cre recombinase driven by the platelet factor 4 promoter.³⁵ Experiments were littermate controlled. Complete blood cell counts were obtained with a HemaVet (Drew Scientific). Scanning and transmission electron microscopy was performed as previously described.^{6,36} S1P and sphingosine concentrations in plasma and cell lysates were quantified by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and high-performance liquid chromatography, as described.⁶ Bone marrow (BM) hematopoietic stem cells (*Lin⁻:Sca-1⁺:c-Kit⁺*), common MK/erythrocyte progenitor cells (*Lin⁻:Sca-1⁻:c-Kit⁺:CD34⁻:CD16/32⁻*), and MK progenitor cells (MKPs; lineage⁻:*Sca-1⁻:c-Kit⁺:CD34⁻:CD16/32⁻:CD41⁺*) were quantified by flow cytometry. Reagents and methods for platelet isolation and functional analyses, platelet half-life, microcomputed tomography imaging and analyses, further immunohistochemical analyses, quantitative polymerase chain reaction, MK culture, and platelet formation are detailed in supplemental Information. Experimental procedures involving animals were approved by the Paris Descartes Ethical Committee and the French Ministry of Education. Statistical significance was assessed using GraphPad Prism software; details of tests used are provided in the figure legends. **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001, and *****P* < .0001.

Results

The S1P gradient is dispensable for platelet production

We and others have reported that compound deletion of *Sphk1&2* in hematopoietic and other *Mx1Cre*-sensitive cells greatly reduces RBC, platelet, and plasma S1P levels, and that S1P lyase deficiency increases serum S1P levels more than threefold and tissue S1P greatly, both resulting in profound lymphopenia resulting from ablation of the S1P gradient.^{6,11,32,33,37} Current literature predicts that combined loss of the S1P gradient and MK S1P production should result in equally profound thrombocytopenia from additive effects of defective PP formation and fragmentation (Figure 1A).^{1,20-22} We were therefore surprised to observe that peripheral blood platelet counts in mice lacking S1P in both plasma and MKs (*Sphk1^{f/f}:2^{f/f}:Mx1Cre⁺*) were instead higher than in littermate controls, whereas alternative S1P gradient disruption with S1P lyase deficiency (*Sgpl1^{-/-}*) had no

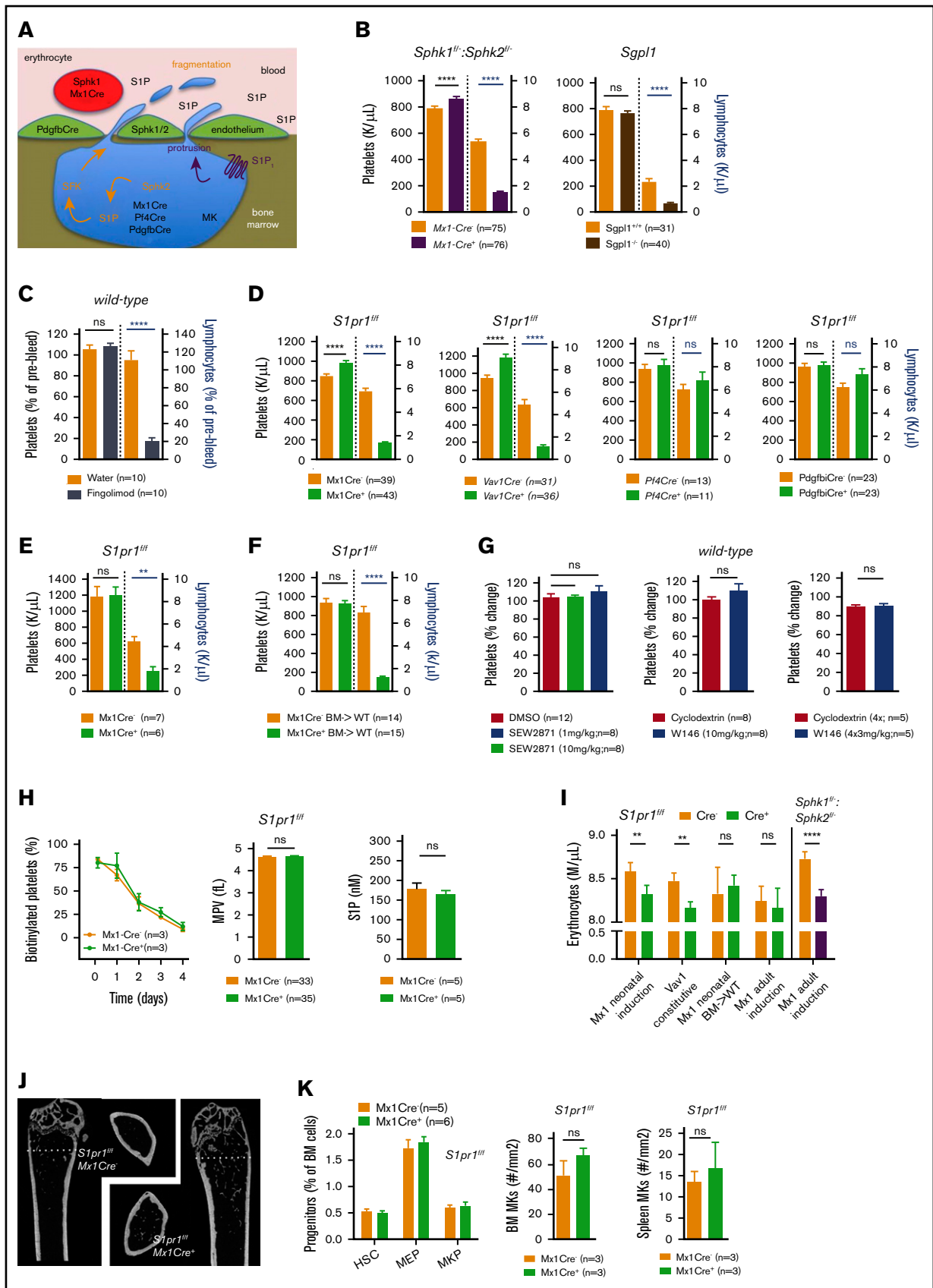


Figure 1.

effect on platelet counts, despite expected lymphopenia in both models (Figure 1B). Murine thrombopoiesis is therefore critically dependent neither on the S1P gradient²⁰ nor on MK S1P production.²²

S1P₁ suppresses platelet production by a non-cell-autonomous mechanism

We next asked if S1P₁ promotes platelet production independent of gradient sensing. Fingolimod both activates and desensitizes S1P₁, thus disrupting S1P₁-mediated S1P sensing. Administration of fingolimod (2 mg/L) to the drinking water of wild-type mice for 1 week impaired lymphocyte trafficking, but had no effect on platelet counts (Figure 1C). Postnatal deletion of *S1pr1* in hematopoietic and other Mx1Cre-sensitive cells also yielded profound lymphopenia, but unexpectedly, a significant increase rather than a decrease in platelet counts (Figure 1D). This was replicated by constitutive pan-hematopoietic deletion of *S1pr1* with Vav1Cre, whereas restricted deletion in MKs with Pf4Cre³⁵ or endothelial cells and a subset of MKs with PdgfbCre³⁸ had no effect on platelet or lymphocyte counts (Figure 1D). When Mx1Cre-mediated *S1pr1* excision was induced in adulthood or when *S1pr1^{fl/fl}Mx1Cre⁺* BM cells were transplanted into lethally irradiated wild-type recipients, we observed lymphopenia but not thrombocytosis (Figure 1E-F). This argued that hematopoietic S1P₁ signaling has an indirect and delayed negative effect on platelet production. Concordantly, 24-hour platelet counts were not altered by selective S1P₁ agonism (SEW2871; 1 or 10 mg/kg) or antagonism (W146; 10 mg/kg³⁹ or 4 × 3 mg/kg at 6-hour intervals²⁰; Figure 1G), although SEW2871 did induce transient lymphopenia and W146 vascular leak, as has been reported (supplemental Figure 1A-C).^{40,41} Mx1Cre-mediated *S1pr1* deletion did not affect platelet half-life or size, nor plasma S1P levels, consistent with a role in megakaryopoiesis (Figure 1H). Neonatal and constitutive hematopoietic *S1pr1* deletion also yielded a significant reduction in RBC counts that was neither conferred by BM transplantation nor induced with Mx1Cre-mediated *S1pr1* deletion in adulthood, but was also observed with neonatal *Sphk1&2* deletion (Figure 1I). This may suggest that S1P₁ signaling influences fate decisions of a common progenitor, although delayed effects could also reflect

indirect roles of hematopoietic S1P₁ signaling in bone development or tissue distribution of progenitors.⁴²⁻⁴⁵ As Mx1Cre is active in osteoclasts and deletion of *S1pr1* in osteoclasts has been demonstrated to increase their attachment to the bone surface, triggering osteoporosis,⁴⁶ we evaluated bone density in neonatally induced *S1pr1^{fl/fl}Mx1Cre⁺* mice. If anything, microcomputed tomography analysis suggested a modest increase in bone density in young adults (Figure 1J; supplemental Figure 2), unlikely to directly affect megakaryopoiesis.⁴⁷ Although we did not observe a significant effect of S1P₁ deficiency on the number of hematopoietic stem cells, MK-erythroid progenitors, or MKPs in BM, a modest increase in the abundance of MKs in BM and spleen was nevertheless suggestive of an increase in megakaryopoiesis sufficient to explain the increase in platelet counts (Figure 1K; supplemental Figure 3). Collectively, these observations argue that not only is S1P₁ dispensable for thrombopoiesis, but also that it is a net negative regulator of platelet production.

S1P₁ is not expressed in murine MKs

As our findings directly contradict the critical role reported for S1P₁ in MKs,²⁰ we next addressed the efficiency of our genetic approaches. S1P₁ was undetectable on *S1pr1^{fl/fl}Pf4Cre⁺* and *S1pr1^{fl/fl}Mx1Cre⁺* splenic and BM MKs (Figure 2A). Surprisingly, we also did not observe MK S1P₁ in controls, despite readily detectable *S1pr1*-dependent endothelial immunostaining (Figure 2A; supplemental Figure 4). To address if S1P₁ was functionally expressed below the detection limit of our immunostaining, we visualized S1P₁ signaling in BM, spleen, and liver of naive and S1P₁ agonist-treated S1P₁ signaling reporter mice.³⁴ Nuclear GFP accumulation reflected S1P₁ signaling in a subset of endothelial cells and hematopoietic cells in BM and spleen that appeared more abundant after treatment with fingolimod and the S1P₁ selective agonists RP001, both of which also induced marked GFP accumulation in hepatocytes (Figure 2B; supplemental Figure 5). In contrast, MKs were consistently GFP negative, independent of treatment. Moreover, consistent with reported downregulation of S1P₁ transcription with progenitor cell commitment to the MK lineage,²³ BM-derived MKs expressed S1P₂ and S1P₄, but no detectable S1P₁ (Figure 2C). The same primers readily amplified S1P₁ from total lung cDNA (not

Figure 1. MK S1P, S1P, S1P, and the S1P gradient are dispensable for platelet production in mice. (A) Current literature suggests that S1P supports platelet production by 2 independent mechanisms: S1P₁ senses the S1P gradient to promote PP extensions toward blood sinusoids (purple) and further supports fragmentation, and S1P supports platelet fragmentation by receptor-independent promotion of Src family kinase (SFK) expression and activation in MKs (orange). Removal of the S1P gradient and MK S1P production would thus be predicted to have cumulative effects on platelet production. Target cells of Cre alleles used in this study are indicated. (B) Peripheral blood platelet and lymphocyte counts in mice with combined loss of lymphatic endothelium and hematopoietic S1P production (*Sphk1^{fl/fl}:2^{fl/fl}:Mx1Cre⁺*) and with alternative gradient ablation by impaired S1P breakdown (*Sgpl1^{-/-}*). (C) Relative changes in the same cell populations after supplying the functional S1P₁ antagonist fingolimod (2 mg/L) in the drinking water of wild-type mice for 1 week. (D) Platelet and lymphocyte counts in mice after deletion of *S1pr1* in hematopoietic and other cells (postnatal induction, *Mx1Cre⁺*), in all hematopoietic cells (constitutive deletion, *Vav1 Cre⁺*), in MKs (constitutive deletion; *Pf4Cre⁺*), or endothelial cells and MKs (postnatal induction, *PdgfbCreERT2⁺*). (E-F) Platelet and lymphocyte counts in adult *S1pr1^{fl/fl}:Mx1Cre^{+/-}* mice 1 month after 3 consecutive injections of Poly IC (E) or in lethally irradiated wild-type mice 1 month after transfusion of *S1pr1^{fl/fl}:Mx1Cre^{+/-}* BM cells (F). (G) Relative change in platelet counts 24 hours after injections of the S1P₁ agonist SEW2871 or antagonist W146 or respective vehicle controls, as indicated (W146 was injected either as a single bolus [middle] or at 0, 6, 12, and 18 hours [right]). Lymphocyte counts and acute effects of drug treatment in supplemental Figure 1. (H) Platelet half-life, mean platelet volume (MPV), and plasma S1P levels in *S1pr1^{fl/fl}:Mx1Cre⁺* mice. (I) RBC counts in mice with hematopoietic deletion of *S1pr1* or *Sphk1&2* (the same mice as in Figure 1D, 1F, 1E, and 1B, respectively). (J) Representative microcomputed tomography images of femurs from *S1pr1^{fl/fl}:Mx1Cre⁺* mice and littermate controls. Representative coronal and transverse sections (approximate area indicated) are shown, quantification in supplemental Figure 2. (K) BM progenitors as percentage of total bone marrow cells and MK density in BM and spleen of *S1pr1^{fl/fl}:Mx1Cre⁺* mice. Representative images in supplemental Figure 3. All animals are compared with their respective littermate controls, n indicates the number of animals from which samples were obtained, mean + standard error of the mean shown. Statistical analyses by Mann-Whitney *U* test. ns, not significant.

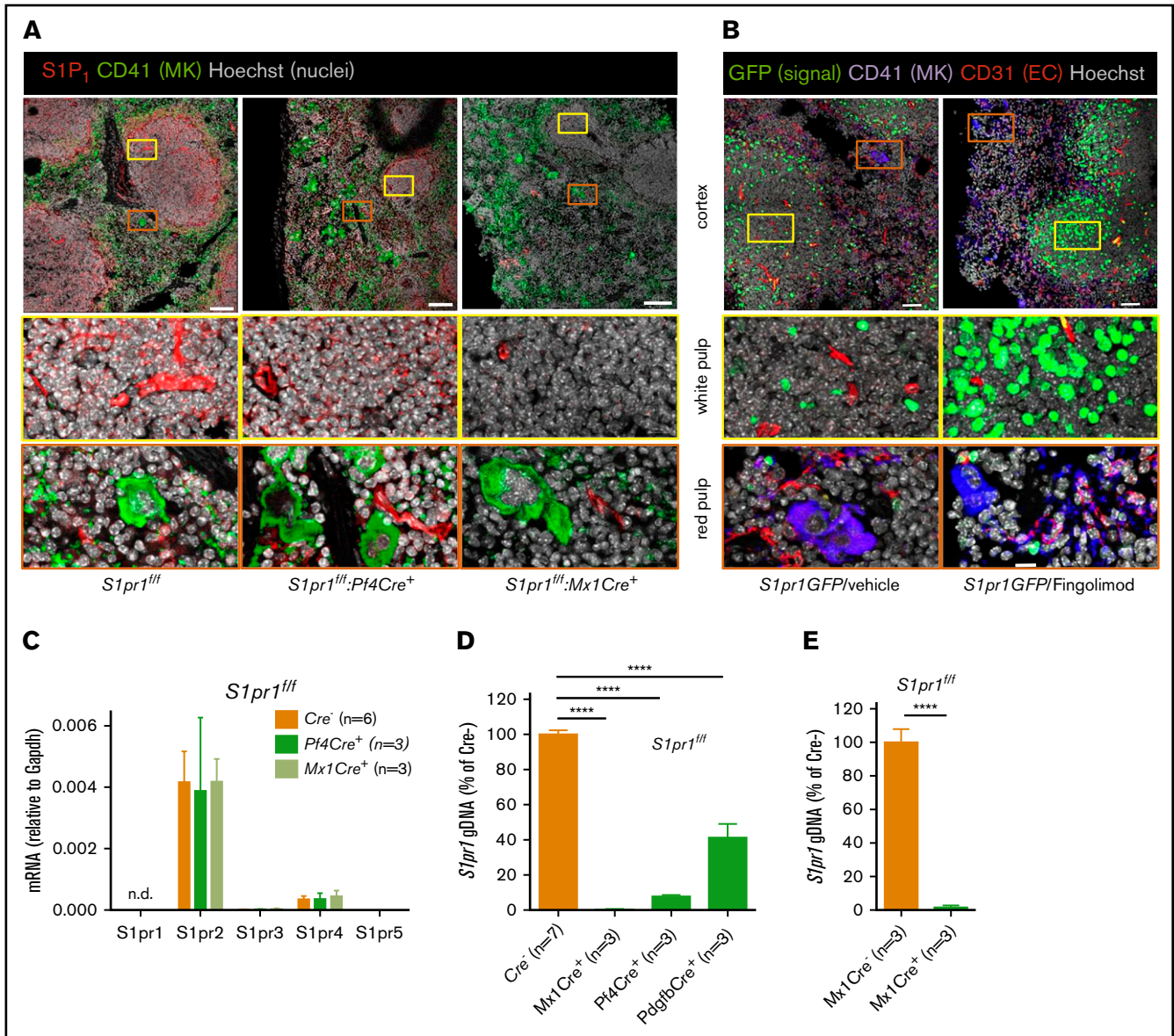


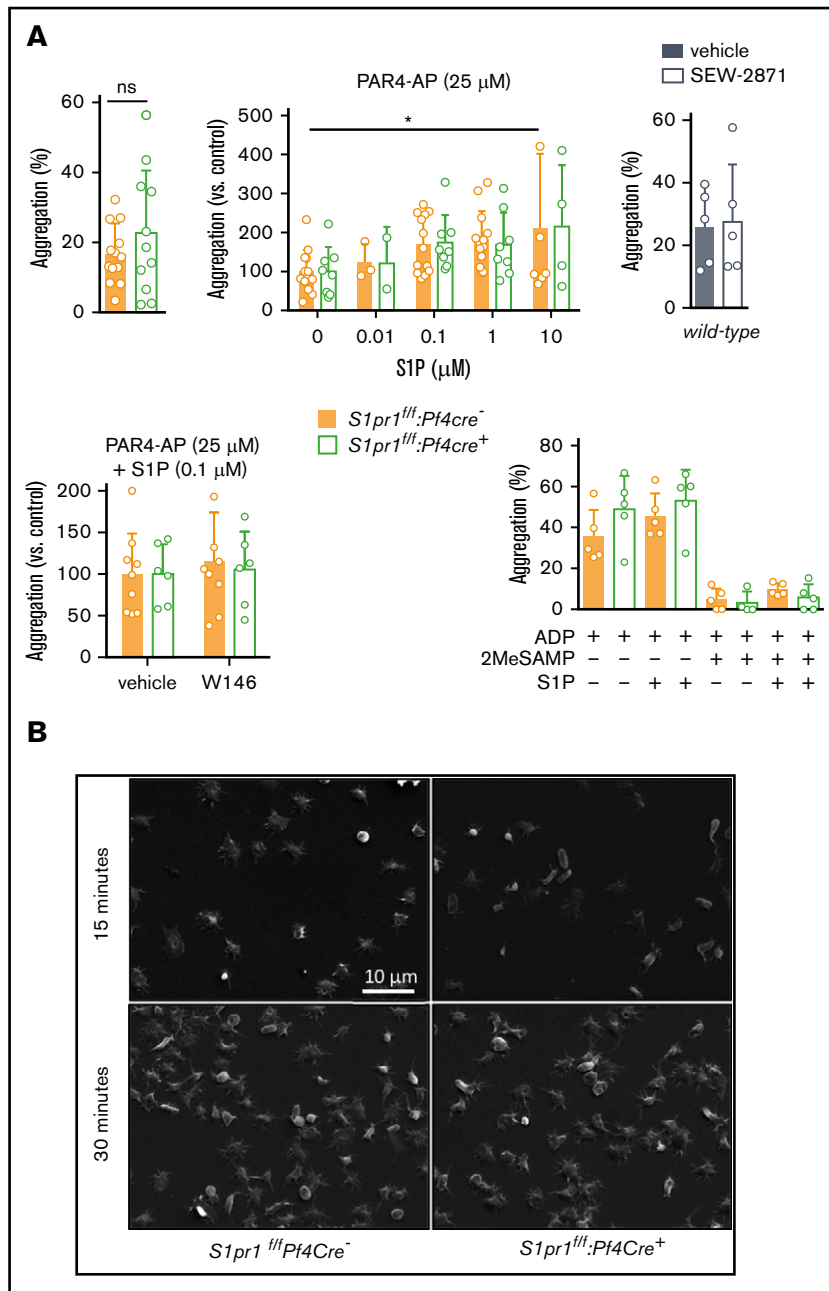
Figure 2. S1P₁ is not expressed in murine MKs. (A) Expression of S1P₁ (red) and the MK marker CD41 (green) in spleen of mice with or without MK-selective (*S1pr1^{fl/fl};Pf4Cre⁺*) or pan-hematopoietic (*S1pr1^{fl/fl};Mx1Cre⁺*) S1P₁ deletion. Note S1P₁ expression in blood vessels and white pulp, but not in MKs, irrespective of gene deletion. Scale bars represent 50 μ m. (B) Constitutive (left) and fingolimod-induced (1 mg/kg, 24 hours; right) S1P₁ signaling in spleens of S1P₁ signaling reporter mice.³⁴ Note constitutive and fingolimod-enhanced S1P₁ signaling (reflected by nuclear GFP accumulation in green) in blood vessels (in red) and cells within the white pulp, but not MKs (in blue). Scale bars represent 50 μ m. (C) Abundance of S1PR transcripts in BM-derived MKs from *S1pr1*-deficient mouse lines relative to *Gapdh*. Note lack of *S1pr1* expression (mRNA) or compensatory upregulation of other receptors after 3 days of culture. (D) Abundance of nonexcised *S1pr1* in genomic DNA (gDNA) from BM-derived MKs from *S1pr1*-deficient mouse lines after 5 days of culture relative to pooled *S1pr1^{fl/fl}* littermate controls. (E) Relative abundance of nonexcised *S1pr1* in genomic DNA from freshly isolated BM cells from *S1pr1*-deficient mice passed through 70- μ m filters. Statistical analysis by Mann-Whitney *U* test. n.d., not detectable.

shown). Transcriptional analysis also did not reveal compensatory upregulation of other S1P receptors in the absence of S1P₁ (Figure 2C). Analysis of genomic DNA from BM-derived MKs from the same lines showed more than 98%, more than 90%, and more than 50% excision of *S1pr1* with Mx1Cre, Pf4Cre, and PdgfbCre, respectively (Figure 2D). As ~70% of fluorescence-activated cell sorter sortable cells (including progenitors and excluding very mature MKs) from these cultures expressed CD41,

we conclude that Mx1Cre and Pf4Cre both yielded near complete genomic excision in MKs, whereas excision with PdgfbCre was either partial or more restricted to mature MKs. Accordingly, PdgfbCre showed partial activation of an eYFP reporter in splenic MKs (supplemental Figure 6). This argues that S1P₁ is not expressed on murine MKs, militating against even a nonessential role for MK S1P₁ in thrombopoiesis, and further arguing that increased platelet counts observed with pan-hematopoietic S1P₁ deficiency reflect actions in MK progenitors.

Figure 3. Platelet S1P₁ is dispensable for platelet aggregation and spreading in mice. Platelets from mice in which *S1pr1* was deleted in MKs (*S1pr1^{flf}:Pf4Cre⁺*; green), littermate controls (orange), or wild-type mice (gray) were isolated, washed, and tested for their capacity to aggregate (A) and spread (B).

(A, upper) Platelet aggregation in response to submaximal concentrations (25 μM) of PAR4-AP (thrombin receptor agonist) in the absence (left) or presence of exogenous S1P (0.1-10 μM; middle) or of S1P₁ agonist SEW-2871 (0.5 μM; right). (A, lower) Platelet aggregation in response to submaximal PAR4-AP in the presence of S1P (0.1 μM) in the presence or absence of S1P₁ antagonist W146 (10 μM; left) or in response to the weak platelet agonist ADP (2 μM; right), with and without exogenous S1P (10 μM) or P2Y12 antagonism (2MeSAMP, 40 μM) to address potential redundancy with P2Y12, which, similar to S1P₁, is Gα_i coupled. (B) Representative scanning electron microscopy images (upper) showing the extent of platelet spreading 15 and 30 minutes after plating on fibrinogen in the presence of S1P (0.5 μM; quantification in supplemental Figure 7). Note that although S1P did not trigger aggregation (not shown), it slightly increased PAR4-AP induced aggregation. However, neither aggregation nor spreading was influenced by selective S1P₁ modulation or *S1pr1* deficiency. S1P also could not compensate for the absence of functional P2Y12 by alternative engagement of Gα_i. Statistical analyses by 2-way analysis of variance or the Mann-Whitney *U* test, as appropriate. Mean ± standard deviation is shown, symbols represent the number of mice.



S1P₁ is dispensable for activation and spreading of mouse platelets

These results also question a reported role for S1P₁ in platelet aggregation and thrombosis in mice.⁷ S1P alone did not trigger aggregation of washed murine platelets (not shown), although it slightly enhanced PAR4 activating peptide (PAR4-AP)-induced aggregation (Figure 3A). This effect of S1P persisted in the absence of *S1pr1*, and pharmacologic S1P₁ modulators did not affect PAR4-AP-induced platelet aggregation (Figure 3A). S1P₁ deficiency also did not affect ADP-induced platelet aggregation in the presence or absence of exogenous S1P at a concentration suggested to modulate platelet activation,⁷ even when sensitizing the system by inhibiting P2Y12-mediated Gα_i activation with

2MeSAMP. Platelet adhesion and spreading on fibrinogen were also unaffected by *S1pr1* deletion, S1P addition, or S1P₁ antagonism (Figure 3B; supplemental Figure 7). Thus, aggregation, spreading, and thrombosis phenotypes reported in *Sphk*-deficient platelets^{6,7} and mice⁷ likely reflect on activation of a different receptor, receptor-independent effects, or thrombocytopenia,²² rather than on a role for S1P₁ in platelet activation.⁷

Deregulated S1P production by Mx1Cre-sensitive hematopoietic cells suppresses thrombopoiesis in *Sphk2*^{-/-} mice

Increased platelet counts in *Sphk1^{fl/-}:2^{fl/-}:Mx1Cre⁺* mice (Figure 1B) not only argue against a necessary role for the S1P gradient²⁰ but also

against a necessary intracellular, receptor-independent role for S1P in platelet production.²² The latter was deduced from the observation that mice globally deficient in Sphk2 display relative thrombocytopenia and defective PP fragmentation.²² We confirmed a 25% reduction in circulating platelets and a slight increase in mean platelet volume (MPV) in *Sphk2*^{-/-} mice; an intermediate phenotype in *Sphk2*^{+/-} littermates suggested a dose-dependent effect of Sphk2 deficiency (Figure 4A). As reported, the phenotype was present, although less profound, when the line was inbred to C57BL/6J background, and Sphk1 deficiency did not influence platelet counts despite being associated with a ~50% reduction in plasma S1P levels (supplemental Figure 8A).²² Bone density, BM progenitors, platelet life span, and spleen size were unaltered, and genotype-dependent differences in platelet counts persisted after splenectomy (supplemental Figure 8B-F). Despite thrombocytopenia, MK numbers were higher in spleen and BM, consistent with a defect in thrombopoiesis (supplemental Figure 8G-H).²² Although PPs appeared larger, as reported by Zhang et al,²² we did not observe a decrease in the capacity of fetal liver-derived MKs to produce PPs and shed platelets (supplemental Figure 8I). Concordantly, isolated deletion of *Sphk2* in MKs had no effect on platelet counts (Figure 4B). Consistent with a paracrine effect of Sphk2 deficiency on MK function, *Sphk2* deletion with Lyve1Cre, active in lymphatic endothelial cells, some blood endothelial cells, macrophages, and other CD45+ cells,⁴⁸ did reduce platelet counts (Figure 4B). This presented the possibility that the apparent increase in platelet counts in plasma S1Pless mice (*Sphk1*^{fl/fl}:*Sphk2*^{fl/fl}:*Mx1Cre*⁺; Figure 1B) represented a rescue of *Sphk2*^{+/-}-induced thrombocytopenia (Figure 4A) with pan-hematopoietic Sphk1 deficiency. This would imply that the *Sphk2*^{-/-} phenotype results from a redistribution of sphingosine toward Sphk1 rather than from loss of Sphk2-derived S1P (Figure 4C).¹⁶ Consistent with this notion, sphingosine did not build up in BM cells, as observed in plasma and RBCs of *Sphk2*^{-/-} mice; Sphk1 expression remained unaltered (Figure 4D).⁹ To test this possibility more directly, we deleted *Sphk1* in Mx1Cre-sensitive cells in a background globally deficient in Sphk2 (*Sphk1*^{fl/fl}:*Sphk2*^{-/-}:*Mx1Cre*⁺). Consistent with our hypothesis, this returned platelet counts to wild-type levels (Figure 4E). The rescue was conferred by bone marrow transplantation (Figure 4F), but was not reproduced with selective Sphk1 deletion in MKs in a *Sphk2*^{-/-} background (Figure 4G). Compound deletion of the 2 kinases did not significantly affect MKP numbers or platelet life span, and therefore did not appear to provide rescue by an independent mechanism (Figure 4H). Thus, instead of reflecting on a critical intracellular signaling role for Sphk2-derived S1P in MKs, thrombocytopenia in Sphk2-deficient mice appears to arise from paracrine effects of S1P generated on redistribution of hematopoietic cell sphingosine to Sphk1.

Deregulated S1P production suppresses thrombopoiesis via S1P₂

The above results suggest that Sphk2 deficiency induces thrombocytopenia by a receptor-dependent mechanism, and we further show that S1P₁ can suppress megakaryopoiesis. However, S1P₁ antagonism did not ameliorate thrombocytopenia in *Sphk2*^{-/-} mice, whereas antagonism of S1P₂, which is expressed on murine MKs (Figure 2C),^{20,23} did (Figure 5A). S1P₂ deficiency did not by itself affect platelet production (Figure 5B), but when *S1pr2*^{+/-} intercrosses were performed in an *Sphk2*^{-/-} background, S1P₂ deficiency rescued *Sphk2*^{-/-}-induced thrombocytopenia (Figure 5C).

Conversely, when *Sphk2*^{+/-} intercrosses were performed in an *S1pr2*^{-/-} background, Sphk2 deficiency no longer induced thrombocytopenia (Figure 5D vs Figure 4A). MPVs were also normalized by S1P₂ deficiency (Figure 5C-D). Transmission electron microscopy revealed a high density of MKs in *Sphk2*^{-/-} BM (Figure 5E). Among these, we observed peri-sinusoidal MKs with scarce demarcation membrane systems (DMS), poorly resolved DMS regions sometimes without granules, and low-contrast MK “ghosts” that appeared to be undergoing necrosis. This contrasted with *Sphk2*^{+/+}:*S1pr2*^{+/+} and *Sphk2*^{-/-}:*S1pr2*^{-/-} BM, in which most mature MKs were large with well-defined DMS. This suggests that aberrant S1P₂ activation impairs MK maturation. S1P₂ is known to repel B cells when they encounter high S1P concentrations at the germinal center perimeter, a process that depends on Rho kinase, which also negatively regulates platelet formation by suppressing the actions of Rac1 and Cdc42 on cytoskeletal reorganization and microtubule assembly.^{17,49-51} Consistent with a role for the Rho pathway, the Rho kinase inhibitor Y-27632 significantly increased platelet counts in Sphk2-deficient mice with no effect on littermate controls (Figure 5F). Collectively, these observations suggest that Sphk1-derived S1P suppresses MK maturation in Sphk2-deficient mice by aberrant activation of S1P₂ and Rho kinase downstream.

Although compound deficiencies of Sphk1 and S1P₂ reversed Sphk2 deficiency-induced thrombocytopenia, it is noteworthy that neither fully normalized the MK phenotype in *Sphk2*^{-/-} mice. Neither compound deficiency eliminated the higher density of MKs in *Sphk2*^{-/-} spleens (supplemental Figure 9), compound Sphk1 deficiency did not normalize MPV in *Sphk2*^{-/-} mice (Figure 4E), *Sphk2*^{-/-} PP extensions appear thicker also ex vivo (supplemental Figure 8I²²), and Sphk-deficient platelets display defective activation and spreading ex vivo.^{6,22} These persistent phenotypes may reflect on imbalanced membrane lipids within *Sphk2*^{-/-} MKs and platelets, although not a simple buildup of upstream metabolites, as we observed a paradoxical decrease in sphingosine levels in Sphk-deficient platelets (Figure 5G).^{6,22}

Discussion

We here address roles for S1P in platelet production and function, using genetic and pharmacologic approaches in mice. Contrasting recent literature, our observations support neither a necessary role for the S1P gradient or MK/platelet S1P₁ in platelet production or aggregation nor a necessary intracellular signaling role for S1P in platelet production. They instead reveal that S1P₁ signaling continuously restrains megakaryopoiesis and that S1P₂ signaling can further suppress platelet production when sphingosine metabolism is disturbed in the hematopoietic niche.

Three recent reports have positioned S1P as a critical facilitator of platelet biogenesis and signaling by S1P₁-dependent attraction of PPs into BM sinusoids and subsequent shedding during platelet budding from MKs,²⁰ receptor-independent regulation of platelet shedding by Sphk2-derived S1P,²² and amplification of platelet aggregation by an autocrine S1P₁ activation loop acting downstream of conventional platelet agonists.⁷ Our observations do not fully support either model, and argue that S1P plays a limited role in platelet biology but major disturbances in S1P metabolism or signaling.

First, we do not observe a necessary role for S1P₁-mediated blood sensing in platelet formation. Genetic impairment of S1P provision to plasma or S1P breakdown in tissue, both with profound effects

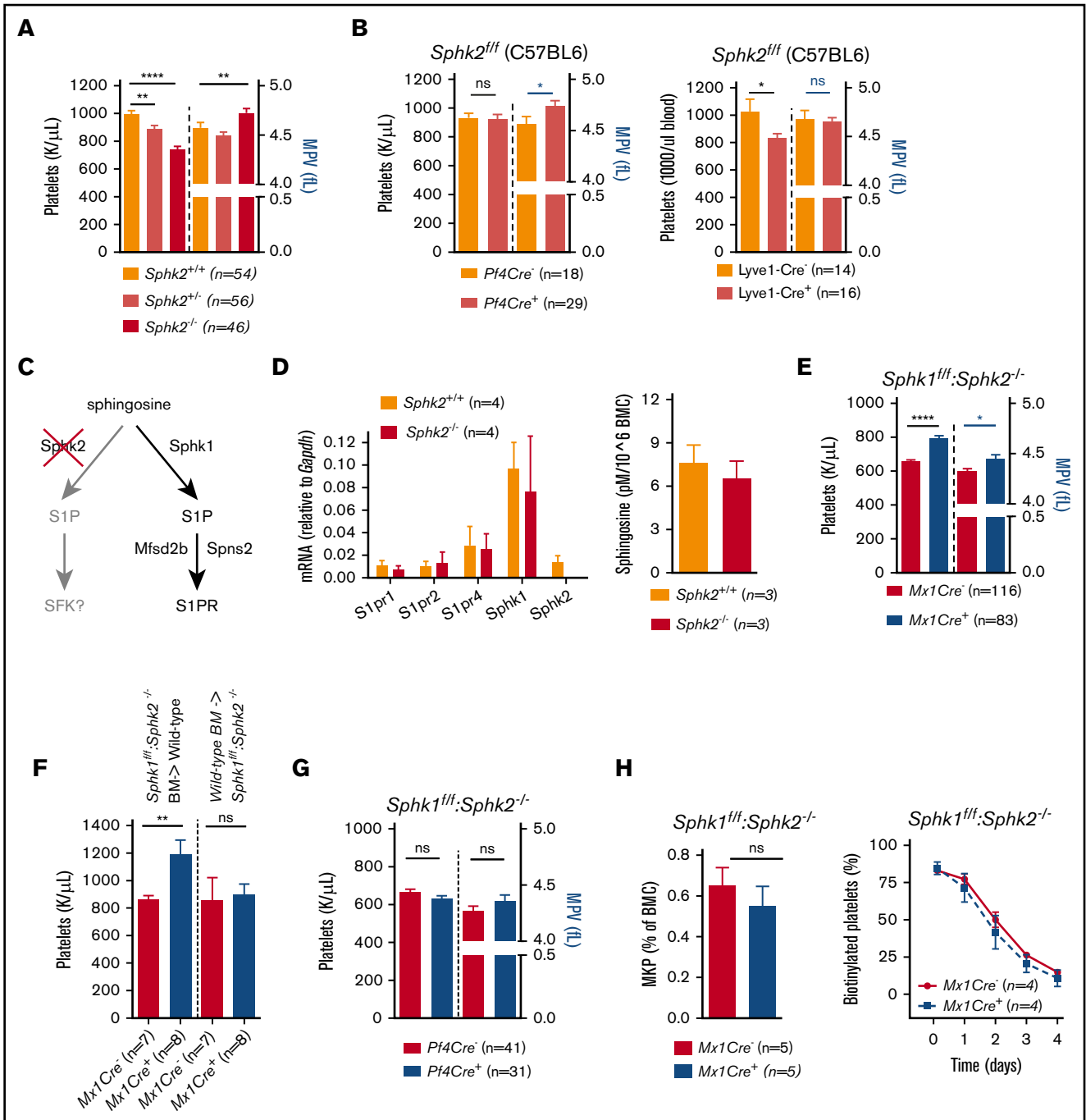


Figure 4. Sphk2 deficiency induces thrombocytopenia by redirection of sphingosine to Sphk1. (A-B) Platelet counts and MPV from *Sphk2* heterozygous intercrosses in C57BL/6J:129SVJ mixed background. (B) Effect of MK (Pf4Cre)- and lymphatic endothelium/CD45+ (Lyve1Cre)-selective *Sphk2* deletion on platelet counts. (C) Thrombocytopenia in *Sphk2*^{-/-} mice could be explained by redistribution of sphingosine to Sphk1 rather than by loss of Sphk2-derived S1P. This, in turn, could impair MK maturation by a receptor-dependent mechanism after S1P export by Spns2 or Mfsd2b, depending on cell type. (D) Impact of *Sphk2* deficiency on the expression of Sphks and S1PRs and levels of sphingosine in total bone marrow cells (S1P was below the detection threshold). (E) Effect of deletion of *Sphk1* in Mx1Cre-sensitive cells on *Sphk2* deficiency-induced thrombocytopenia and MPV. (F) Effect of transplantation of BM cells from mice lacking Sphk1&2 in Mx1Cre-sensitive cells to lethally irradiated wild-type recipients and vice versa on platelet counts in the host. Note that the rescue conferred by Sphk1 deficiency is BM cell-derived, as the *Sphk2*^{-/-} phenotype itself.²² (G) Effect of deletion of *Sphk1* in MKs on *Sphk2* deficiency-induced thrombocytopenia and MPV. (H) Effect of compound Sphk1 deficiency on MKP and platelet life span in *Sphk2*^{-/-} mice. Statistical analyses by Mann-Whitney *U* test or 2-way analysis of variance.

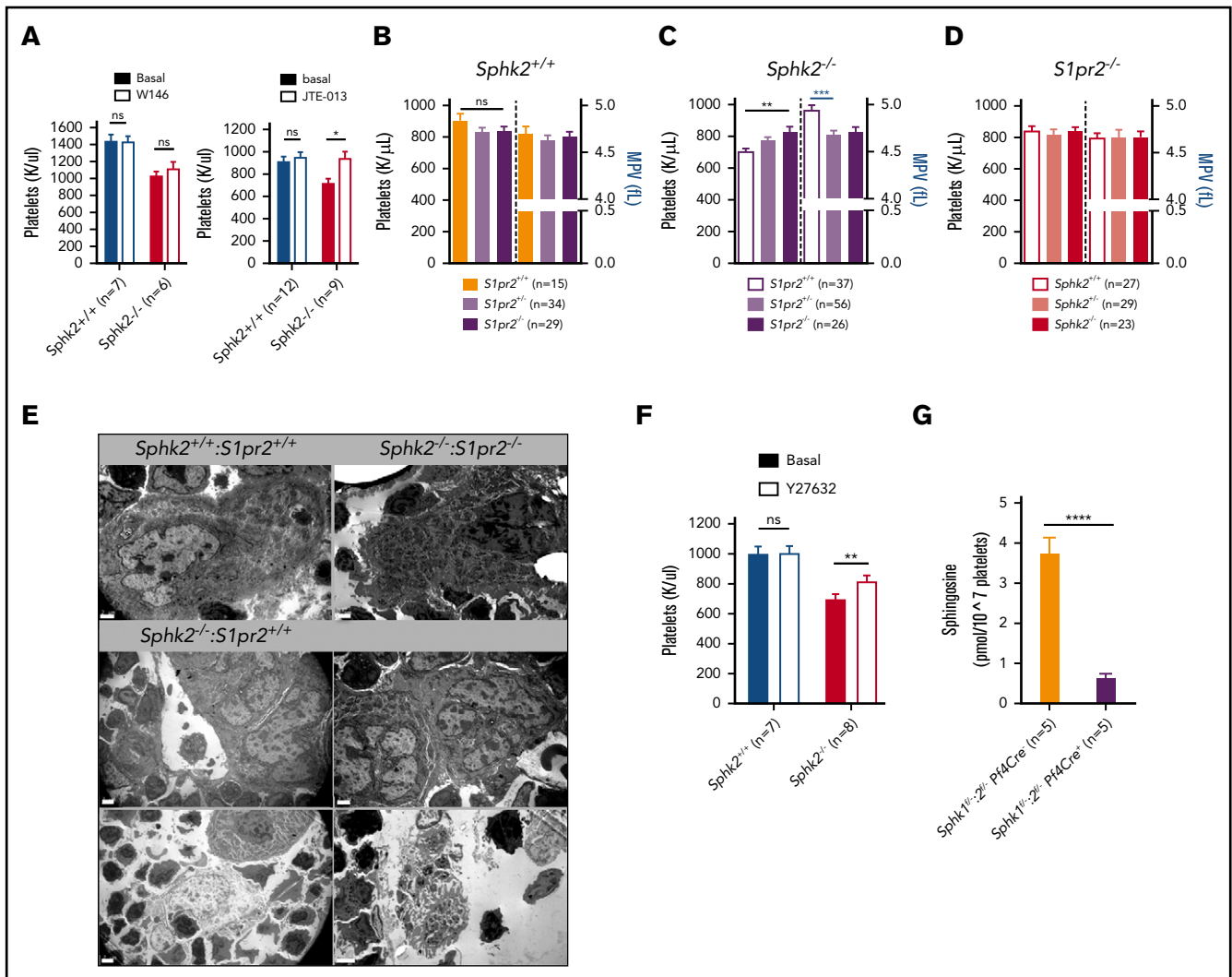


Figure 5. Sphk2 deficiency induces thrombocytopenia by aberrant S1P₂ activation. (A) Effects of S1P₁ (W146, 10 mg/kg, left) or S1P₂ (JTE-013, 1.2 mg/kg) antagonism on *Sphk2* deficiency-induced thrombocytopenia (24-hour platelet counts). (B-D) Platelet counts and MPV in litters from independent intercrosses of *S1pr2*^{+/-} in a wild-type background (B), *S1pr2*^{+/-} in a *Sphk2*-deficient background (C), and of *Sphk2*^{+/-} in a *S1pr2*-deficient background (D). Note that although *S1pr2* deficiency does not itself affect platelet counts, it rescues *Sphk2* deficiency-induced thrombocytopenia. (E) Transmission electron micrographs of bone marrow from *Sphk2*^{+/+}, *Sphk2*^{-/-}, and *Sphk2*^{-/-};*S1pr2*^{+/-} mice. Although the majority of MKs from *Sphk2*^{+/+} and *Sphk2*^{-/-};*S1pr2*^{+/-} mice were singular and large, with a mature appearance and well-defined demarcation membrane systems (upper), MKs in *Sphk2*^{-/-} were highly heterogeneous, with clusters of immature MKs or mature MKs with limited DMS next to blood sinusoids (middle), low-contrast MK “ghosts” that appeared to be undergoing necrosis (bottom left, next to a normal MK) and platelet release within the bone marrow (bottom right). Representative images from n = 4 mice per genotype are shown. Scale bars, 2 μ m. (F) Effect of a bolus injection of the Rho kinase inhibitor Y27632 (10mg/kg) on platelet counts in *Sphk2*^{-/-} and *Sphk2*^{+/+} controls. Note a significant increase in platelet counts only in the knockout. (G) Sphingosine content of *Sphk2* deficient platelets. Statistical analyses by 2-way analysis of variance (A,F) or the Mann-Whitney U test.

on lymphocyte trafficking, did not reduce platelet counts, nor did complete or partial deletion of MK *S1pr1* by 4 different transgenic approaches. Also at variance with Zhang et al,²⁰ we did not observe effects of S1P₁-selective pharmacological modulation on platelet counts when controlling for effects of vehicle and prior bleeding, nor did we confirm S1P₁ expression on murine MKs ex vivo or in situ. Our experiments were carried out in different strain backgrounds, littermate controlled, and sufficiently powered to reveal an important role for S1P gradient sensing. These observations are also in line with clinical experience, which has not revealed thrombocytopenia as an important adverse effect of S1P₁-targeting drugs.^{52,53}

In direct contrast, we observed elevated platelet counts with widespread neonatal deletion of either *Sphk1&2* or *S1pr1*. Although modest, this effect was highly significant and replicated with constitutive *S1pr1* deletion in hematopoietic cells, but not in MKs. Thrombocytosis was not conferred by transplantation of *S1pr1*-deficient bone marrow or induced with adult deletion or acute pharmacological S1P₁ modulation, suggesting developmental or delayed effects. A slight increase in MKs and a concomitant decrease in RBC counts suggested that S1P₁ may drive the differentiation of a common progenitor toward the erythroid lineage. Whether this reflects a direct role for S1P₁ signaling in cell fate decisions or indirect effects on the hematopoietic niche or stem cell trafficking^{42,45,46} remains to be determined.

Second, our results do not support a critical intracellular role for Sphk2-derived S1P in platelet production. As reported in a second Zhang et al study,²² we observed mild thrombocytopenia in *Sphk2*^{-/-} mice. Yet whereas Zhang et al deduced an intracellular role for Sphk2-derived S1P from observations in mice globally deficient in Sphk2, we did not reproduce thrombocytopenia with Pf4Cre-mediated selective deletion in MKs, even if this results in near complete loss of platelet S1P.⁶ Reversal of Sphk2 deficiency-induced thrombocytopenia with *Sphk1* deletion in hematopoietic cells further suggested that the phenotype reflected on an increase rather than a decrease in S1P production, a hypothesis substantiated by similar reversal with S1P₂ deficiency. Although our interpretation of how Sphk2 deficiency induces thrombocytopenia differs, detailed characterization of the phenotype by Zhang et al remains consistent with our data. Elegant 2-photon microscopy showed abnormal extension of proplatelets into BM sinusoids of *Sphk2*^{-/-} mice, followed by retraction without efficient platelet shedding.²² Our results suggest that the activation of S1P₂ and Rho kinase downstream could contribute to impaired platelet shedding, and that disturbed membrane lipid composition could also contribute to the gross aspects of the phenotype. S1P₂ has been reported to mediate blood repulsion in osteoclast precursors¹⁹ and to confine B cells to germinal centers by preventing their exit to high S1P environment.¹⁷ One could thus imagine high plasma S1P as observed in Sphk2-deficient animals to constitute a repulsive cue during platelet formation. Yet transfer of thrombocytopenia,²² but not high S1P levels,⁹ with transfer of *Sphk2*^{-/-} bone marrow cells does not support this model, and *Sphk2*^{-/-} PPs extended far into the bone marrow sinusoids before retracting.²² Impaired MK maturation was reminiscent of compound deficiency in *Cdc42* and *Rac1*, and our observations would be consistent with G $\alpha_{12/13}$ -coupled S1P₂ suppressing *Cdc42* and *Rac1* through RhoA, thus inhibiting terminal MK maturation or platelet shedding.^{20,49}

Third, our results argue against an important role for S1P₁ in amplifying platelet aggregation. Urtz et al reported protection from arterial thrombosis with global Sphk2 deficiency and reduced platelet aggregation in response to thrombin and other agonists in platelets derived from these mice.⁷ This phenotype was attributed to a lack of activation of platelet S1P₁ by platelet-derived S1P, based mainly on studies performed in human platelets or whole blood.⁷ Although we previously confirmed defective aggregation and spreading in Sphk-deficient platelets in the absence of exogenous S1P, we did not observe protection from thrombosis in mice with MK-selective Sphk deficiency.⁶ Our current study shows no effect of *S1pr1* deletion in assays in which we observed clear effects of Sphk deficiency,⁶ arguing against an autocrine platelet signaling loop involving S1P₁. S1P₁ modulation was shown to affect human platelet activation in whole blood,⁷ and it is possible that another S1P receptor takes on this function in mice, and that S1P₁ plays a more important role in humans. Yet as plasma S1P should already saturate S1P₁,^{54,55} it is unclear how platelets would sense further elevation of S1P levels after platelet activation by an S1P₁-dependent mechanism.

Whereas the current dogma would predict substantial effect of S1P₁ modulation on platelet counts and thrombosis, our observations argue that these effects are likely to be minimal. Even if developmental deficiency of S1P₁ in Mx1Cre-sensitive cells resulted in a modest increase in platelet counts, this was not

observed with adult deletion, and neither chronic treatment with oral fingolimod nor acute dosing with S1P₁ modulators had a measurable effect on platelet counts. In contrast, even partial deficiency in Sphk2 reduced platelet counts by redistribution of sphingosine to Sphk1, a kinase that is frequently upregulated in cancer, inflammation, and other disease conditions. Increased Sphk1 activity in cells within the hematopoietic niche capable of S1P export could thus be predicted to suppress platelet production. This could be relevant to cancer, Gaucher disease, and other conditions in which there is evidence of both S1P pathway deregulation and thrombocytopenia.⁵⁶

In conclusion, our observations argue that the S1P gradient and MK S1P₁ are both dispensable for platelet formation, and that S1P₁ is not critically involved in platelet activation or spreading in mice. Although it remains possible that S1P₁ is expressed and functional on human MKs and platelets, the current model, which predicts that S1P₁ modulation could be associated with a risk of bleeding and thrombosis, is based extensively on experiments performed in mice. The model therefore warrants revision, especially in light of clinical experience and with recent expansion of S1P₁-directed therapies to pathologies associated with considerable bleeding risk.

Acknowledgments

The authors thank the Cellular and Molecular Imaging Platform, CRP2-UMS 3612 CNRS-US25 Inserm-IRD-Université Paris Descartes, Blandine Dizier, and Paris Cardiovascular Research Center (PARCC) platform staff for support, Camille Brunaud (PARCC) and Philippe Rameau (Gustave Roussy, Integrated Biology Core Facility, Villejuif, France) for cell sorting and flow cytometry analysis, and William Vainchenker and Alain Schmitt for helpful advice.

This work was funded by The Leducq Foundation (SphingoNet) (R.L.P. and E.C.), the French National Research Agency (ANR-10-MIDI-0003) (E.C.), Fondation de France (E.C.), the Intramural Research Program of the National Institutes of Health, the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (R.L.P.), Higher Education Commission, Pakistan (H.N. and R.I.), the Marie Curie Prestige program (A.N.), the French Society of Arterial Hypertension (B.M.), and Promex Stiftung für die Forschung (B.D.).

H.N. is a graduate student at Paris Descartes University. This work is submitted in partial fulfillment of the requirement of the PhD.

Authorship

Contribution: H.N., N.Z., L.C., A.L., A.N., M.L.A., B.M., R.I., Y.A., P.H.B., S.L.G., S.P.-C., B.D., V.B., E.D.C., M.K., A.B., P.T., and E.C. designed and performed experiments and analyzed data; E.C., H.N., and A.N. wrote the manuscript; and M.L.A., M.K., P.G., P.-L.T., J.C., S.P., N.D., R.L.P., and C.B.-L. provided reagents and conceptual advice and critically reviewed the manuscript.

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

ORCID profiles: A.N., 0000-0003-0567-6790; E.D.C., 0000-0003-0942-2819; M.K., 0000-0003-2447-4350; P.G., 0000-0002-9139-2147; P.-L.T., 0000-0002-6062-5905; J.C., 0000-0003-3964-0921; R.L.P., 0000-0003-0456-1270; E.C., 0000-0002-6271-7125.

Correspondence: Eric Camerer, INSERM U970, Paris Cardiovascular Research Center, 56 Rue Leblanc, 75015 Paris, France; e-mail: eric.camerer@inserm.fr.

References

1. Proia RL, Hla T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J Clin Invest*. 2015;125(4):1379-1387.
2. Obinata H, Hla T. Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol*. 2012;34(1):73-91.
3. Mendelson K, Evans T, Hla T. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development*. 2014;141(1):5-9.
4. Olivera A, Mizugishi K, Tikhonova A, et al. The sphingosine kinase-sphingosine-1-phosphate axis is a determinant of mast cell function and anaphylaxis. *Immunity*. 2007;26(3):287-297.
5. Xiong Y, Yang P, Proia RL, Hla T. Erythrocyte-derived sphingosine 1-phosphate is essential for vascular development. *J Clin Invest*. 2014;124(11):4823-4828.
6. Gazit SL, Mariko B, Thérond P, et al. Platelet and erythrocyte sources of S1P are redundant for vascular development and homeostasis, but both rendered essential after plasma S1P depletion in anaphylactic shock. *Circ Res*. 2016;119(8):e110-e126.
7. Urtz N, Gaertner F, von Bruehl ML, et al. Sphingosine 1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 intrinsically controls platelet aggregation in vitro and in vivo. *Circ Res*. 2015;117(4):376-387.
8. Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol*. 2005;25(24):11113-11121.
9. Sensken SC, Bode C, Nagarajan M, Peest U, Pabst O, Gräler MH. Redistribution of sphingosine 1-phosphate by sphingosine kinase 2 contributes to lymphopenia. *J Immunol*. 2010;184(8):4133-4142.
10. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:69-94.
11. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*. 2007;316(5822):295-298.
12. Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, et al. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res*. 2008;102(6):669-676.
13. Hänel P, Andréani P, Gräler MH. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J*. 2007;21(4):1202-1209.
14. Vu TM, Ishizu AN, Foo JC, et al. Mfsd2b is essential for the sphingosine-1-phosphate export in erythrocytes and platelets. *Nature*. 2017;550(7677):524-528.
15. Mendoza A, Bréart B, Ramos-Perez WD, et al. The transporter Spns2 is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. *Cell Reports*. 2012;2(5):1104-1110.
16. Yanagida K, Hla T. Vascular and immunobiology of the circulatory sphingosine 1-phosphate gradient. *Annu Rev Physiol*. 2017;79(1):67-91.
17. Green JA, Suzuki K, Cho B, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P₂ maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat Immunol*. 2011;12(7):672-680.
18. Skoura A, Michaud J, Im DS, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(1):81-85.
19. Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med*. 2010;207(13):2793-2798.
20. Zhang L, Orban M, Lorenz M, et al. A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *J Exp Med*. 2012;209(12):2165-2181.
21. Hla T, Galvani S, Rafii S, Nachman R. S1P and the birth of platelets. *J Exp Med*. 2012;209(12):2137-2140.
22. Zhang L, Urtz N, Gaertner F, et al. Sphingosine kinase 2 (Sphk2) regulates platelet biogenesis by providing intracellular sphingosine 1-phosphate (S1P). *Blood*. 2013;122(5):791-802.
23. Golfier S, Kondo S, Schulze T, et al. Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P4. *FASEB J*. 2010;24(12):4701-4710.
24. Bigaud M, Guerini D, Billich A, Bassilana F, Brinkmann V. Second generation S1P pathway modulators: research strategies and clinical developments. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(5):745-758.
25. Pyne S, Adams DR, Pyne NJ. Sphingosine kinases as druggable targets [published online ahead of print 20 February 2018]. *Handb Exp Pharmacol*. doi:10.1007/164_2018_96.
26. Weske S, Vaidya M, Reese A, et al. Targeting sphingosine-1-phosphate lyase as an anabolic therapy for bone loss. *Nat Med*. 2018;24(5):667-678.
27. Zhu Z, Fu Y, Tian D, et al. Combination of the immune modulator fingolimod with alteplase in acute ischemic stroke: a pilot trial. *Circulation*. 2015;132(12):1104-1112.
28. Fu Y, Hao J, Zhang N, et al. Fingolimod for the treatment of intracerebral hemorrhage: a 2-arm proof-of-concept study. *JAMA Neurol*. 2014;71(9):1092-1101.
29. Allende ML, Tuymetova G, Lee BG, Bonifacino E, Wu YP, Proia RL. S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. *J Exp Med*. 2010;207(5):1113-1124.
30. Ramos-Perez WD, Fang V, Escalante-Alcalde D, Cammer M, Schwab SR. A map of the distribution of sphingosine 1-phosphate in the spleen. *Nat Immunol*. 2015;16(12):1245-1252.

31. Choi JW, Gardell SE, Herr DR, et al. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(2):751-756.
32. Allende ML, Bektas M, Lee BG, et al. Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking. *J Biol Chem*. 2011;286(9):7348-7358.
33. Camerer E, Regard JB, Cornelissen I, et al. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1871-1879.
34. Kono M, Tucker AE, Tran J, Bergner JB, Turner EM, Proia RL. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 reporter mice reveal receptor activation sites in vivo. *J Clin Invest*. 2014;124(5):2076-2086.
35. Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood*. 2007;109(4):1503-1506.
36. Schmitt A, Drouin A, Massé JM, Guichard J, Shagraoui H, Cramer EM. Polymorphonuclear neutrophil and megakaryocyte mutual involvement in myelofibrosis pathogenesis. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(4):719-724.
37. Bektas M, Allende ML, Lee BG, et al. Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver. *J Biol Chem*. 2010;285(14):10880-10889.
38. Claxton S, Kostourou V, Jadeja S, Chambon P, Hodivala-Dilke K, Fruttiger M. Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. *Genesis*. 2008;46(2):74-80.
39. Swendeman SL, Xiong Y, Cantalupo A, et al. An engineered S1P chaperone attenuates hypertension and ischemic injury. *Sci Signal*. 2017;10(492):eaal2722.
40. Sanna MG, Wang SK, Gonzalez-Cabrera PJ, et al. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. *Nat Chem Biol*. 2006;2(8):434-441.
41. Sanna MG, Liao J, Jo E, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13839-13848.
42. Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, et al. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell*. 2007;131(5):994-1008.
43. Joseph C, Quach JM, Walkley CR, Lane SW, Lo Celso C, Purton LE. Deciphering hematopoietic stem cells in their niches: a critical appraisal of genetic models, lineage tracing, and imaging strategies. *Cell Stem Cell*. 2013;13(5):520-533.
44. Sartawi Z, Schipani E, Ryan KB, Waeber C. Sphingosine 1-phosphate (S1P) signalling: Role in bone biology and potential therapeutic target for bone repair. *Pharmacol Res*. 2017;125(Pt B):232-245.
45. Golan K, Vagima Y, Ludin A, et al. S1P promotes murine progenitor cell egress and mobilization via S1P1-mediated ROS signaling and SDF-1 release. *Blood*. 2012;119(11):2478-2488.
46. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis [published correction appears in *Nature*. 2010;465(7300):966]. *Nature*. 2009;458(7237):524-528.
47. Rankin EB, Wu C, Khatri R, et al. The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO. *Cell*. 2012;149(1):63-74.
48. Pham TH, Baluk P, Xu Y, et al. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J Exp Med*. 2010;207(1):17-27.
49. Pleines I, Dütting S, Cherpokova D, et al. Defective tubulin organization and proplatelet formation in murine megakaryocytes lacking Rac1 and Cdc42. *Blood*. 2013;122(18):3178-3187.
50. Chang Y, Auradé F, Larbret F, et al. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood*. 2007;109(10):4229-4236.
51. Chen Z, Naveiras O, Balduini A, et al. The May-Hegglin anomaly gene MYH9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by the Rho-ROCK pathway. *Blood*. 2007;110(1):171-179.
52. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, et al; FREEDOMS Study Group. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362(5):387-401.
53. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al; TRANSFORMS Study Group. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362(5):402-415.
54. Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, et al. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science*. 1998;279(5356):1552-1555.
55. Rosen H, Sanna MG, Cahalan SM, Gonzalez-Cabrera PJ. Tipping the gatekeeper: S1P regulation of endothelial barrier function. *Trends Immunol*. 2007;28(3):102-107.
56. Mistry PK, Liu J, Sun L, et al. Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(13):4934-4939.

Références bibliographiques

- Aarts, P. A., P. A. Bolhuis, K. S. Sakariassen, R. M. Heethaar, et J. J. Sixma. 1983. « Red Blood Cell Size Is Important for Adherence of Blood Platelets to Artery Subendothelium ». *Blood* 62 (1): 214-17.
- Aburima, A., K. Walladbegi, J. D. Wake, et K. M. Naseem. 2017. « CGMP Signaling Inhibits Platelet Shape Change through Regulation of the RhoA-Rho Kinase-MLC Phosphatase Signaling Pathway ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 15 (8): 1668-78. <https://doi.org/10.1111/jth.13738>.
- Aburima, Ahmed, Katie S. Wraith, Zaher Raslan, Robert Law, Simbarashe Magwenzi, et Khalid M. Naseem. 2013. « CAMP Signaling Regulates Platelet Myosin Light Chain (MLC) Phosphorylation and Shape Change through Targeting the RhoA-Rho Kinase-MLC Phosphatase Signaling Pathway ». *Blood* 122 (20): 3533-45. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-487850>.
- Akand, M., E. Gencer, Ö Yaman, G. Erişgen, D. Tekin, et E. Özdiler. 2015. « Effect of Sildenafil on Platelet Function and Platelet CGMP of Patients with Erectile Dysfunction ». *Andrologia* 47 (10): 1098-1102. <https://doi.org/10.1111/and.12387>.
- Akkerman, J. W., et H. Holmsen. 1981. « Interrelationships among Platelet Responses: Studies on the Burst in Proton Liberation, Lactate Production, and Oxygen Uptake during Platelet Aggregation and Ca²⁺ Secretion ». *Blood* 57 (5): 956-66.
- Alderton, W K, C E Cooper, et R G Knowles. 2001. « Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. » *Biochemical Journal* 357 (Pt 3): 593-615.
- Alemanno, Laura, Isabella Massimi, Vanessa Klaus, Maria Guarino, Teresa Maltese, Luigi Frati, Dominick Angiolillo, et Fabio Pulcinelli. 2018. « Impact of Multidrug Resistance Protein-4 Inhibitors on Modulating Platelet Function and High on-Aspirin Treatment Platelet Reactivity ». *Thrombosis and Haemostasis*, février. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1629920>.
- Ally, A. I., et D. F. Horrobin. 1980. « Thromboxane A₂ in Blood Vessel Walls and Its Physiological Significance: Relevance to Thrombosis and Hypertension ». *Prostaglandins and Medicine* 4 (6): 431-38. [https://doi.org/10.1016/0161-4630\(80\)90051-8](https://doi.org/10.1016/0161-4630(80)90051-8).
- Anand, Abhinav, et G. N. Patey. 2018. « Molecular dynamics simulation of aspirin dissolution ». *Journal of Molecular Liquids*, Modern trends in theory of electrolyte solutions. In memory of Lesser Blum, 270 (novembre): 243-50. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.11.009>.
- Andrews, R. K., E. E. Gardiner, Y. Shen, J. C. Whisstock, et M. C. Berndt. 2003. « Glycoprotein Ib–IX–V ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (8): 1170-74. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00280-7).
- Anfossi, Giovanni, Isabella Russo, Paola Massucco, Luigi Mattiello, et Mariella Trovati. 2002. « Catecholamines, via Beta-Adrenoceptors, Increase Intracellular Concentrations of 3',5'-Cyclic Guanosine Monophosphate (CGMP) through Nitric Oxide in Human Platelets ». *Thrombosis and Haemostasis* 87 (3): 539-40.
- Annie-Jeyachristy, Sam, Geetha Arumugam, Surendran Rajagopal, Jeevan Kumar Subburayan, et Arulprakash Sarangapani. 2013. « Influence of Nitric Oxide and cGMP on Agonist-Induced Platelet Adhesion – An In Vitro Study in Platelets Isolated from Patients with Liver Cirrhosis / Uticaj Azot-Oksida I cGMP Na Adheziju Trombocita Izazvanu Agonistima – In Vitro Studija Na Izolovanim Trombocitima Pacijenata Sa Cirozom Jetre ». *Journal of Medical Biochemistry* 32 (1): 59-67. <https://doi.org/10.2478/v10011-012-0011-4>.
- Antl, Melanie, Marie-Luise von Brühl, Christina Eiglsperger, Matthias Werner, Ildiko Konrad, Thomas Kocher, Matthias Wilm, Franz Hofmann, Steffen Massberg, et Jens Schlossmann. 2007. « IRAG Mediates NO/CGMP-Dependent Inhibition of Platelet Aggregation and Thrombus Formation ». *Blood* 109 (2): 552-59. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-026294>.
- APT Collaboration. 1988. « Secondary prevention of vascular disease by prolonged antiplatelet treatment ». *British Medical Journal (Clinical research ed.)* 296 (6618): 320-31.
- Arias-Salgado, Elena G., Sergio Lizano, Sugata Sarkar, Joan S. Brugge, Mark H. Ginsberg, et Sanford J. Shattil. 2003. « Src Kinase Activation by Direct Interaction with the Integrin Beta Cytoplasmic

- Domain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (23): 13298-302. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336149100>.
- Aszódi, A, A Pfeifer, M Ahmad, M Glauner, X H Zhou, L Ny, K E Andersson, B Kehrel, S Offermanns, et R Fässler. 1999. « The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. » *The EMBO Journal* 18 (1): 37-48. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.37>.
- Atkinson, B. T., M. J. Stafford, C. J. Pears, et S. P. Watson. 2001. « Signalling Events Underlying Platelet Aggregation Induced by the Glycoprotein VI Agonist Convulxin ». *European Journal of Biochemistry* 268 (20): 5242-48. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02448.x>.
- Aubel, Rémon A. M. H. van, Pascal H. E. Smeets, Janny G. P. Peters, René J. M. Bindels, et Frans G. M. Russel. 2002. « The MRP4/ABCC4 Gene Encodes a Novel Apical Organic Anion Transporter in Human Kidney Proximal Tubules: Putative Efflux Pump for Urinary CAMP and CGMP ». *Journal of the American Society of Nephrology* 13 (3): 595-603.
- Ayala, Youhna M., Angelene M. Cantwell, Thierry Rose, Leslie A. Bush, Daniele Arosio, et Enrico Di Cera. 2001. « Molecular Mapping of Thrombin-Receptor Interactions ». *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 45 (2): 107-16. <https://doi.org/10.1002/prot.1130>.
- Barr, A. J., L. F. Brass, et D. R. Manning. 1997. « Reconstitution of Receptors and GTP-Binding Regulatory Proteins (G Proteins) in Sf9 Cells. A Direct Evaluation of Selectivity in Receptor.G Protein Coupling ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (4): 2223-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.4.2223>.
- Bauer, Jochen, Anne Ripperger, Stefan Frantz, Süleyman Ergün, Edzard Schwedhelm, et Ralf A Benndorf. 2014. « Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A2 receptor activation ». *British Journal of Pharmacology* 171 (13): 3115-31. <https://doi.org/10.1111/bph.12677>.
- Begonja, Antonija Jurak, Stepan Gambaryan, Harald Schulze, Sunita Patel-Hett, Joseph E. Italiano, John H. Hartwig, et Ulrich Walter. 2013. « Differential roles of cAMP and cGMP in megakaryocyte maturation and platelet biogenesis ». *Experimental hematology* 41 (1): 91-101.e4. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.09.001>.
- Behnke, O. 1969. « An Electron Microscope Study of the Rat Megakaryocyte. II. Some Aspects of Platelet Release and Microtubules ». *Journal of Ultrastructure Research* 26 (1): 111-29. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(69\)90039-2](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(69)90039-2).
- Belluci, S, et J Caen. 1985. « Les thrombopathies constitutionnelles ». *médecine/sciences* 1 (8): 404. <https://doi.org/10.4267/10608/3391>.
- Bennett, J. S., C. Chan, G. Vilaire, S. A. Mousa, et W. F. DeGrado. 1997. « Agonist-Activated Alphavbeta3 on Platelets and Lymphocytes Binds to the Matrix Protein Osteopontin ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (13): 8137-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8137>.
- Berkels, R., T. Klotz, G. Sticht, U. Englemann, et W. Klaus. 2001. « Modulation of Human Platelet Aggregation by the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor Sildenafil ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 37 (4): 413-21.
- Berndt, Michael C., et Robert K. Andrews. 2011. « Bernard-Soulier syndrome ». *Haematologica* 96 (3): 355-59. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.039883>.
- Best, Denise, Yotis A. Senis, Gavin E. Jarvis, Helen J. Eagleton, David J. Roberts, Takashi Saito, Stephanie M. Jung, et al. 2003. « GPVI Levels in Platelets: Relationship to Platelet Function at High Shear ». *Blood* 102 (8): 2811-18. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0231>.
- Bilodeau, Matthew L., et Heidi E. Hamm. 2007. « Regulation of Protease-Activated Receptor (PAR) 1 and PAR4 Signaling in Human Platelets by Compartmentalized Cyclic Nucleotide Actions ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322 (2): 778-88. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.121830>.

- Birnbaumer, Lutz, Stephen L. Pohl, et Martin Rodbell. 1969. « Adenyl Cyclase in Fat Cells I. Properties and the Effects of Adrenocorticotropin and Fluoride ». *Journal of Biological Chemistry* 244 (13): 3468-76.
- Blair, Price, et Robert Flaumenhaft. 2009. « Platelet Alpha-Granules: Basic Biology and Clinical Correlates ». *Blood Reviews* 23 (4): 177-89. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001>.
- Blanco, F. J., R. Guitian, J. Moreno, F. J. de Toro, et F. Galdo. 1999. « Effect of Antiinflammatory Drugs on COX-1 and COX-2 Activity in Human Articular Chondrocytes ». *The Journal of Rheumatology* 26 (6): 1366-73.
- Bledzka, Kamila, Jianmin Liu, Zhen Xu, H. Dhanuja Perera, Satya P. Yadav, Katarzyna Bialkowska, Jun Qin, Yan-Qing Ma, et Edward F. Plow. 2012. « Spatial Coordination of Kindlin-2 with Talin Head Domain in Interaction with Integrin β Cytoplasmic Tails ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (29): 24585-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.336743>.
- Bochner, F., G. G. Graham, B. E. Cham, D. M. Imhoff, et T. M. Haavisto. 1981. « Salicylate Metabolite Kinetics after Several Salicylates ». *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 30 (2): 266-75. <https://doi.org/10.1038/clpt.1981.158>.
- Booyse, F. M., et M. E. Rafelson. 1967. « Stable Messenger RNA in the Synthesis of Contractile Protein in Human Platelets ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 145 (1): 188-90. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(67\)90673-9](https://doi.org/10.1016/0005-2787(67)90673-9).
- Borgå, O., I. O. Cederlöf, V. A. Ringberger, et A. Norlin. 1976. « Protein Binding of Salicylate in Uremic and Normal Plasma ». *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 20 (4): 464-75. <https://doi.org/10.1002/cpt1976204464>.
- Borgognone, Alessandra, et Fabio Maria Pulcinelli. 2012. « Reduction of cAMP and cGMP Inhibitory Effects in Human Platelets by MRP4-Mediated Transport ». *Thrombosis and Haemostasis* 108 (5): 955-62. <https://doi.org/10.1160/TH12-04-0232>.
- Borst, P., J. Balzarini, N. Ono, G. Reid, H. de Vries, P. Wielinga, J. Wijnholds, et N. Zelcer. 2004. « The Potential Impact of Drug Transporters on Nucleoside-Analog-Based Antiviral Chemotherapy ». *Antiviral Research* 62 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.11.002>.
- Boullaran, Cédric, et Céline Gales. 2015. « Cardiac cAMP: Production, Hydrolysis, Modulation and Detection ». *Frontiers in Pharmacology* 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00203>.
- Builder, S. E., J. A. Beavo, et E. G. Krebs. 1980. « The Mechanism of Activation of Bovine Skeletal Muscle Protein Kinase by Adenosine 3':5'-Monophosphate. » *Journal of Biological Chemistry* 255 (8): 3514-19.
- Burke, John E., et Edward A. Dennis. 2009. « Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling ». *Journal of Lipid Research* 50 (Suppl): S237-42. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200>.
- Burkhardt, Julia M., Marc Vaudel, Stepan Gambaryan, Sonja Radau, Ulrich Walter, Lennart Martens, Jörg Geiger, Albert Sickmann, et René P. Zahedi. 2012. « The First Comprehensive and Quantitative Analysis of Human Platelet Protein Composition Allows the Comparative Analysis of Structural and Functional Pathways ». *Blood* 120 (15): e73-82. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-416594>.
- Busker, Mareike, Inga Neidhardt, et Sönke Behrends. 2014. « Nitric Oxide Activation of Guanylate Cyclase Pushes the α 1 Signaling Helix and the β 1 Heme-binding Domain Closer to the Substrate-binding Site ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (1): 476-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.504472>.
- Butt, E., K. Abel, M. Krieger, D. Palm, V. Hoppe, J. Hoppe, et U. Walter. 1994. « cAMP- and cGMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylation Sites of the Focal Adhesion Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP) in Vitro and in Intact Human Platelets ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (20): 14509-17.
- Bye, A. P., A. J. Unsworth, et J. M. Gibbins. 2016. « Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14 (5): 918-30. <https://doi.org/10.1111/jth.13302>.

- Campbell, Melody G., Eric S. Underbakke, Clinton S. Potter, Bridget Carragher, et Michael A. Marletta. 2014. « Single-particle EM reveals the higher-order domain architecture of soluble guanylate cyclase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (8): 2960-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400711111>.
- Canobbio, Ilaria, Cesare Balduini, et Mauro Torti. 2004. « Signalling through the Platelet Glycoprotein Ib-V-IX Complex ». *Cellular Signalling* 16 (12): 1329-44. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.05.008>.
- Carr, Marcus E. 2003. « Development of Platelet Contractile Force as a Research and Clinical Measure of Platelet Function ». *Cell Biochemistry and Biophysics* 38 (1): 55-78. <https://doi.org/10.1385/CBB:38:1:55>.
- Castleden, C. M., C. N. Volans, et K. Raymond. 1977. « The Effect of Ageing on Drug Absorption from the Gut ». *Age and Ageing* 6 (3): 138-43. <https://doi.org/10.1093/ageing/6.3.138>.
- Cavallini, Lucia, Mariagrazia Coassin, Alessio Borean, et Adolfo Alexandre. 1996. « Prostacyclin and Sodium Nitroprusside Inhibit the Activity of the Platelet Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor and Promote Its Phosphorylation ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (10): 5545-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5545>.
- Cerletti, Chiara, Giuseppe Dell'Elba, Stefano Manarini, Romina Pecce, Augusto Di Castelnuovo, Nicola Scorpiglione, Vincenzo Feliziani, et Giovanni de Gaetano. 2003. « Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Differences between Two Low Dosages of Aspirin May Affect Therapeutic Outcomes ». *Clinical Pharmacokinetics* 42 (12): 1059-70. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342120-00004>.
- Chandrasekharan, N. V., Hu Dai, K. Lamar Turepu Roos, Nathan K. Evanson, Joshua Tomsik, Terry S. Elton, et Daniel L. Simmons. 2002. « COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (21): 13926-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.162468699>.
- Cheepala, Satish B., Aaron Pitre, Yu Fukuda, Kazumasa Takenaka, Yuanyuan Zhang, Yao Wang, Sharon Frase, et al. 2015. « The ABCC4 Membrane Transporter Modulates Platelet Aggregation ». *Blood* 126 (20): 2307-19. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-595942>.
- Chen, Junmei, et José A. López. 2005. « Interactions of Platelets with Subendothelium and Endothelium ». *Microcirculation* 12 (3): 235-46. <https://doi.org/10.1080/10739680590925484>.
- Chen, Zhe-Sheng, Kun Lee, et Gary D. Kruh. 2001. « Transport of Cyclic Nucleotides and Estradiol 17- β -d-Glucuronide by Multidrug Resistance Protein 4 Resistance to 6-Mercaptopurine and 6-Thioguanine ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (36): 33747-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104833200>.
- Chen-Goodspeed, Misty, Abolanle N. Lukan, et Carmen W. Dessauer. 2005. « Modeling of Gas and Gai Regulation of Human Type V and VI Adenylyl Cyclase ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (3): 1808-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409172200>.
- Choi, Won-Seok, William J. Rice, David L. Stokes, et Barry S. Coller. 2013. « Three-dimensional reconstruction of intact human integrin α IIb β 3: new implications for activation-dependent ligand binding ». *Blood* 122 (26): 4165-71. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-499194>.
- Chyrchel, Bernadeta, Justyna Totoń-Żurańska, Olga Kruszelnicka, Michał Chyrchel, Waldemar Mielecki, Maria Kołton-Wróź, Paweł Wołkow, et Andrzej Surdacki. 2015. « Association of Plasma MiR-223 and Platelet Reactivity in Patients with Coronary Artery Disease on Dual Antiplatelet Therapy: A Preliminary Report ». *Platelets* 26 (6): 593-97. <https://doi.org/10.3109/09537104.2014.974527>.
- Colbran, J. L., S. H. Francis, A. B. Leach, M. K. Thomas, H. Jiang, L. M. McAllister, et J. D. Corbin. 1992. « A Phenylalanine in Peptide Substrates Provides for Selectivity between CGMP- and CAMP-Dependent Protein Kinases ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (14): 9589-94.

- Conti, Marco, Delphine Mika, et Wito Richter. 2014. « Cyclic AMP Compartments and Signaling Specificity: Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases ». *The Journal of General Physiology* 143 (1): 29-38. <https://doi.org/10.1085/jgp.201311083>.
- Cooper, J A, S J Hill, S P Alexander, P C Rubin, et E H Horn. 1995. « Adenosine receptor-induced cyclic AMP generation and inhibition of 5-hydroxytryptamine release in human platelets. » *British Journal of Clinical Pharmacology* 40 (1): 43-50.
- Coquil, J. F., D. J. Franks, J. N. Wells, M. Dupuis, et P. Hamet. 1980. « Characteristics of a New Binding Protein Distinct from the Kinase for Guanosine 3':5'-Monophosphate in Rat Platelets ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 631 (1): 148-65. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(80\)90063-x](https://doi.org/10.1016/0304-4165(80)90063-x).
- Corash, L., J. Levin, Y. Mok, G. Baker, et J. McDowell. 1989. « Measurement of Megakaryocyte Frequency and Ploidy Distribution in Unfractionated Murine Bone Marrow ». *Experimental Hematology* 17 (3): 278-86.
- Costa, N. Pinto Da, C. Armari-Alla, D. Plantaz, et A. Pagnier. 2003. « Syndrome de Bernard-Soulier révélé par une thrombopénie sévère en période néonatale ». [/data/revues/0929693x/v0010i11/03004871/](https://www.em-consulte.com/en/article/18540), août. <https://www.em-consulte.com/en/article/18540>.
- Coughlin, S. R. 2005. « Protease-Activated Receptors in Hemostasis, Thrombosis and Vascular Biology ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 3 (8): 1800-1814. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01377.x>.
- Coulon, Laurent, Catherine Calzada, Philippe Moulin, Evelyne Vérice, et Michel Lagarde. 2003. « Activation of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Cytosolic Phospholipase A2 Cascade in Hydroperoxide-Stressed Platelets ». *Free Radical Biology and Medicine* 35 (6): 616-25. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00386-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00386-1).
- Cramer, E. M., F. Norol, J. Guichard, J. Breton-Gorius, W. Vainchenker, J. M. Massé, et N. Debili. 1997. « Ultrastructure of Platelet Formation by Human Megakaryocytes Cultured with the Mpl Ligand ». *Blood* 89 (7): 2336-46.
- Cui, Liying, Yue-Xian Hou, John R. Riordan, et Xiu-bao Chang. 2001. « Mutations of the Walker B Motif in the First Nucleotide Binding Domain of Multidrug Resistance Protein MRP1 Prevent Conformational Maturation ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 392 (1): 153-61. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2441>.
- Dale, G. L., P. Friese, L. A. Hynes, et S. A. Burstein. 1995. « Demonstration That Thiazole-Orange-Positive Platelets in the Dog Are Less than 24 Hours Old ». *Blood* 85 (7): 1822-25.
- Dangelmaier, C., J. Jin, J. B. Smith, et S. P. Kunapuli. 2001. « Potentiation of Thromboxane A2-Induced Platelet Secretion by Gi Signaling through the Phosphoinositide-3 Kinase Pathway ». *Thrombosis and Haemostasis* 85 (2): 341-48.
- Daniel, J. L., C. Dangelmaier, J. Jin, B. Ashby, J. B. Smith, et S. P. Kunapuli. 1998. « Molecular Basis for ADP-Induced Platelet Activation. I. Evidence for Three Distinct ADP Receptors on Human Platelets ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (4): 2024-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2024>.
- Davì G, Aversa M, Catalano I, Barbagallo C, Ganci A, Notarbartolo A, Ciabattoni G, et Patrono C. 1992. « Increased thromboxane biosynthesis in type IIa hypercholesterolemia. » *Circulation* 85 (5): 1792-98. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.85.5.1792>.
- Davì, G., I. Catalano, M. Aversa, A. Notarbartolo, A. Strano, G. Ciabattoni, et C. Patrono. 1990. « Thromboxane Biosynthesis and Platelet Function in Type II Diabetes Mellitus ». *The New England Journal of Medicine* 322 (25): 1769-74. <https://doi.org/10.1056/NEJM199006213222503>.
- Davies, Neal M., Renee L. Good, Kathryn A. Roupe, et Jaime A. Yáñez. 2004. « Cyclooxygenase-3: Axiom, Dogma, Anomaly, Enigma or Splice Error?--Not as Easy as 1, 2, 3 ». *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques* 7 (2): 217-26.

- De Candia, Erica. 2012. « Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history ». *Thrombosis Research*, XI ETRO ADVANCED TEACHING COURSE "Thrombosis: a multidisciplinary approach" September 18-23, 2011, Campobasso, Italy, 129 (3): 250-56. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.11.001>.
- Debili, N., L. Coulombel, L. Croisille, A. Katz, J. Guichard, J. Breton-Gorius, et W. Vainchenker. 1996. « Characterization of a Bipotent Erythro-Megakaryocytic Progenitor in Human Bone Marrow ». *Blood* 88 (4): 1284-96.
- Decouture, Benoit, Pierre-Hadrien Becker, Patrice Therond, Pascale Gaussem, et Christilla Bachelot-Loza. 2018. « Evidence That MRP4 Is Only Partly Involved in S1P Secretion during Platelet Activation ». *Thrombosis and Haemostasis* 118 (6): 1116-18. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1641754>.
- Decouture, Benoit, Elise Dreano, Tiphaine Belleville-Rolland, Orjeta Kuci, Blandine Dizier, Amine Bazaa, Bérard Coqueran, et al. 2015. « Impaired platelet activation and cAMP homeostasis in MRP4-deficient mice ». *Blood* 126 (15): 1823-30. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-631044>.
- Deeley, Roger G., Christopher Westlake, et Susan P. C. Cole. 2006. « Transmembrane Transport of Endo- and Xenobiotics by Mammalian ATP-Binding Cassette Multidrug Resistance Proteins ». *Physiological Reviews* 86 (3): 849-99. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2005>.
- Degerman, Eva, Per Belfrage, et Vincent C. Manganiello. 1997. « Structure, Localization, and Regulation of CGMP-Inhibited Phosphodiesterase (PDE3) ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (11): 6823-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.6823>.
- Dejana, Elisabetta, Brunelia Barbieri, Chiara Cerletti, Manuela Livio, et Giovanni de Gaetano. 1980. « Impaired Thromboxane Production by Newly Formed Platelets after Aspirin Administration to Thrombocytopenic Rats ». *British Journal of Haematology* 46 (3): 465-69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1980.tb05994.x>.
- Demers, Laurence M., Robert E. Budin, et Bahu S. Shaikh. 1980. « The Effects of Aspirin on Megakaryocyte Prostaglandin Production ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 163 (1): 24-29. <https://doi.org/10.3181/00379727-163-40716>.
- Desborough, Michael J. R., et David M. Keeling. 2017. « The Aspirin Story - from Willow to Wonder Drug ». *British Journal of Haematology* 177 (5): 674-83. <https://doi.org/10.1111/bjh.14520>.
- Dessauer, Carmen W. 2009. « Adenylyl Cyclase–A-kinase Anchoring Protein Complexes: The Next Dimension in cAMP Signaling ». *Molecular Pharmacology* 76 (5): 935-41. <https://doi.org/10.1124/mol.109.059345>.
- Dessauer, Carmen W., John J. G. Tesmer, Stephen R. Sprang, et Alfred G. Gilman. 1998. « Identification of a G α Binding Site on Type V Adenylyl Cyclase ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (40): 25831-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25831>.
- DeWitt, D. L., E. A. el-Harith, S. A. Kraemer, M. J. Andrews, E. F. Yao, R. L. Armstrong, et W. L. Smith. 1990. « The Aspirin and Heme-Binding Sites of Ovine and Murine Prostaglandin Endoperoxide Synthases. » *Journal of Biological Chemistry* 265 (9): 5192-98.
- Diagouraga, Boubou, Alexei Grichine, Arnold Fertin, Jin Wang, Saadi Khochbin, et Karin Sadoul. 2014. « Motor-driven marginal band coiling promotes cell shape change during platelet activation ». *The Journal of Cell Biology* 204 (2): 177-85. <https://doi.org/10.1083/jcb.201306085>.
- Dierks, Elizabeth A., Songzhou Hu, Kathleen M. Vogel, Anita E. Yu, Thomas G. Spiro, et Judith N. Burstyn. 1997. « Demonstration of the Role of Scission of the Proximal Histidine–Iron Bond in the Activation of Soluble Guanylyl Cyclase through Metalloporphyrin Substitution Studies ». *Journal of the American Chemical Society* 119 (31): 7316-23. <https://doi.org/10.1021/ja9603057>.
- Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, et A. M. Zeiher. 1999. « Activation of Nitric Oxide Synthase in Endothelial Cells by Akt-Dependent Phosphorylation ». *Nature* 399 (6736): 601-5. <https://doi.org/10.1038/21224>.
- Dodge, Kimberly L., Samone Khouangsathiene, Michael S. Kapiloff, Robert Mouton, Elaine V. Hill, Miles D. Houslay, Lorene K. Langeberg, et John D. Scott. 2001. « mAKAP assembles a protein

- kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module ». *The EMBO Journal* 20 (8): 1921-30. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.8.1921>.
- Dong, Jing-fei, Shan Gao, et José A. López. 1998. « Synthesis, Assembly, and Intracellular Transport of the Platelet Glycoprotein Ib-IX-V Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (47): 31449-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.47.31449>.
- Dorn, G. W., et A. DeJesus. 1991. « Human Platelet Aggregation and Shape Change Are Coupled to Separate Thromboxane A₂-Prostaglandin H₂ Receptors ». *The American Journal of Physiology* 260 (2 Pt 2): H327-334. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.260.2.H327>.
- Dorsam, Robert T., Soochong Kim, Jianguo Jin, et Satya P. Kunapuli. 2002. « Coordinated Signaling through Both G_{12/13} and G_i Pathways Is Sufficient to Activate GPIIb/IIIa in Human Platelets ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (49): 47588-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208778200>.
- Doskeland, S. O. 1978. « Evidence That Rabbit Muscle Protein Kinase Has Two Kinetically Distinct Binding Sites for Adenosine 3' ; 5'-Cyclic Monophosphate ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 83 (2): 542-49. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(78\)91024-0](https://doi.org/10.1016/0006-291x(78)91024-0).
- Driver, Ben, Denese C. Marks, et Dianne E. van der Wal. 2019. « Not all (N)SAID and done: Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol intake on platelets ». *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 4 (1): 36-45. <https://doi.org/10.1002/rth2.12283>.
- Droller, M. J., et S. M. Wolfe. 1972. « Uncertain Role of CAMP in Platelet Function ». *The New England Journal of Medicine* 286 (17): 948-49. <https://doi.org/10.1056/NEJM197204272861714>.
- Du, Xiaoping. 2007. « Signaling and Regulation of the Platelet Glycoprotein Ib-IX-V Complex ». *Current Opinion in Hematology* 14 (3): 262-69. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3280dce51a>.
- Eigenthaler, M., C. Nolte, M. Halbrügge, et U. Walter. 1992. « Concentration and Regulation of Cyclic Nucleotides, Cyclic-Nucleotide-Dependent Protein Kinases and One of Their Major Substrates in Human Platelets. Estimating the Rate of CAMP-Regulated and CGMP-Regulated Protein Phosphorylation in Intact Cells ». *European Journal of Biochemistry* 205 (2): 471-81.
- Ekambara, Prasanna, Wanyu Lambiv, Rosanna Cazzolli, Anthony W. Ashton, et Kenneth V. Honn. 2011. « The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: an emerging paradigm in cancer progression and metastasis ». *Cancer metastasis reviews* 30 (0): 397-408. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9297-9>.
- Evgenov, Oleg V., Pál Pacher, Peter M. Schmidt, György Haskó, Harald H. H. W. Schmidt, et Johannes-Peter Stasch. 2006. « NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential ». *Nature reviews. Drug discovery* 5 (9): 755-68. <https://doi.org/10.1038/nrd2038>.
- Ezumi, Y., K. Shindoh, M. Tsuji, et H. Takayama. 1998. « Physical and Functional Association of the Src Family Kinases Fyn and Lyn with the Collagen Receptor Glycoprotein VI-Fc Receptor Gamma Chain Complex on Human Platelets ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (2): 267-76.
- Fabre, J. E., M. Nguyen, K. Athirakul, K. Coggins, J. D. McNeish, S. Austin, L. K. Parise, G. A. FitzGerald, T. M. Coffman, et B. H. Koller. 2001. « Activation of the Murine EP3 Receptor for PGE₂ Inhibits CAMP Production and Promotes Platelet Aggregation ». *The Journal of Clinical Investigation* 107 (5): 603-10. <https://doi.org/10.1172/JCI10881>.
- Fajardo, L. F. 1975. « Platelet Morphology after Aspirin ». *American Journal of Clinical Pathology* 63 (4): 554-58. <https://doi.org/10.1093/ajcp/63.4.554>.
- Farrell, D H, P Thiagarajan, D W Chung, et E W Davie. 1992. « Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (22): 10729-32.
- Feng, DaLi, Klaus Lindpaintner, Martin G. Larson, Valluri S. Rao, Christopher J. O'Donnell, Izabella Lipinska, Christian Schmitz, Patrice A. Sutherland, Halit Silbershatz, et Ralph B. D'Agostino. 1999. « Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PI A2 polymorphism: the Framingham Offspring Study ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19 (4): 1142-1147.

- FitzGerald, G A, J A Oates, J Hawiger, R L Maas, L J Roberts, J A Lawson, et A R Brash. 1983. « Endogenous Biosynthesis of Prostacyclin and Thromboxane and Platelet Function during Chronic Administration of Aspirin in Man. » *Journal of Clinical Investigation* 71 (3): 676-88. <https://doi.org/10.1172/JCI110814>.
- Flaumenhaft, Robert. 2003. « Molecular Basis of Platelet Granule Secretion ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (7): 1152-60. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000075965.88456.48>.
- Floyd, Christopher N., et Albert Ferro. 2014. « Mechanisms of aspirin resistance ». *Pharmacology & Therapeutics* 141 (1): 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.08.005>.
- Foster, Carolyn J., Dina M. Prosser, Jacqueline M. Agans, Ying Zhai, Michelle D. Smith, Jean E. Lachowicz, Fang L. Zhang, et al. 2001. « Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs ». *Journal of Clinical Investigation* 107 (12): 1591-98.
- Francis, S. H., T. M. Lincoln, et J. D. Corbin. 1980. « Characterization of a Novel CGMP Binding Protein from Rat Lung. » *Journal of Biological Chemistry* 255 (2): 620-26.
- Francis, Sharron H., Celeste Poteet-Smith, Jennifer L. Busch, Robyn Richie-Jannetta, et Jackie D. Corbin. 2002. « Mechanisms of Autoinhibition in Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 7 (mars): d580-592.
- Freedman, Jane E. 2006. « The Aspirin Resistance Controversy: Clinical Entity or Platelet Heterogeneity? » *Circulation* 113 (25): 2865-67. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.635847>.
- Friedman, Eitan A., Martin L. Ogletree, Elias V. Haddad, et Olivier Boutaud. 2015. « Understanding the Role of Prostaglandin E2 in Regulating Human Platelet Activity in Health and Disease ». *Thrombosis Research* 136 (3): 493-503. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.05.027>.
- Fritz, Bradley G., Sue A. Roberts, Aqeel Ahmed, Linda Breci, Wenzhou Li, Andrzej Weichsel, Jacqueline L. Brailey, Vicki H. Wysocki, Florence Tama, et William R. Montfort. 2013. « Molecular Model of a Soluble Guanylyl Cyclase Fragment Determined by Small-Angle X-ray Scattering and Chemical Cross-Linking ». *Biochemistry* 52 (9): 1568-82. <https://doi.org/10.1021/bi301570m>.
- Fujiwara, T, M Ikeda, K Esumi, T D Fujita, M Kono, H Tokushige, T Hatoyama, et al. 2007. « Exploratory Aspirin Resistance Trial in Healthy Japanese Volunteers (J-ART) Using Platelet Aggregation as a Measure of Thrombogenicity ». *The Pharmacogenomics Journal* 7 (6): 395-403. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500435>.
- Fulton, David, Jean-Philippe Gratton, Timothy J. McCabe, Jason Fontana, Yasushi Fujio, Kenneth Walsh, Thomas F. Franke, Andreas Papapetropoulos, et William C. Sessa. 1999. « Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt ». *Nature* 399 (6736): 597-601. <https://doi.org/10.1038/21218>.
- Furia, F. G. de, A. Cerami, H. F. Bunn, Y. S. Lu, et C. M. Peterson. 1973. « The Effect of Aspirin on Sickling and Oxygen Affinity of Erythrocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (12 Pt 1-2): 3707-10.
- Furuno, Takashi, Fumiyasu Yamasaki, Takeshi Yokoyama, Kyoko Sato, Takayuki Sato, Yoshinori Doi, et Tetsuro Sugiura. 2011. « Effects of Various Doses of Aspirin on Platelet Activity and Endothelial Function ». *Heart and Vessels* 26 (3): 267-73. <https://doi.org/10.1007/s00380-010-0054-8>.
- Gachet, Christian. 2008. « P2 Receptors, Platelet Function and Pharmacological Implications ». *Thrombosis and Haemostasis* 99 (03): 466-72. <https://doi.org/10.1160/TH07-11-0673>.
- Gambaryan, Stepan, Anna Kobsar, Natalia Rukoyatkina, Sabine Herterich, Joerg Geiger, Albert Smolenski, Suzanne M. Lohmann, et Ulrich Walter. 2010. « Thrombin and Collagen Induce a Feedback Inhibitory Signaling Pathway in Platelets Involving Dissociation of the Catalytic Subunit of Protein Kinase A from an NFκB-IκB Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (24): 18352-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077602>.

- Gambaryan, Stepan, et Dimitrios Tsikas. 2015. « A Review and Discussion of Platelet Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthase: Do Blood Platelets Produce Nitric Oxide from L-Arginine or Nitrite? » *Amino Acids* 47 (9): 1779-93. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1986-1>.
- Gardiner, E. E., D. Karunakaran, Y. Shen, J. F. Arthur, R. K. Andrews, et M. C. Berndt. 2007. « Controlled Shedding of Platelet Glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM Family Metalloproteinases ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5 (7): 1530-37. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02590.x>.
- Geiger, J, C Nolte, E Butt, S O Sage, et U Walter. 1992. « Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (3): 1031-35.
- Geiselhöringer, A., M. Gaisa, F. Hofmann, et J. Schlossmann. 2004. « Distribution of IRAG and CGKI-Isoforms in Murine Tissues ». *FEBS Letters* 575 (1-3): 19-22. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.030>.
- Gerszten, R. E., J. Chen, M. Ishii, K. Ishii, L. Wang, T. Nanevicz, C. W. Turck, T. K. Vu, et S. R. Coughlin. 1994. « Specificity of the Thrombin Receptor for Agonist Peptide Is Defined by Its Extracellular Surface ». *Nature* 368 (6472): 648-51. <https://doi.org/10.1038/368648a0>.
- Gerzer, Rupert, Eycke Böhme, Franz Hofmann, et Günter Schultz. 1981. « Soluble Guanylate Cyclase Purified from Bovine Lung Contains Heme and Copper ». *FEBS Letters* 132 (1): 71-74. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80429-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80429-2).
- Gharbo, S. A., et M. J. Williamson. 1986. « Degradation of Aspirin in Solutions ». *Drug Development and Industrial Pharmacy* 12 (6): 927-29. <https://doi.org/10.3109/03639048609048048>.
- Giona, Fiorina, Isabella Massimi, Maria Luisa Guarino, Michelina Santopietro, Marica Laurino, Flavia Temperilli, Giovanna Palumbo, Robin Foà, et Fabio Maria Pulcinelli. 2019. « Platelet Activation and Multidrug Resistance Protein-4 Expression in Children and Adolescents with Different Subtypes of Primary Thrombocythemia ». *Haematologica*, juin, haematol.2019.226266. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.226266>.
- González-Utor, A. L., I. Sánchez-Aguayo, et J. Hidalgo. 1992. « Cytochemical Localization of K(+)-Dependent p-Nitrophenyl Phosphatase and Adenylate Cyclase by Using One-Step Method in Human Washed Platelets ». *Histochemistry* 97 (6): 503-7. <https://doi.org/10.1007/BF00316071>.
- Goodall, A. H., N. Curzen, M. Panesar, C. Hurd, C. J. Knight, W. H. Ouwehand, et K. M. Fox. 1999. « Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-proline33 (HPA-1b, PIA2, Zwb) positive platelets in patients with cardiovascular disease ». *European heart journal* 20 (10): 742–747.
- Graham, G. G., G. D. Champion, R. O. Day, et P. D. Paull. 1977. « Patterns of Plasma Concentrations and Urinary Excretion of Salicylate in Rheumatoid Arthritis ». *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 22 (4): 410-20. <https://doi.org/10.1002/cpt1977224410>.
- Grant, P. G., et R. W. Colman. 1984. « Purification and Characterization of a Human Platelet Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase ». *Biochemistry* 23 (8): 1801-7. <https://doi.org/10.1021/bi00303a034>.
- Grant, P. G., A. F. Mannarino, et R. W. Colman. 1990. « Purification and Characterization of a Cyclic GMP-Stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from the Cytosol of Human Platelets ». *Thrombosis Research* 59 (1): 105-19. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(90\)90276-i](https://doi.org/10.1016/0049-3848(90)90276-i).
- Grotemeyer, K. H., H. W. Scharafinski, et I. W. Husstedt. 1993. « Two-Year Follow-up of Aspirin Responder and Aspirin Non Responder. A Pilot-Study Including 180 Post-Stroke Patients ». *Thrombosis Research* 71 (5): 397-403. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(93\)90164-j](https://doi.org/10.1016/0049-3848(93)90164-j).
- Gudmundsdóttir, Ingibjörg J., Sarah J. McRobbie, Simon D. Robinson, David E. Newby, et Ian L. Megson. 2005. « Sildenafil potentiates nitric oxide mediated inhibition of human platelet aggregation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337 (1): 382-85. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.060>.

- Gum, Patricia A, Kandice Kottke-Marchant, Patricia A Welsh, Jennifer White, et Eric J Topol. 2003. « A Prospective, Blinded Determination of the Natural History of Aspirin Resistance among Stable Patients with Cardiovascular Disease ». *Journal of the American College of Cardiology* 41 (6): 961-65. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)03014-0](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)03014-0).
- Habib, Aïda, Garret A. FitzGerald, et Jacques Maclouf. 1999. « Phosphorylation of the Thromboxane Receptor α , the Predominant Isoform Expressed in Human Platelets ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (5): 2645-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.2645>.
- Halbrügge, M., C. Friedrich, M. Eigenthaler, P. Schanzenbächer, et U. Walter. 1990. « Stoichiometric and Reversible Phosphorylation of a 46-KDa Protein in Human Platelets in Response to CGMP- and CAMP-Elevating Vasodilators. » *Journal of Biological Chemistry* 265 (6): 3088-93.
- Hamberg, M, J Svensson, et B Samuelsson. 1975. « Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (8): 2994-98.
- Harrison, Paul. 2005. « Platelet Function Analysis ». *Blood Reviews* 19 (2): 111-23. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.05.002>.
- Harrison, Paul, Helen Segal, Louise Silver, Anila Syed, Fiona C. Cuthbertson, et Peter M. Rothwell. 2008. « Lack of Reproducibility of Assessment of Aspirin Responsiveness by Optical Aggregometry and Two Platelet Function Tests ». *Platelets* 19 (2): 119-24. <https://doi.org/10.1080/09537100701771736>.
- Hasan, Alan, Kerstin Y. Danker, Sabine Wolter, Heike Bähre, Volkhard Kaefer, et Roland Seifert. 2014. « Soluble Adenylyl Cyclase Accounts for High Basal CCMP and CUMP Concentrations in HEK293 and B103 Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448 (2): 236-40. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.099>.
- Haslam, Richard J., Natalie T. Dickinson, et Elliott K. Jang. 1999. « Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets ». *Thrombosis and haemostasis* 82 (02): 412-423.
- Hassock, Sheila R., Michael X. Zhu, Claudia Trost, Veit Flockerzi, et Kalwant S. Authi. 2002. « Expression and Role of TRPC Proteins in Human Platelets: Evidence That TRPC6 Forms the Store-Independent Calcium Entry Channel ». *Blood* 100 (8): 2801-11. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0723>.
- Hawkins, David, R. Neal Pinckard, Irving P. Crawford, et Richard S. Farr. 1969. « Structural changes in human serum albumin induced by ingestion of acetylsalicylic acid ». *Journal of Clinical Investigation* 48 (3): 536-42.
- Hellevo, K., R. Welborn, J. A. Menninger, et B. Tabakoff. 1997. « Human Adenylyl Cyclase Type 7 Contains Polymorphic Repeats in the 3' Untranslated Region: Investigations of Association with Alcoholism ». *American Journal of Medical Genetics* 74 (1): 95-98. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19970221\)74:1<95::aid-ajmg19>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19970221)74:1<95::aid-ajmg19>3.0.co;2-m).
- Herr, Andrew B., et Richard W. Farndale. 2009. « Structural Insights into the Interactions between Platelet Receptors and Fibrillar Collagen ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (30): 19781-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.013219>.
- Herschman, H. R. 1996. « Prostaglandin Synthase 2 ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1299 (1): 125-40. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00194-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00194-8).
- Hervé, Dominique, Anne Philippi, Reda Belbouab, Michel Zerah, Stéphane Chabrier, Sophie Collardeau-Frachon, Françoise Bergametti, et al. 2014. « Loss of $\alpha 1\beta 1$ Soluble Guanylate Cyclase, the Major Nitric Oxide Receptor, Leads to Moyamoya and Achalasia ». *American Journal of Human Genetics* 94 (3): 385-94. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.01.018>.
- Hidaka, Hiroyoshi, et Tomiko Asano. 1976. « Human blood platelet 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase: Isolation of low-Km and high-Km phosphodiesterase ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 429 (2): 485-97. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(76\)90296-5](https://doi.org/10.1016/0005-2744(76)90296-5).

- Hirata, T, F Ushikubi, A Kakizuka, M Okuma, et S Narumiya. 1996. « Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. » *Journal of Clinical Investigation* 97 (4): 949-56.
- Hoffmeister, Karin M. 2011. « The role of lectins and glycans in platelet clearance ». *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 9 (0 1): 35-43. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04276.x>.
- Horstrup, Karen, Bernd Jablonka, Petra Hönig-Liedl, Melitta Just, Kurt Kochsiek, et Ulrich Walter. 1994. « Phosphorylation of Focal Adhesion Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein at Ser157 in Intact Human Platelets Correlates with Fibrinogen Receptor Inhibition ». *European Journal of Biochemistry* 225 (1): 21-27. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00021.x>.
- Houslay, M D, D Bojanic, et A Wilson. 1986. « Platelet activating factor and U44069 stimulate a GTPase activity in human platelets which is distinct from the guanine nucleotide regulatory proteins, Ns and Ni. » *Biochemical Journal* 234 (3): 737-40.
- Huai, Qing, John Colicelli, et Hengming Ke. 2003. « The Crystal Structure of AMP-Bound PDE4 Suggests a Mechanism for Phosphodiesterase Catalysis ». *Biochemistry* 42 (45): 13220-26. <https://doi.org/10.1021/bi034653e>.
- Huijgens, P. C., C. A. van den Berg, L. M. Imandt, A. Miltenburg, et M. M. Langenhuijsen. 1986. « Aspirin Does Not Inhibit Human Megakaryocyte Thromboxane Synthesis in Vivo ». *Scandinavian Journal of Haematology* 36 (1): 92-95. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1986.tb02656.x>.
- Hung, Li-Wei, Iris Xiaoyan Wang, Kishiko Nikaido, Pei-Qi Liu, Giovanna Ferro-Luzzi Ames, et Sung-Hou Kim. 1998. « Crystal Structure of the ATP-Binding Subunit of an ABC Transporter ». *Nature* 396 (6712): 703-7. <https://doi.org/10.1038/25393>.
- Hunt, J. A., J. E. Merritt, J. MacDermot, et M. Keen. 1992. « Characterization of the Thromboxane Receptor Mediating Prostacyclin Release from Cultured Endothelial Cells ». *Biochemical Pharmacology* 43 (8): 1747-52. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90705-n](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90705-n).
- Hunter, Roger W., Carol Mackintosh, et Ingeborg Hers. 2009. « Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation and Activation of PDE3A Regulate CAMP Levels in Human Platelets ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (18): 12339-48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807536200>.
- Ignarro, L J, K S Wood, et M S Wolin. 1982. « Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (9): 2870-73.
- Insel, Paul A., et Rennolds S. Ostrom. 2003. « Forskolin as a Tool for Examining Adenylyl Cyclase Expression, Regulation, and G Protein Signaling ». *Cellular and Molecular Neurobiology* 23 (3): 305-14. <https://doi.org/10.1023/a:1023684503883>.
- Irie, A., E. Segi, Y. Sugimoto, A. Ichikawa, et M. Negishi. 1994. « Mouse Prostaglandin E Receptor EP3 Subtype Mediates Calcium Signals via Gi in CDNA-Transfected Chinese Hamster Ovary Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 204 (1): 303-9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2460>.
- Irie, Atsushi, Yukihiko Sugimoto, Tsunehisa Namba, Akira Harazono, Akiko Honda, Akiko Watabe, Manabu Negishi, Shuh Narumiya, et Atsushi Ichikawa. 1993. « Third Isoform of the Prostaglandin-E-Receptor EP3 Subtype with Different C-Terminal Tail Coupling to Both Stimulation and Inhibition of Adenylate Cyclase ». *European Journal of Biochemistry* 217 (1): 313-18. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18248.x>.
- Ishizuka, T, M Kawakami, T Hidaka, Y Matsuki, M Takamizawa, K Suzuki, A Kurita, et H Nakamura. 1998. « Stimulation with thromboxane A2 (TXA2) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells ». *Clinical and Experimental Immunology* 112 (3): 464-70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00614.x>.
- Italiano, Joseph E., Patrick Lecine, Ramesh A. Shivdasani, et John H. Hartwig. 1999. « Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes ». *The Journal of Cell Biology* 147 (6): 1299-1312.

- Ito, S., S. Narumiya, et O. Hayaishi. 1989. « Prostaglandin D₂: A Biochemical Perspective ». *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 37 (4): 219-34. [https://doi.org/10.1016/0952-3278\(89\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0952-3278(89)90033-1).
- Iyú, David, Jackie R. Glenn, Ann E. White, Sue C. Fox, Natalia Dovlatova, et Stan Heptinstall. 2011. « P₂Y₁₂ and EP₃ Antagonists Promote the Inhibitory Effects of Natural Modulators of Platelet Aggregation That Act via CAMP ». *Platelets* 22 (7): 504-15. <https://doi.org/10.3109/09537104.2011.576284>.
- Jackson, Elke C. G., et Archibald McNicol. 2010. « Cyclic Nucleotides Inhibit MAP Kinase Activity in Low-Dose Collagen-Stimulated Platelets ». *Thrombosis Research* 125 (2): 147-51. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2009.06.004>.
- Jacques, Suzanne L., Meredith LeMasurier, Paul J. Sheridan, Stacy K. Seeley, et Athan Kuliopulos. 2000. « Substrate-Assisted Catalysis of the PAR1 Thrombin Receptor ENHANCEMENT OF MACROMOLECULAR ASSOCIATION AND CLEAVAGE ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (52): 40671-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004544200>.
- Jaffe, Eric A., et Babette B. Weksler. 1979. « Recovery of Endothelial Cell Prostacyclin Production after Inhibition by Low Doses of Aspirin ». *Journal of Clinical Investigation* 63 (3): 532-35.
- Jang, Elliott K., Joseph E. Azzam, Natalie T. Dickinson, Monica M. L. Davidson, et Richard J. Haslam. 2002. « Roles for Both Cyclic GMP and Cyclic AMP in the Inhibition of Collagen-Induced Platelet Aggregation by Nitroprusside ». *British Journal of Haematology* 117 (3): 664-75.
- Jedlitschky, Gabriele, Marco Cattaneo, Lena E. Lubenow, Dieter Roskopf, Anna Lecchi, Andrea Artoni, Giovanna Motta, Juliane Nießen, Heyo K. Kroemer, et Andreas Greinacher. 2010. « Role of MRP4 (ABCC4) in Platelet Adenine Nucleotide-Storage ». *The American Journal of Pathology* 176 (3): 1097-1103. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090425>.
- Jedlitschky, Gabriele, Konstanze Tirschmann, Lena E. Lubenow, Hendrik K. Nieuwenhuis, Jan W. N. Akkerman, Andreas Greinacher, et Heyo K. Kroemer. 2004. « The Nucleotide Transporter MRP4 (ABCC4) Is Highly Expressed in Human Platelets and Present in Dense Granules, Indicating a Role in Mediator Storage ». *Blood* 104 (12): 3603-10. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4330>.
- Jefferson, Brian K., Jennifer H. Foster, Jeanette J. McCarthy, Geoffrey Ginsburg, Alex Parker, Kandice Kottke-Marchant, et Eric J. Topol. 2005. « Aspirin Resistance and a Single Gene ». *The American Journal of Cardiology* 95 (6): 805-8. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.11.045>.
- Jin, Jianguo, James L. Daniel, et Satya P. Kunapuli. 1998. « Molecular Basis for ADP-Induced Platelet Activation II. THE P₂Y₁ RECEPTOR MEDIATES ADP-INDUCED INTRACELLULAR CALCIUM MOBILIZATION AND SHAPE CHANGE IN PLATELETS ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (4): 2030-34. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2030>.
- Jin, Jianguo, Todd M. Quinton, Jin Zhang, Susan E. Rittenhouse, et Satya P. Kunapuli. 2002. « Adenosine Diphosphate (ADP)-induced Thromboxane A₂ generation in Human Platelets Requires Coordinated Signaling through Integrin AIIb β 3 and ADP Receptors ». *Blood* 99 (1): 193-98. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.1.193>.
- Johnston-Cox, Hillary A., et Katya Ravid. 2011. « Adenosine and blood platelets ». *Purinergic Signalling* 7 (3): 357-65. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9220-4>.
- Jones, Peter M., et Anthony M. George. 1999. « Subunit Interactions in ABC Transporters: Towards a Functional Architecture ». *FEMS Microbiology Letters* 179 (2): 187-202. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08727.x>.
- Jurevicius, J, et R Fischmeister. 1996. « cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca²⁺ channels by beta-adrenergic agonists. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1): 295-99.
- Kahn, M. L., Y. W. Zheng, W. Huang, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff, R. V. Farese, C. Tam, et S. R. Coughlin. 1998. « A Dual Thrombin Receptor System for Platelet Activation ». *Nature* 394 (6694): 690-94. <https://doi.org/10.1038/29325>.

- Kasirer-Friede, Ana, Maria Rita Cozzi, Mario Mazzucato, Luigi De Marco, Zaverio M. Ruggeri, et Sanford J. Shattil. 2004. « Signaling through GP Ib-IX-V Activates Alpha IIb Beta 3 Independently of Other Receptors ». *Blood* 103 (9): 3403-11. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3664>.
- Kauskot, Alexandre, Tiffany Pascreau, Frédéric Adam, Arnaud Bruneel, Christelle Reperant, Marc-Damien Lourenco-Rodrigues, Jean-Philippe Rosa, et al. 2018. « A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation ». *Haematologica* 103 (12): e613-17. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.198028>.
- Kawahara, Kohichi, Hirofumi Hohjoh, Tomoaki Inazumi, Soken Tsuchiya, et Yukihiko Sugimoto. 2015. « Prostaglandin E2-Induced Inflammation: Relevance of Prostaglandin E Receptors ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Oxygenated metabolism of PUFA: analysis and biological relevance, 1851 (4): 414-21. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.07.008>.
- Kazama, Itsuro, Yoshio Maruyama, et Satoshi Nakamichi. 2014. « Aspirin-Induced Microscopic Surface Changes Stimulate Thrombopoiesis in Rat Megakaryocytes ». *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 20 (3): 318-25. <https://doi.org/10.1177/1076029612461845>.
- Keh, Didier, Anja Thieme, Irit Kürer, Konrad J. Falke, et Herwig Gerlach. 2003. « Inactivation of Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor by Nitric Oxide Donor 3-Morpholino-Sydnominine ». *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 14 (4): 327-34. <https://doi.org/10.1097/00001721-200306000-00002>.
- Kieffer, Nelly, Josette Guichard, Jean-Pierre Farcet, William Vainchenker, et Janine Breton-Gorius. 1987. « Biosynthesis of Major Platelet Proteins in Human Blood Platelets ». *European Journal of Biochemistry* 164 (1): 189-95. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb11010.x>.
- Kim, Soochong, Carolyn Foster, Anna Lecchi, Todd M. Quinton, Dina M. Prosser, Jianguo Jin, Marco Cattaneo, et Satya P. Kunapuli. 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 (10): 3629-36.
- Kinsella, B. T., D. J. O'Mahony, et G. A. Fitzgerald. 1997. « The Human Thromboxane A2 Receptor Alpha Isoform (TP Alpha) Functionally Couples to the G Proteins Gq and G11 in Vivo and Is Activated by the Isoprostane 8-Epi Prostaglandin F2 Alpha ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 281 (2): 957-64.
- Klainer, L. M., Y.-M. Chi, S. L. Freidberg, T. W. Rall, et Earl W. Sutherland. 1962. « Adenyl Cyclase IV. the Effects of the Neurohormones on the Formation of Adenosine 3'-5' Phosphate by Preparations from Brain and Other Tissues ». *Journal of Biological Chemistry* 237 (4): 1239-43.
- Kleinboelting, Silke, Ana Diaz, Sebastien Moniot, Joop van den Heuvel, Michael Weyand, Lonny R. Levin, Jochen Buck, et Clemens Steegborn. 2014. « Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (10): 3727-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322778111>.
- Kleinboelting, Silke, Joop van den Heuvel, et Clemens Steegborn. 2014. « Structural Analysis of Human Soluble Adenylyl Cyclase and Crystal Structures of Its Nucleotide Complexes – Implications for Cyclase Catalysis and Evolution ». *The FEBS Journal* 281 (18): 4151-64. <https://doi.org/10.1111/febs.12913>.
- Koesling, D., E. Böhme, et G. Schultz. 1991. « Guanylyl Cyclases, a Growing Family of Signal-Transducing Enzymes ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5 (13): 2785-91. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.13.1680765>.
- Koudstaal P J, Ciabattini G, van Gijn J, Nieuwenhuis H K, de Groot P G, Sixma J J, et Patrono C. 1993. « Increased thromboxane biosynthesis in patients with acute cerebral ischemia. » *Stroke* 24 (2): 219-23. <https://doi.org/10.1161/01.STR.24.2.219>.
- Kozasa, Tohru, Xuejun Jiang, Matthew J. Hart, Pamela M. Sternweis, William D. Singer, Alfred G. Gilman, Gideon Bollag, et Paul C. Sternweis. 1998. « P115 RhoGEF, a GTPase Activating Protein

- for $\alpha 12$ and $\alpha 13$ ». *Science* 280 (5372): 2109-11. <https://doi.org/10.1126/science.280.5372.2109>.
- Kramer, Ruth M., Gregg C. Checani, Aaron Deykin, Carole R. Pritzker, et Daniel Deykin. 1986. « Solubilization and Properties of Ca^{2+} -Dependent Human Platelet Phospholipase A2 ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 878 (3): 394-403. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(86\)90248-1](https://doi.org/10.1016/0005-2760(86)90248-1).
- Kurumbail, R. G., A. M. Stevens, J. K. Gierse, J. J. McDonald, R. A. Stegeman, J. Y. Pak, D. Gildehaus, et al. 1996. « Structural Basis for Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Anti-Inflammatory Agents ». *Nature* 384 (6610): 644-48. <https://doi.org/10.1038/384644a0>.
- La Rosa, Giulio, Luigi M. Biasucci, Claudia Mandolini, Isabella Massimi, Giorgia Copponi, Fabio M. Pulcinelli, et Filippo Crea. 2018. « Platelet MiRNA-26b down-Regulates Multidrug Resistance Protein 4 in Patients on Chronic Aspirin Treatment ». *Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown, Md.)* 19 (10): 611-13. <https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000000691>.
- Lam, Wilbur A., Ovijit Chaudhuri, Ailey Crow, Kevin D. Webster, Tai-De Li, Ashley Kita, James Huang, et Daniel A. Fletcher. 2011. « Mechanics and contraction dynamics of single platelets and implications for clot stiffening ». *Nature materials* 10 (1): 61-66. <https://doi.org/10.1038/nmat2903>.
- Landolfi, R., G. Ciabattini, P. Patrignani, M. A. Castellana, E. Pogliani, B. Bizzi, et C. Patrono. 1992. « Increased Thromboxane Biosynthesis in Patients with Polycythemia Vera: Evidence for Aspirin-Suppressible Platelet Activation in Vivo ». *Blood* 80 (8): 1965-71.
- Landry, Patricia, Isabelle Plante, Dominique L Ouellet, Marjorie P Perron, Guy Rousseau, et Patrick Provost. 2009. « Existence of a MicroRNA Pathway in Anucleate Platelets ». *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (9): 961-66. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1651>.
- Lefrançois, Emma, Guadalupe Ortiz-Muñoz, Axelle Caudrillier, Beñat Mallavia, Fengchun Liu, David M. Sayah, Emily E. Thornton, et al. 2017. « The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for hematopoietic progenitors ». *Nature* 544 (7648): 105-9. <https://doi.org/10.1038/nature21706>.
- Leggas, M., M. Adachi, G. L. Scheffer, D. Sun, P. Wielinga, G. Du, K. E. Mercer, et al. 2004. « Mrp4 Confers Resistance to Topotecan and Protects the Brain from Chemotherapy ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (17): 7612-21. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7612-7621.2004>.
- Lei, Jinping, Yanzi Zhou, Daiqian Xie, et Yingkai Zhang. 2015. « Mechanistic Insights into a Classic Wonder Drug--Aspirin ». *Journal of the American Chemical Society* 137 (1): 70-73. <https://doi.org/10.1021/ja5112964>.
- LeVarge, Barbara L. 2015. « Prostanoid therapies in the management of pulmonary arterial hypertension ». *Therapeutics and Clinical Risk Management* 11 (mars): 535-47. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S75122>.
- Levine, R. F., A. Eldor, P. K. Shoff, S. Kirwin, D. Tenza, et E. M. Cramer. 1993. « Circulating Megakaryocytes: Delivery of Large Numbers of Intact, Mature Megakaryocytes to the Lungs ». *European Journal of Haematology* 51 (4): 233-46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1993.tb00637.x>.
- Lewandrowski, Urs, Stefanie Wortelkamp, Katharina Lohrig, René P. Zahedi, Dirk A. Wolters, Ulrich Walter, et Albert Sickmann. 2009. « Platelet Membrane Proteomics: A Novel Repository for Functional Research ». *Blood* 114 (1): e10-19. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203828>.
- Li, Qing, Bi-Lian Chen, Vural Ozdemir, Wei Ji, Yan-Mei Mao, Lian-Ci Wang, Hei-Ping Lei, et al. 2007. « Frequency of Genetic Polymorphisms of *COX1*, *GP1IIa* and *P2Y1* in a Chinese Population and Association with Attenuated Response to Aspirin ». *Pharmacogenomics* 8 (6): 577-86. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.577>.
- Li, Xuanwen, Susanne Fries, Ruizhi Li, John A. Lawson, Kathleen J. Probert, Scott L. Diamond, Ian A. Blair, Garret A. FitzGerald, et Tilo Grosser. 2014. « Differential Impairment of Aspirin-Dependent Platelet Cyclooxygenase Acetylation by Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs ».

- Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (47): 16830-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406997111>.
- Li, Zhenyu, M. Keegan Delaney, Kelly A. O'Brien, et Xiaoping Du. 2010. « Signaling during platelet adhesion and activation ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (12): 2341-49. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207522>.
- Li, Zhenyu, Xiaodong Xi, Minyi Gu, Robert Feil, Richard D. Ye, Martin Eigenthaler, Franz Hofmann, et Xiaoping Du. 2003. « A Stimulatory Role for CGMP-Dependent Protein Kinase in Platelet Activation ». *Cell* 112 (1): 77-86. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01254-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01254-0).
- Lichtman, M. A., J. K. Chamberlain, W. Simon, et P. A. Santillo. 1978. « Parasinusoidal Location of Megakaryocytes in Marrow: A Determinant of Platelet Release ». *American Journal of Hematology* 4 (4): 303-12. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830040402>.
- Lien, Li-Ming, Zhih-Cherng Chen, Chi-Li Chung, Ting-Lin Yen, Hou-Chang Chiu, Duen-Suey Chou, Shih-Yi Huang, Joen-Rong Sheu, Wan-Jung Lu, et Kuan-Hung Lin. 2014. « Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4) Regulates Thrombus Formation in Vitro and in Vivo ». *European Journal of Pharmacology* 737 (août): 159-67. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.05.001>.
- Linder, Jürgen U., et Joachim E. Schultz. 2003. « The Class III Adenylyl Cyclases: Multi-Purpose Signalling Modules ». *Cellular Signalling* 15 (12): 1081-89. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(03\)00130-x](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(03)00130-x).
- Linton, Kenneth J., et Christopher F. Higgins. 2007. « Structure and Function of ABC Transporters: The ATP Switch Provides Flexible Control ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 453 (5): 555-67. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0126-x>.
- Lipsky, Peter E., Peter Brooks, Leslie J. Crofford, Raymond DuBois, David Graham, Lee S. Simon, Leo B. A. van de Putte, et Steven B. Abramson. 2000. « Unresolved Issues in the Role of Cyclooxygenase-2 in Normal Physiologic Processes and Disease ». *Archives of Internal Medicine* 160 (7): 913-20. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.7.913>.
- Liu, Baoyu, Wei Chen, et Cheng Zhu. 2015. « Molecular Force Spectroscopy on Cells ». *Annual Review of Physical Chemistry* 66 (1): 427-51. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040214-121742>.
- Liu, L. W., T. K. Vu, C. T. Esmen, et S. R. Coughlin. 1991. « The Region of the Thrombin Receptor Resembling Hirudin Binds to Thrombin and Alters Enzyme Specificity. » *Journal of Biological Chemistry* 266 (26): 16977-80.
- Lordier, Larissa, Abdelali Jalil, Frédéric Aurade, Frédéric Larbret, Jérôme Larghero, Najet Debili, William Vainchenker, et Yunhua Chang. 2008. « Megakaryocyte Endomitosis Is a Failure of Late Cytokinesis Related to Defects in the Contractile Ring and Rho/Rock Signaling ». *Blood* 112 (8): 3164-74. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-144956>.
- Luo, Shi-Zhong, Xi Mo, Vahid Afshar-Kharghan, Sankaranarayanan Srinivasan, José A. López, et Renhao Li. 2007. « Glycoprotein Ib α Forms Disulfide Bonds with 2 Glycoprotein Ib β Subunits in the Resting Platelet ». *Blood* 109 (2): 603-9. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024091>.
- Ma, Peisong, Kristy Ou, Andrew J. Sinnamon, Hong Jiang, David P. Siderovski, et Lawrence F. Brass. 2015. « Modulating platelet reactivity through control of RGS18 availability ». *Blood* 126 (24): 2611-20. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-640037>.
- Ma, Xiaolei, Nazish Sayed, Padmamalini Baskaran, Annie Beuve, et Focco van den Akker. 2008. « PAS-mediated dimerization of soluble guanylyl cyclase revealed by signal transduction histidine kinase domain crystal structure ». *The Journal of biological chemistry* 283 (2): 1167-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706218200>.
- Major Christopher D., Santulli Rosemary J., Derian Claudia K., et Andrade-Gordon Patricia. 2003. « Extracellular Mediators in Atherosclerosis and Thrombosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (6): 931-39. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000070100.47907.26>.
- Manganello, Jeanne M., Yasmine Djellas, Catherine Borg, Kostas Antonakis, et Guy C. Le Breton. 1999. « Cyclic AMP-Dependent Phosphorylation of Thromboxane A2 Receptor-Associated G α 13 ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (39): 28003-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.28003>.

- Marcantoni, Emanuela, Nicole Allen, Matthew R. Cambria, Rebecca Dann, Michael Cammer, Tenzin Lhakhang, Meagan P. O'Brien, et al. 2018. « Platelet Transcriptome Profiling in HIV and ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 4 (ABCC4) as a Mediator of Platelet Activity ». *JACC: Basic to Translational Science* 3 (1): 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.10.005>.
- Marcus, A J, M J Broekman, J H Drosopoulos, N Islam, T N Alyonycheva, L B Safier, K A Hajjar, et al. 1997. « The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. » *Journal of Clinical Investigation* 99 (6): 1351-60.
- Maree, A. O., R. J. Curtin, A. Chubb, C. Dolan, D. Cox, J. O'brien, P. Crean, D. C. Shields, et D. J. Fitzgerald. 2005. « Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3 (10): 2340-45. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01555.x>.
- Markham, Anthony, et Diana Faulds. 1998. « Montelukast ». *Drugs* 56 (2): 251-56. <https://doi.org/10.2165/00003495-199856020-00010>.
- Martins, T. J., M. C. Mumby, et J. A. Beavo. 1982. « Purification and Characterization of a Cyclic GMP-Stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from Bovine Tissues ». *The Journal of Biological Chemistry* 257 (4): 1973-79.
- Massberg, Steffen, Matthias Sausbier, Peter Klatt, Markus Bauer, Alexander Pfeifer, Wolfgang Siess, Reinhard Fässler, Peter Ruth, Fritz Krombach, et Franz Hofmann. 1999. « Increased Adhesion and Aggregation of Platelets Lacking Cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate Kinase I ». *The Journal of Experimental Medicine* 189 (8): 1255-64.
- Massimi, Isabella, Laura Alemanno, Maria Luisa Guarino, Raffaella Guerriero, Massimo Mancone, Andrea Ceccacci, Luigi Frati, Dominick J. Angiolillo, et Fabio M. Pulcinelli. 2019. « Aspirin-Dependent Effects on Purinergic P2Y1 Receptor Expression ». *Thrombosis and Haemostasis* 119 (5): 726-34. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1678707>.
- Massimi, Isabella, Ambra Ciuffetta, Flavia Temperilli, Francesca Ferrandino, Alessandra Zicari, Fabio M. Pulcinelli, et Maria Pia Felli. 2015. « Multidrug Resistance Protein-4 Influences Aspirin Toxicity in Human Cell Line ». *Mediators of Inflammation* 2015: 607957. <https://doi.org/10.1155/2015/607957>.
- Massimi, Isabella, Raffaella Guerriero, Lavinia Vittoria Lotti, Valentina Lulli, Alessandra Borgognone, Federico Romani, Francesco Barillà, et al. 2014. « Aspirin influences megakaryocytic gene expression leading to up-regulation of multidrug resistance protein-4 in human platelets ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 78 (6): 1343-53. <https://doi.org/10.1111/bcp.12432>.
- Massimi, Isabella, Lavinia Vittoria Lotti, Flavia Temperilli, Massimo Mancone, Gennaro Sardella, Simone Calcagno, Ombretta Turriziani, Luigi Frati, et Fabio M. Pulcinelli. 2016. « Enhanced platelet MRP4 expression and correlation with platelet function in patients under chronic aspirin treatment ». *Thrombosis and Haemostasis* 116 (12): 1100-1110. <https://doi.org/10.1160/TH16-04-0316>.
- Mattiello, Teresa, Raffaella Guerriero, Lavinia Vittoria Lotti, Elisabetta Trifirò, Maria Pia Felli, Alessandro Barbarulo, Bruna Pucci, et al. 2011. « Aspirin Extrusion from Human Platelets through Multidrug Resistance Protein-4-Mediated Transport: Evidence of a Reduced Drug Action in Patients after Coronary Artery Bypass Grafting ». *Journal of the American College of Cardiology* 58 (7): 752-61. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.03.049>.
- Mazzucato, Mario, Paola Pradella, Maria Rita Cozzi, Luigi De Marco, et Zaverio M. Ruggeri. 2002. « Sequential Cytoplasmic Calcium Signals in a 2-Stage Platelet Activation Process Induced by the Glycoprotein Ibalph Mechanoreceptor ». *Blood* 100 (8): 2793-2800. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0514>.
- McCabe, T. J., D. Fulton, L. J. Roman, et W. C. Sessa. 2000. « Enhanced Electron Flux and Reduced Calmodulin Dissociation May Explain "Calcium-Independent" ENOS Activation by Phosphorylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (9): 6123-28. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6123>.

- McKenzie, Marcus E., Alex I. Malinin, Christopher R. Bell, Alex Dzhanashvili, Eric D. Horowitz, Benjamin R. Oshrine, Dan Atar, et Victor L. Serebruany. 2003. « Aspirin Inhibits Surface Glycoprotein IIb/IIIa, P-Selectin, CD63, and CD107a Receptor Expression on Human Platelets ». *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 14 (3): 249-53. <https://doi.org/10.1097/01.mbc.0000046182.72384.ab>.
- Metz, D., N. Hézard, S. Duval, S. Tassan-Mangina, A. Deschildre, C. Brasselet, et P. Nguyen. 2009. « Résistance aux antiagrégants plaquettaires : le point de vue du cardiologue ». *Journal des Maladies Vasculaires* 34 (1): 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.jmv.2008.11.005>.
- Mills, D. C., et D. E. Macfarlane. 1974. « Stimulation of Human Platelet Adenylate Cyclase by Prostaglandin D₂ ». *Thrombosis Research* 5 (3): 401-12. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(74\)90176-5](https://doi.org/10.1016/0049-3848(74)90176-5).
- Minuz Pietro, Patrignani Paola, Gaino Stefania, Degan Maurizio, Menapace Laura, Tommasoli Rosamaria, Seta Francesca, et al. 2002. « Increased Oxidative Stress and Platelet Activation in Patients With Hypertension and Renovascular Disease ». *Circulation* 106 (22): 2800-2805. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000039528.49161.E9>.
- Miura, Yoshiki, Tsuyoshi Takahashi, Stephanie M. Jung, et Masaaki Moroi. 2002. « Analysis of the Interaction of Platelet Collagen Receptor Glycoprotein VI (GPVI) with Collagen. A Dimeric Form of GPVI, but Not the Monomeric Form, Shows Affinity to Fibrous Collagen ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (48): 46197-204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204029200>.
- Moers, Alexandra, Bernhard Nieswandt, Steffen Massberg, Nina Wettschureck, Sabine Grüner, Ildiko Konrad, Valerie Schulte, et al. 2003. « G13 Is an Essential Mediator of Platelet Activation in Hemostasis and Thrombosis ». *Nature Medicine* 9 (11): 1418-22. <https://doi.org/10.1038/nm943>.
- Moers, Alexandra, Nina Wettschureck, Sabine Grüner, Bernhard Nieswandt, et Stefan Offermanns. 2004. « Unresponsiveness of Platelets Lacking Both Gαq and Gα13 IMPLICATIONS FOR COLLAGEN-INDUCED PLATELET ACTIVATION ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (44): 45354-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408962200>.
- Montfort, William R., Jessica A. Wales, et Andrzej Weichsel. 2017. « Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor ». *Antioxidants & Redox Signaling* 26 (3): 107-21. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6693>.
- Morinelli, T. A., L. M. Zhang, W. H. Newman, et K. E. Meier. 1994. « Thromboxane A₂/Prostaglandin H₂-Stimulated Mitogenesis of Coronary Artery Smooth Muscle Cells Involves Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and S6 Kinase. ». *Journal of Biological Chemistry* 269 (8): 5693-98.
- Muck, Stephanie, Artus-Aron Weber, Jutta Meyer-Kirchrath, et K. Schrör. 1997. « The Bovine Thromboxane A₂ Receptor: Molecular Cloning, Expression, and Functional Characterization ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 357 (1): 10-16. <https://doi.org/10.1007/PL00005132>.
- Murad, F., Y.-M. Chi, T. W. Rall, et Earl W. Sutherland. 1962. « Adenyl Cyclase III. The Effect of Catecholamines and Choline Esters on the Formation Adenosine 3'-5' Phosphate by Preparations from Cardiac Muscle and Liver ». *Journal of Biological Chemistry* 237 (4): 1233-38.
- Murray, Andrew J. 2008. « Pharmacological PKA Inhibition: All May Not Be What It Seems ». *Science Signaling* 1 (22): re4-re4. <https://doi.org/10.1126/scisignal.122re4>.
- Murugappa, Swaminathan, et Satya P. Kunapuli. 2006. « The Role of ADP Receptors in Platelet Function ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 11 (mai): 1977-86. <https://doi.org/10.2741/1939>.
- Nagata, Yuka, Yoshinao Muro, et Kazuo Todokoro. 1997. « Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis ». *The Journal of cell biology* 139 (2): 449-457.
- Nakahata, Norimichi, Isao Matsuoka, Tomoyuki Ono, et Hironori Nakanishi. 1989. « Thromboxane A₂ Activates Phospholipase C in Astrocytoma Cells via Pertussis Toxin-Insensitive G-Protein ».

- European Journal of Pharmacology* 162 (3): 407-17. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(89\)90331-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90331-2).
- Narumiya, S., Y. Sugimoto, et F. Ushikubi. 1999. « Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions ». *Physiological Reviews* 79 (4): 1193-1226. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1193>.
- Needleman, P., S. Moncada, S. Bunting, J. R. Vane, M. Hamberg, et B. Samuelsson. 1976. « Identification of an Enzyme in Platelet Microsomes Which Generates Thromboxane A₂ from Prostaglandin Endoperoxides ». *Nature* 261 (5561): 558-60. <https://doi.org/10.1038/261558a0>.
- Newman, P J, R S Derbes, et R H Aster. 1989. « The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. » *Journal of Clinical Investigation* 83 (5): 1778-81.
- Newman, Peter J. 1997. « Platelet Alloantigens: Cardiovascular as Well as Immunological Risk Factors? » *The Lancet* 349 (9049): 370-71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)80002-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80002-5).
- Nguyen, B. L., M. Saitoh, et J. A. Ware. 1991. « Interaction of Nitric Oxide and CGMP with Signal Transduction in Activated Platelets ». *The American Journal of Physiology* 261 (4 Pt 2): H1043-1052. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.261.4.H1043>.
- Niazi, Hira, Nesrine Zoghdani, Ludovic Couty, Alexandre Leuci, Anja Nitzsche, Maria L. Allende, Boubacar Mariko, et al. 2019. « Murine Platelet Production Is Suppressed by S1P Release in the Hematopoietic Niche, Not Facilitated by Blood S1P Sensing ». *Blood Advances* 3 (11): 1702-13. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019031948>.
- Nieswandt, B., C. Brakebusch, W. Bergmeier, V. Schulte, D. Bouvard, R. Mokhtari-Nejad, T. Lindhout, J. W. Heemskerk, H. Zirngibl, et R. Fässler. 2001. « Glycoprotein VI but Not Alpha2beta1 Integrin Is Essential for Platelet Interaction with Collagen ». *The EMBO Journal* 20 (9): 2120-30. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2120>.
- Nieswandt, Bernhard, Valerie Schulte, Alexandra Zywietz, Marie-Pierre Gratacap, et Stefan Offermanns. 2002. « Costimulation of Gi- and G12/G13-Mediated Signaling Pathways Induces Integrin AIIbβ3 Activation in Platelets ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (42): 39493-98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207256200>.
- Nikaido, Kishiko, et Giovanna Ferro-Luzzi Ames. 1999. « One Intact ATP-Binding Subunit Is Sufficient to Support ATP Hydrolysis and Translocation in an ABC Transporter, the Histidine Permease ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (38): 26727-35. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.26727>.
- Nurden, P., M. Humbert, R. S. Piotrowicz, C. Bihour, C. Poujol, A. T. Nurden, et T. J. Kunicki. 1996. « Distribution of Ligand-Occupied Alpha IIb Beta 3 in Resting and Activated Human Platelets Determined by Expression of a Novel Class of Ligand-Induced Binding Site Recognized by Monoclonal Antibody AP6 ». *Blood* 88 (3): 887-99.
- O'Banion, M K, V D Winn, et D A Young. 1992. « cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (11): 4888-92.
- Oelz, O., R. Oelz, H. R. Knapp, B. J. Sweetman, et J. A. Oates. 1977. « Biosynthesis of Prostaglandin D₂. 1. Formation of Prostaglandin D₂ by Human Platelets ». *Prostaglandins* 13 (2): 225-34. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(77\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0090-6980(77)90004-1).
- Offermanns, S., K. L. Laugwitz, K. Spicher, et G. Schultz. 1994. « G Proteins of the G12 Family Are Activated via Thromboxane A₂ and Thrombin Receptors in Human Platelets ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (2): 504-8.
- Offermanns, S., C. F. Toombs, Y. H. Hu, et M. I. Simon. 1997. « Defective Platelet Activation in G Alpha(q)-Deficient Mice ». *Nature* 389 (6647): 183-86. <https://doi.org/10.1038/38284>.
- Oury, C., E. Toth-Zsamboki, C. Thys, J. Tytgat, J. Vermynen, et M. F. Hoylaerts. 2001. « The ATP-Gated P2X₁ Ion Channel Acts as a Positive Regulator of Platelet Responses to Collagen ». *Thrombosis and Haemostasis* 86 (5): 1264-71.

- Palmer, R. M., D. S. Ashton, et S. Moncada. 1988. « Vascular Endothelial Cells Synthesize Nitric Oxide from L-Arginine ». *Nature* 333 (6174): 664-66. <https://doi.org/10.1038/333664a0>.
- Palmer, R. M. J., A. G. Ferrige, et S. Moncada. 1987. « Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor ». *Nature* 327 (6122): 524-26. <https://doi.org/10.1038/327524a0>.
- Pampus, E. C. M. van, P. C. Huijgens, A. Zevenbergen, H. Twaalfhoven, G. J. van Kamp, et M. M. a. C. Langenhuijsen. 1993. « Influence of Aspirin on Human Megakaryocyte Prostaglandin Synthesis ». *European Journal of Haematology* 50 (5): 264-68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1993.tb00160.x>.
- Patel, Sunita R., John H. Hartwig, et Joseph E. Italiano. 2005. « The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (12): 3348-54. <https://doi.org/10.1172/JCI26891>.
- Patrignani, P., M. G. Sciulli, S. Manarini, G. Santini, C. Cerletti, et V. Evangelista. 1999. « COX-2 Is Not Involved in Thromboxane Biosynthesis by Activated Human Platelets ». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 50 (4): 661-67.
- Patrignani, P., S. Tacconelli, E. Piazuelo, L. Di Francesco, M. Dovizio, C. Sostres, E. Marcantoni, et al. 2014. « Reappraisal of the clinical pharmacology of low-dose aspirin by comparing novel direct and traditional indirect biomarkers of drug action ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12 (8): 1320-30. <https://doi.org/10.1111/jth.12637>.
- Patrono, Carlo, et Bianca Rocca. 2007. « Drug Insight: Aspirin Resistance—fact or Fashion? » *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 4 (1): 42-50. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0728>.
- . 2019. « Measurement of Thromboxane Biosynthesis in Health and Disease ». *Frontiers in Pharmacology* 10 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01244>.
- Patscheke, H., et K. Stegmeier. 1984. « Investigation on a Selective Non-Prostanoid Thromboxane Antagonist, BM 13.177, in Human Platelets ». *Thrombosis Research* 33 (3): 277-88. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(84\)90163-4](https://doi.org/10.1016/0049-3848(84)90163-4).
- Pedersen, Anders K., et Garret A. FitzGerald. 1984. « Dose-Related Kinetics of Aspirin ». *New England Journal of Medicine* 311 (19): 1206-11. <https://doi.org/10.1056/NEJM198411083111902>.
- Petrucci, Giovanna, Raimondo De Cristofaro, Sergio Rutella, Franco O. Ranelletti, Davide Pocaterra, Stefano Lancellotti, Aida Habib, Carlo Patrono, et Bianca Rocca. 2011. « Prostaglandin E2 Differentially Modulates Human Platelet Function through the Prostanoid EP2 and EP3 Receptors ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 336 (2): 391-402. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.174821>.
- Pfeifer, A., P. Ruth, W. Dostmann, M. Sausbier, P. Klatt, et F. Hofmann. 1999. « Structure and Function of CGMP-Dependent Protein Kinases ». *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 135: 105-49. <https://doi.org/10.1007/bfb0033671>.
- Philipose, Sonia, Viktoria Konya, Ivana Sreckovic, Gunther Marsche, Irmgard T. Lippe, Bernhard A. Peskar, Akos Heinemann, et Rufina Schuligoi. 2010. « The Prostaglandin E2 Receptor EP4 Is Expressed by Human Platelets and Potently Inhibits Platelet Aggregation and Thrombus Formation ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (12): 2416-23. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.216374>.
- Picot, D., P. J. Loll, et R. M. Garavito. 1994. « The X-Ray Crystal Structure of the Membrane Protein Prostaglandin H2 Synthase-1 ». *Nature* 367 (6460): 243-49. <https://doi.org/10.1038/367243a0>.
- Pinckard, R. N., D. Hawkins, et R. S. Farr. 1968. « In Vitro Acetylation of Plasma Proteins, Enzymes and DNA by Aspirin ». *Nature* 219 (5149): 68-69. <https://doi.org/10.1038/219068a0>.
- Pinto, Cibele, Dan Papa, Melanie Hübner, Tung-Chung Mou, Gerald H. Lushington, et Roland Seifert. 2008. « Activation and Inhibition of Adenylyl Cyclase Isoforms by Forskolin Analogs ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 325 (1): 27-36. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.131904>.

- Polgár, János, Jeannine M. Clemetson, Beate E. Kehrel, Markus Wiedemann, Edith M. Magnenat, Timothy N. C. Wells, et Kenneth J. Clemetson. 1997. « Platelet Activation and Signal Transduction by Convulxin, a C-Type Lectin from *Crotalus Durissus Terrificus* (Tropical Rattlesnake) Venom via the P62/GPVI Collagen Receptor ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (21): 13576-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13576>.
- Poole, A, J M Gibbins, M Turner, M J van Vugt, J G van de Winkel, T Saito, V L Tybulewicz, et S P Watson. 1997. « The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. » *The EMBO Journal* 16 (9): 2333-41. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2333>.
- Priviero, Fernanda B. M., et R. Clinton Webb. 2010. « Heme-Dependent and Independent soluble Guanylate Cyclase Activators and Vasodilation ». *Journal of cardiovascular pharmacology* 56 (3): 229-33. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181eb4e75>.
- Pulcinelli, Fabio M, Pasquale Pignatelli, Andrea Celestini, Silvia Riondino, Pier Paolo Gazzaniga, et Francesco Violi. 2004. « Inhibition of Platelet Aggregation by Aspirin Progressively Decreases in Long-Term Treated Patients ». *Journal of the American College of Cardiology* 43 (6): 979-84. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.08.062>.
- Quek, L. S., J. M. Pasquet, I. Hers, R. Cornall, G. Knight, M. Barnes, M. L. Hibbs, A. R. Dunn, C. A. Lowell, et S. P. Watson. 2000. « Fyn and Lyn Phosphorylate the Fc Receptor Gamma Chain Downstream of Glycoprotein VI in Murine Platelets, and Lyn Regulates a Novel Feedback Pathway ». *Blood* 96 (13): 4246-53.
- Quinton, T. M., S. Kim, J. Jin, et S. P. Kunapuli. 2005. « Lipid Rafts Are Required in Gai Signaling Downstream of the P2Y12 Receptor during ADP-Mediated Platelet Activation ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3 (5): 1036-41. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01325.x>.
- Radley, J. M., et G. Scurfield. 1980. « The Mechanism of Platelet Release ». *Blood* 56 (6): 996-99.
- Radomski, M. W., R. M. J. Palmer, et S. Moncada. 1987. « Endogenous Nitric Oxide Inhibits Human Platelet Adhesion to Vascular Endothelium ». *The Lancet* 330 (8567): 1057-58. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)91481-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)91481-4).
- Rall, T. W., Earl W. Sutherland, et With the technical assistance of Arleen M. Maxwell and James W. Davis. 1962. « Adenyl Cyclase II. the Enzymatically Catalyzed Formation of Adenosine 3'-5' Phosphate and Inorganic Pyrophosphate from Adenosine Triphosphate ». *Journal of Biological Chemistry* 237 (4): 1228-32.
- Rannels, S. R., C. E. Cobb, L. R. Landiss, et J. D. Corbin. 1985. « The Regulatory Subunit Monomer of CAMP-Dependent Protein Kinase Retains the Salient Kinetic Properties of the Native Dimeric Subunit. » *Journal of Biological Chemistry* 260 (6): 3423-30.
- Rannels, S. R., et J. D. Corbin. 1980. « Two Different Intrachain CAMP Binding Sites of CAMP-Dependent Protein Kinases. » *Journal of Biological Chemistry* 255 (15): 7085-88.
- Raslan, Z., S. Magwenzi, A. Aburima, K. Taskén, et K. M. Naseem. 2015. « Targeting of Type I Protein Kinase A to Lipid Rafts Is Required for Platelet Inhibition by the 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate-Signaling Pathway ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 13 (9): 1721-34. <https://doi.org/10.1111/jth.13042>.
- Raslan, Zaher, et Khalid M. Naseem. 2014. « The Control of Blood Platelets by CAMP Signalling ». *Biochemical Society Transactions* 42 (2): 289-94. <https://doi.org/10.1042/BST20130278>.
- . 2015. « Compartmentalisation of CAMP-Dependent Signalling in Blood Platelets: The Role of Lipid Rafts and Actin Polymerisation ». *Platelets* 26 (4): 349-57. <https://doi.org/10.3109/09537104.2014.916792>.
- Rayes, Julie, Steve P. Watson, et Bernhard Nieswandt. 2019. « Functional Significance of the Platelet Immune Receptors GPVI and CLEC-2 ». *Journal of Clinical Investigation* 129 (1): 12-23. <https://doi.org/10.1172/JCI122955>.

- Reilly, I. A., et G. A. FitzGerald. 1987. « Inhibition of Thromboxane Formation in Vivo and Ex Vivo: Implications for Therapy with Platelet Inhibitory Drugs ». *Blood* 69 (1): 180-86. <https://doi.org/10.1182/blood.V69.1.180.180>.
- Reiter, C. D., R. J. Teng, et J. S. Beckman. 2000. « Superoxide Reacts with Nitric Oxide to Nitrate Tyrosine at Physiological PH via Peroxynitrite ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (42): 32460-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910433199>.
- Revel, T de, et K Doghmi. 2004. « Physiologie de l'hémostase ». *EMC - Dentisterie* 1 (1): 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.emcnden.2003.05.001>.
- Ringheim, G. E., et S. S. Taylor. 1990. « Dissecting the Domain Structure of the Regulatory Subunit of CAMP-Dependent Protein Kinase I and Elucidating the Role of MgATP. » *Journal of Biological Chemistry* 265 (9): 4800-4808.
- Riondino, Silvia, Lavinia V. Lotti, Lucia Cutini, et Fabio M. Pulcinelli. 2005. « Collagen-Induced Platelet Shape Change Is Not Affected by Positive Feedback Pathway Inhibitors and CAMP-Elevating Agents ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (8): 6504-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407854200>.
- Roberts, L. J., B. J. Sweetman, et J. A. Oates. 1981. « Metabolism of Thromboxane B2 in Man. Identification of Twenty Urinary Metabolites ». *The Journal of Biological Chemistry* 256 (16): 8384-93.
- Roberts, MS, RH Rumble, S Wanwimolruk, D Thomas, et PM Brooks. 1983. « Pharmacokinetics of Aspirin and Salicylate in Elderly Subjects and in Patients With Alcoholic Liver Disease ». *European Journal of Clinical Pharmacology* 25 (2). <https://doi.org/10.1007/BF00543800>.
- Robison, G. A., et E. W. Sutherland. 1971. « Cyclic AMP and the Function of Eukaryotic Cells: An Introduction ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 185 (décembre): 5-9. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1971.tb45229.x>.
- Rocca, Bianca, Paola Secchiero, Giovanni Ciabattoni, Franco O. Ranelletti, Lucia Catani, Lia Guidotti, Elisabetta Melloni, Nicola Maggiano, Giorgio Zauli, et Carlo Patrono. 2002. « Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (11): 7634–7639.
- Rosa, Jean-Philippe, Hana Raslova, et Marijke Bryckaert. 2019. « Filamin A: Key Actor in Platelet Biology ». *Blood* 134 (16): 1279-88. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000014>.
- Roth, G. J., et D. C. Calverley. 1994. « Aspirin, Platelets, and Thrombosis: Theory and Practice ». *Blood* 83 (4): 885-98. <https://doi.org/10.1182/blood.V83.4.885.885>.
- Roth, G J, N Stanford, et P W Majerus. 1975. « Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (8): 3073-76.
- Rowland, M., S. Riegelman, P. A. Harris, et S. D. Sholkoff. 1972. « Absorption Kinetics of Aspirin in Man Following Oral Administration of an Aqueous Solution ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61 (3): 379-85. <https://doi.org/10.1002/jps.2600610312>.
- Ruggeri, Zaverio M., et G. Loredana Mendolicchio. 2007. « Adhesion Mechanisms in Platelet Function ». *Circulation Research* 100 (12): 1673-85. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000267878.97021.ab>.
- Russel, Frans G. M., Jan B. Koenderink, et Rosalinde Masereeuw. 2008. « Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4): A Versatile Efflux Transporter for Drugs and Signalling Molecules ». *Trends in Pharmacological Sciences* 29 (4): 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.01.006>.
- Salem, Sa, et Ih Stevenson. 1977. « Absorption Kinetics of Aspirin and Quinine in Elderly Subjects [Proceedings] ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 4 (3): 397P-396P. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1977.tb00745.x>.
- Salzman, E. W., P. C. Kensler, et L. Levine. 1972. « Cyclic 3',5'-Adenosine Monophosphate in Human Blood Platelets. IV. Regulatory Role of Cyclic Amp in Platelet Function ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 201 (octobre): 61-71. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1972.tb16287.x>.

- Salzman, E. W., et L. L. Neri. 1969. « Cyclic 3',5'-Adenosine Monophosphate in Human Blood Platelets ». *Nature* 224 (5219): 609-10. <https://doi.org/10.1038/224609a0>.
- Salzman, Edwin W., et Linda Levine. 1971. « Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in human blood platelets ». *Journal of Clinical Investigation* 50 (1): 131-41.
- Samama, M. -M., et I. Elalamy. 2009. « Étude de la variabilité de réponse à l'aspirine et au clopidogrel : résistance clinique et/ou biologique ? » *Annales Pharmaceutiques Françaises* 67 (4): 265-71. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2009.05.002>.
- Santilli, Francesca, Bianca Rocca, Raimondo De Cristofaro, Stefano Lattanzio, Laura Pietrangelo, Aida Habib, Caterina Pettinella, et al. 2009. « Platelet Cyclooxygenase Inhibition by Low-Dose Aspirin Is Not Reflected Consistently by Platelet Function Assays: Implications for Aspirin "Resistance" ». *Journal of the American College of Cardiology* 53 (8): 667-77. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.10.047>.
- Sase, K., et T. Michel. 1995. « Expression of Constitutive Endothelial Nitric Oxide Synthase in Human Blood Platelets ». *Life Sciences* 57 (22): 2049-55. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02191-k](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02191-k).
- Sassi, Yassine, Aniella Abi-Gerges, Jeremy Fauconnier, Nathalie Mougenot, Steven Reiken, Kobra Haghighi, Evangelia G. Kranias, et al. 2012. « Regulation of CAMP Homeostasis by the Efflux Protein MRP4 in Cardiac Myocytes ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (3): 1009-17. <https://doi.org/10.1096/fj.11-194027>.
- Sassi, Yassine, Larissa Lipskaia, Grégoire Vandecasteele, Viacheslav O. Nikolaev, Stéphane N. Hatem, Fleur Cohen Aubart, Frans G. Russel, et al. 2008. « Multidrug Resistance-Associated Protein 4 Regulates CAMP-Dependent Signaling Pathways and Controls Human and Rat SMC Proliferation ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (8): 2747-57. <https://doi.org/10.1172/JCI35067>.
- Schrör, K., H. Darius, R. Matzky, et R. Ohlendorf. 1981. « The Antiplatelet and Cardiovascular Actions of a New Carbacyclin Derivative (ZK 36 374)--Equipotent to PGI₂ in Vitro ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 316 (3): 252-55. <https://doi.org/10.1007/BF00505658>.
- Schuetz, J. D., M. C. Connelly, D. Sun, S. G. Paibir, P. M. Flynn, R. V. Srinivas, A. Kumar, et A. Fridland. 1999. « MRP4: A Previously Unidentified Factor in Resistance to Nucleoside-Based Antiviral Drugs ». *Nature Medicine* 5 (9): 1048-51. <https://doi.org/10.1038/12487>.
- Seamon, K B, W Padgett, et J W Daly. 1981. « Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (6): 3363-67.
- Seeley, S, L Covic, SI Jacques, J Sudmeier, Jd Baleja, et A Kuliopulos. 2003. « Structural Basis for Thrombin Activation of a Protease-Activated Receptor: Inhibition of Intramolecular Liganding. » *Chemistry & Biology* 10 (11): 1033-41. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.10.014>.
- Sekiya, Fujio, Junichi Takagi, Tomoko Usui, Keiko Kawajiri, Yuichi Kobayashi, Fumie Sato, et Yuji Saito. 1991. « 12S-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Plays a Central Role in the Regulation of Platelet Activation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179 (1): 345-51. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)91376-N](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)91376-N).
- Senis, Yotis A., Alexandra Mazharian, et Jun Mori. 2014. « Src family kinases: at the forefront of platelet activation ». *Blood* 124 (13): 2013-24. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-453134>.
- Serhan, Charles N., Song Hong, Karsten Gronert, Sean P. Colgan, Pallavi R. Devchand, Gudrun Mirick, et Rose-Laure Moussignac. 2002. « Resolvins ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (8): 1025-37. <https://doi.org/10.1084/jem.20020760>.
- Shattil, Sanford J., Chungho Kim, et Mark H. Ginsberg. 2010. « The Final Steps of Integrin Activation: The End Game ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (4): 288-300. <https://doi.org/10.1038/nrm2871>.

- Shaw, T., C. N. Chesterman, et F. J. Morgan. 1984. « In Vitro Synthesis of Low Molecular Weight Proteins in Human Platelets: Absence of Labelled Release Products ». *Thrombosis Research* 36 (6): 619-31. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(84\)90201-9](https://doi.org/10.1016/0049-3848(84)90201-9).
- Skidgel, R. A., et M. P. Printz. 1978. « PGI₂ Production by Rat Blood Vessels: Diminished Prostacyclin Formation in Veins Compared to Arteries ». *Prostaglandins* 16 (1): 1-16. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(78\)90196-x](https://doi.org/10.1016/0090-6980(78)90196-x).
- Skuballa, W., E. Schillinger, C. S. Stürzebecher, et H. Vorbrüggen. 1986. « Synthesis of a New Chemically and Metabolically Stable Prostacyclin Analogue with High and Long-Lasting Oral Activity ». *Journal of Medicinal Chemistry* 29 (3): 313-15. <https://doi.org/10.1021/jm00153a001>.
- Smeets, Pascal H. E., Rémon A. M. H. van Aubel, Alfons C. Wouterse, Jeroen J. M. W. van den Heuvel, et Frans G. M. Russel. 2004. « Contribution of Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2/ABCC2) to the Renal Excretion of p-Aminohippurate (PAH) and Identification of MRP4 (ABCC4) as a Novel PAH Transporter ». *Journal of the American Society of Nephrology* 15 (11): 2828-35. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000143473.64430.AC>.
- Smith, Jeffrey A., Sharron H. Francis, Kenneth A. Walsh, Santosh Kumar, et Jackie D. Corbin. 1996. « Autophosphorylation of Type I β CGMP-Dependent Protein Kinase Increases Basal Catalytic Activity and Enhances Allosteric Activation by CGMP or CAMP ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (34): 20756-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20756>.
- Smith, W. L., D. L. DeWitt, et R. M. Garavito. 2000. « Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology ». *Annual Review of Biochemistry* 69: 145-82. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>.
- Smolenski, A. 2012. « Novel Roles of CAMP/CGMP-Dependent Signaling in Platelets: CAMP/CGMP-Signaling in Platelets ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 10 (2): 167-76. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04576.x>.
- Smyth, Emer M., Tilo Grosser, Miao Wang, Ying Yu, et Garret A. FitzGerald. 2009. « Prostanoids in health and disease ». *Journal of Lipid Research* 50 (Suppl): S423-28. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800094-JLR200>.
- Steer, M. L., et A. Levitzki. 1975. « The Control of Adenylate Cyclase by Calcium in Turkey Erythrocyte Ghosts. » *Journal of Biological Chemistry* 250 (6): 2080-84.
- Stefanini, Lucia, et Wolfgang Bergmeier. 2019. « RAP GTPases and platelet integrin signaling ». *Platelets* 30 (1): 41-47. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1476681>.
- Stone, J. R., et M. A. Marletta. 1996. « Spectral and Kinetic Studies on the Activation of Soluble Guanylate Cyclase by Nitric Oxide ». *Biochemistry* 35 (4): 1093-99. <https://doi.org/10.1021/bi9519718>.
- Stürzebecher, S., M. Haberey, B. Müller, E. Schillinger, G. Schröder, W. Skuballa, G. Stock, H. Vorbrüggen, et W. Witt. 1986. « Pharmacological Profile of a Novel Carbacyclin Derivative with High Metabolic Stability and Oral Activity in the Rat ». *Prostaglandins* 31 (1): 95-109. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(86\)90228-5](https://doi.org/10.1016/0090-6980(86)90228-5).
- Sullivan, P. S., et T. P. McDonald. 1990. « Acetylsalicylic Acid Stimulates Murine Megakaryocyte Precursor Cells ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 194 (3): 216-20. <https://doi.org/10.3181/00379727-194-43081>.
- Sun, Frank F. 1977. « Biosynthesis of Thromboxanes in Human Platelets. I. Characterization and Assay of Thromboxane Synthetase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 74 (4): 1432-40. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)90602-7).
- Sunahara, R. K., C. W. Dessauer, et A. G. Gilman. 1996. « Complexity and Diversity of Mammalian Adenylyl Cyclases ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36: 461-80. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.36.040196.002333>.
- Sutherland, Earl W., T. W. Rall, et Tara Menon. 1962. « Adenyl Cyclase I. Distribution, Preparation and Properties ». *Journal of Biological Chemistry* 237 (4): 1220-27.

- Tang, W. J., et A. G. Gilman. 1995. « Construction of a Soluble Adenylyl Cyclase Activated by Gs Alpha and Forskolin ». *Science (New York, N.Y.)* 268 (5218): 1769-72. <https://doi.org/10.1126/science.7792604>.
- Tateson, J. E., S. Moncada, et J. R. Vane. 1977. « Effects of Prostacyclin (PGX) on Cyclic AMP Concentrations in Human Platelets ». *Prostaglandins* 13 (3): 389-97. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(77\)90019-3](https://doi.org/10.1016/0090-6980(77)90019-3).
- Tesmer, J. J., R. K. Sunahara, A. G. Gilman, et S. R. Sprang. 1997. « Crystal Structure of the Catalytic Domains of Adenylyl Cyclase in a Complex with Gsalpha.GTPgammaS ». *Science (New York, N.Y.)* 278 (5345): 1907-16. <https://doi.org/10.1126/science.278.5345.1907>.
- Tesmer, J. J., R. K. Sunahara, R. A. Johnson, G. Gosselin, A. G. Gilman, et S. R. Sprang. 1999. « Two-Metal-Ion Catalysis in Adenylyl Cyclase ». *Science (New York, N.Y.)* 285 (5428): 756-60. <https://doi.org/10.1126/science.285.5428.756>.
- The RISC Group. 1990. « Risk of Myocardial Infarction and Death during Treatment with Low Dose Aspirin and Intravenous Heparin in Men with Unstable Coronary Artery Disease ». *The Lancet* 336 (8719): 827-30. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92336-G](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92336-G).
- Thomas, Wendy E. 2009. « Mechanochemistry of Receptor-Ligand Bonds ». *Current Opinion in Structural Biology* 19 (1): 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.12.006>.
- Thon, Jonathan N., et Joseph E. Italiano. 2012. « Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure ». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n° 210: 3-22. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5_1.
- Tomer, A., L. A. Harker, et S. A. Burstein. 1988. « Flow Cytometric Analysis of Normal Human Megakaryocytes ». *Blood* 71 (5): 1244-52.
- Uchida, Y., et S. Murao. 1981. « Effects of Thromboxane Synthetase Inhibitors on Cyclical Reduction of Coronary Blood Flow in Dogs ». *Japanese Heart Journal* 22 (6): 971-75. <https://doi.org/10.1536/ihj.22.971>.
- Vainchenker, William, Najet Debili, et Françoise Wendling. 2017. « Mégacaryocytopoïèse et plaquettogénèse ». <http://www.em-premium.com/data/traites/sa/13-15592/>, avril. <http://www.em-premium.com/buadistant.univ-angers.fr/article/853/resultatrecherche/115>.
- Vercellino, Irene, Lenka Rezaczkova, Vincent Olieric, Yevhen Polyhach, Tobias Weinert, Richard A. Kammerer, Gunnar Jeschke, et Volodymyr M. Korkhov. 2017. « Role of the nucleotidyl cyclase helical domain in catalytically active dimer formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (46): E9821-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712621114>.
- Veza, Roberta, Aida Habib, et Garret A. FitzGerald. 1999. « Differential Signaling by the Thromboxane Receptor Isoforms via the Novel GTP-Binding Protein, Gh ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (18): 12774-79. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12774>.
- Vial, Catherine, Michael G. Rolf, Martyn P. Mahaut-Smith, et Richard J. Evans. 2002. « A Study of P2X1 Receptor Function in Murine Megakaryocytes and Human Platelets Reveals Synergy with P2Y Receptors ». *British Journal of Pharmacology* 135 (2): 363-72. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704486>.
- Vitrat, Natacha, Karine Cohen-Solal, Claudine Pique, Jean Pierre LeCouedic, Françoise Norol, Annette K. Larsen, André Katz, William Vainchenker, et Najet Debili. 1998. « Endomitosis of Human Megakaryocytes Are Due to Abortive Mitosis ». *Blood* 91 (10): 3711-23. <https://doi.org/10.1182/blood.V91.10.3711>.
- Wallis, Robert M, Jackie D Corbin, Sharron H Francis, et Peter Ellis. 1999. « Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro ». *The American Journal of Cardiology* 83 (5, Supplement 1): 3-12. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(99)00042-9).
- Warshaw, A. L., L. Laster, et N. R. Shulman. 1967. « Protein Synthesis by Human Platelets ». *The Journal of Biological Chemistry* 242 (9): 2094-97.

- Wedel, B., C. Harteneck, J. Foerster, A. Friebe, G. Schultz, et D. Koesling. 1995. « Functional Domains of Soluble Guanylyl Cyclase ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (42): 24871-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.24871>.
- Weiss, H. J., V. T. Turitto, et H. R. Baumgartner. 1978. « Effect of Shear Rate on Platelet Interaction with Subendothelium in Citrated and Native Blood. I. Shear Rate--Dependent Decrease of Adhesion in von Willebrand's Disease and the Bernard-Soulier Syndrome ». *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 92 (5): 750-64.
- White, J. G. 1968. « Effects of colchicine and Vinca alkaloids on human platelets. I. Influence on platelet microtubules and contractile function. » *The American Journal of Pathology* 53 (2): 281-91.
- . 1984. « Arrangements of actin filaments in the cytoskeleton of human platelets. » *The American Journal of Pathology* 117 (2): 207-17.
- White, J. G., et C. C. Clawson. 1980. « The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. » *The American Journal of Pathology* 101 (2): 353-64.
- White, J. G., et G. H. Rao. 1982. « Effects of a Microtubule Stabilizing Agent on the Response of Platelets to Vincristine ». *Blood* 60 (2): 474-83.
- White, James G. 1972. « Interaction of Membrane Systems in Blood Platelets ». *The American Journal of Pathology* 66 (2): 295-312.
- Wielinga, Peter R., Ingrid van der Heijden, Glen Reid, Jos H. Beijnen, Jan Wijnholds, et Piet Borst. 2003. « Characterization of the MRP4- and MRP5-Mediated Transport of Cyclic Nucleotides from Intact Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (20): 17664-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212723200>.
- Willoughby, D. A., A. R. Moore, et P. R. Colville-Nash. 2000. « COX-1, COX-2, and COX-3 and the Future Treatment of Chronic Inflammatory Disease ». *Lancet (London, England)* 355 (9204): 646-48. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)12031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)12031-2).
- Wilson, J. T., R. L. Howell, M. W. Holladay, G. M. Brilis, J. Chrastil, J. T. Watson, et D. F. Taber. 1978. « Gentisuric Acid: Metabolic Formation in Animals and Identification as a Metabolite of Aspirin in Man ». *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 23 (6): 635-43. <https://doi.org/10.1002/cpt1978236635>.
- Witt, Susanne M. de, Remco Verdoold, Judith M. E. M. Cosemans, et Johan W. M. Heemskerk. 2014. « Insights into Platelet-Based Control of Coagulation ». *Thrombosis Research* 133 Suppl 2 (mai): S139-148. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(14\)50024-2](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(14)50024-2).
- Wood, Alastair J.J., et Carlo Patrono. 1994. « Aspirin as an Antiplatelet Drug ». *New England Journal of Medicine* 330 (18): 1287-94. <https://doi.org/10.1056/NEJM199405053301808>.
- Worthington, R.E., et A. Nakeff. 1982. « Aspirin Inhibits Rat Megakaryocyte Thromboxane Synthesis ». *Prostaglandins* 23 (6): 841-53. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(82\)90128-9](https://doi.org/10.1016/0090-6980(82)90128-9).
- Wurtz, Morten, Steen Dalby Kristensen, Anne-Mette Hvas, et Erik Lerkevang Grove. 2012. « Pharmacogenetics of the Antiplatelet Effect of Aspirin ». *Current Pharmaceutical Design* 18 (33): 5294-5308. <https://doi.org/10.2174/138161212803251907>.
- Xiao, Guishan, Wei Chen, et Richard J. Kulmacz. 1998. « Comparison of Structural Stabilities of Prostaglandin H Synthase-1 and -2 ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (12): 6801-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.12.6801>.
- Xu, Guofeng, Dan Shang, Zuping Zhang, Tanner S. Shaw, Yali Ran, José A. López, et Yuandong Peng. 2015. « The Transmembrane Domains of β and IX Subunits Mediate the Localization of the Platelet Glycoprotein Ib-IX Complex to the Glycosphingolipid-enriched Membrane Domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (36): 22155-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.668145>.
- Xu, R. X., A. M. Hassell, D. Vanderwall, M. H. Lambert, W. D. Holmes, M. A. Luther, W. J. Rocque, et al. 2000. « Atomic Structure of PDE4: Insights into Phosphodiesterase Mechanism and Specificity ». *Science (New York, N.Y.)* 288 (5472): 1822-25. <https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1822>.

- Yadav, Shilpi, et Brian Storrie. 2017. « The Cellular Basis of Platelet Secretion: Emerging Structure/Function Relationships ». *Platelets* 28 (2): 108-18. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1257786>.
- Yamamoto, Kazuhiro, Satoshi Ebina, Hironori Nakanishi, et Norimichi Nakahata. 1995. « Thromboxane A2 Receptor-Mediated Signal Transduction in Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells ». *General Pharmacology: The Vascular System* 26 (7): 1489-98. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(95\)00025-9](https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)00025-9).
- Yang, Jing, Jie Wu, Hong Jiang, Richard Mortensen, Sandra Austin, David R. Manning, Donna Woulfe, et Lawrence F. Brass. 2002. « Signaling through Gi Family Members in Platelets REDUNDANCY AND SPECIFICITY IN THE REGULATION OF ADENYLYL CYCLASE AND OTHER EFFECTORS ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (48): 46035-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208519200>.
- Yates, Luke A., Anna K. Füzéry, Roman Bonet, Iain D. Campbell, et Robert J. C. Gilbert. 2012. « Biophysical Analysis of Kindlin-3 Reveals an Elongated Conformation and Maps Integrin Binding to the Membrane-distal β -Subunit NPXY Motif ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (45): 37715-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.415208>.
- Young, José P., Jacob Beckerman, Stefano Vicini, et Adam Myers. 2010. « Acetylsalicylic acid enhances purinergic receptor-mediated outward currents in rat megakaryocytes ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 298 (3): C602-10. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00422.2009>.
- Yuan, Chong, Caroline Jill Rieke, Gilad Rimon, Byron A. Wingerd, et William L. Smith. 2006. « Partnering between Monomers of Cyclooxygenase-2 Homodimers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (16): 6142-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601805103>.
- Zahedi, René P., Urs Lewandrowski, Julia Wiesner, Stefanie Wortelkamp, Jan Moebius, Claudia Schütz, Ulrich Walter, Stepan Gambaryan, et Albert Sickmann. 2008. « Phosphoproteome of Resting Human Platelets ». *Journal of Proteome Research* 7 (2): 526-34. <https://doi.org/10.1021/pr0704130>.
- Zhang, G., Y. Liu, A. E. Ruoho, et J. H. Hurley. 1997. « Structure of the Adenylyl Cyclase Catalytic Core ». *Nature* 386 (6622): 247-53. <https://doi.org/10.1038/386247a0>.
- Zhang, Kam Y. J., Graeme L. Card, Yoshihisa Suzuki, D. Richard Artis, Daniel Fong, Sam Gillette, Davin Hsieh, et al. 2004. « A Glutamine Switch Mechanism for Nucleotide Selectivity by Phosphodiesterases ». *Molecular Cell* 15 (2): 279-86. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.005>.
- Zhang, Wei, et Robert W. Colman. 2007. « Thrombin regulates intracellular cyclic AMP concentration in human platelets through phosphorylation/activation of phosphodiesterase 3A ». *Blood* 110 (5): 1475-82. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-052522>.
- Zharikov, Sergey, et Sruti Shiva. 2013. « Platelet Mitochondrial Function: From Regulation of Thrombosis to Biomarker of Disease ». *Biochemical Society Transactions* 41 (1): 118-23. <https://doi.org/10.1042/BST20120327>.
- Zhou, Q., G. R. Hellermann, et L. P. Solomonson. 1995. « Nitric Oxide Release from Resting Human Platelets ». *Thrombosis Research* 77 (1): 87-96. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(95\)90868-g](https://doi.org/10.1016/0049-3848(95)90868-g).
- Zhou, Zhichao, Changyan Sun, Stephen L. Tilley, et Jamal Mustafa. 2015. « Mechanisms underlying uridine adenosine tetraphosphate-induced vascular contraction in mouse aorta: role of thromboxane and purinergic receptors ». *Vascular pharmacology* 73 (octobre): 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.04.009>.
- Zimmermann, N., A. Wenk, U. Kim, P. Kienzle, A.-A. Weber, E. Gams, K. Schrör, et T. Hohlfeld. 2003. « Functional and Biochemical Evaluation of Platelet Aspirin Resistance After Coronary Artery Bypass Surgery ». *Circulation* 108 (5): 542-47. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000081770.51929.5A>.

Résumé de thèse

Les plaquettes sanguines circulent dans le sang au repos, cet état inactivé étant maintenu par la production de prostacycline et de monoxyde d'azote par l'endothélium vasculaire. Ces deux agents activent respectivement les voies des nucléotides cycliques : AMPc et GMPc. La prostacycline (ou prostaglandine I₂), après liaison au récepteur IP, active l'adénylate cyclase (AC) via une protéine G_s. L'AC activée est responsable de la formation d'AMPc intraplaquettaire qui conduit à une inhibition de l'activation plaquettaire. Afin de permettre l'activation plaquettaire, le taux d'AMPc est réprimé i) par l'action des phosphodiésterases (PDE), qui le dégradent, ii) l'ADP, qui en se fixant sur P2Y₁₂ active une G_i inhibitrice de l'AC, iii) par son efflux du cytosol via notamment la protéine d'efflux MRP4 (ABCC4), et iv) par une compartimentation subcellulaire de la voie de l'AMPc, mécanisme très peu documenté dans les plaquettes.

Outre son rôle dans l'homéostasie de l'AMPc, de récentes études suggèrent que MRP4 serait également associée à des états de résistance plaquettaire à l'aspirine. En effet, un traitement par aspirine au long cours induirait une surexpression de MRP4 dans les plaquettes et cette surexpression serait par la suite responsable de l'efflux de l'aspirine hors des plaquettes, diminuant alors son efficacité.

Les travaux présentés dans cette thèse ont eu pour objectif d'étudier la régulation de la voie de l'AMPc sous forme de microdomaines et l'impact d'un traitement par l'aspirine *in vivo* sur l'expression de MRP4 et sa répercussion sur l'homéostasie de l'AMPc. L'étude de la répartition des acteurs de la voie de l'AMPc révèlent une répartition non homogène au sein des membranes. En effet, une partie des acteurs sont présents hors des radeaux lipidiques membranaires bien qu'une fraction de PKA ainsi que de G_i soient présents dans les radeaux lipidiques. Cette répartition suggère diverses voies de régulation de la voie de l'AMPc. En effet, la présence d'acteurs hors des radeaux lipidiques est compatible avec le modèle d'organisation sous forme de microdomaines à AMPc comprenant la voie de synthèse (G_s, ACIII), l'effecteur PKA mais également la voie de régulation par les PDEs 2A et 3A. Ces microdomaines pourraient alors réguler localement la réponse plaquettaire. Par ailleurs, la présence d'acteurs de la voie de l'AMPc dans les radeaux lipidiques est compatible avec le modèle d'organisation ayant pour rôle de produire de l'AMPc qui diffuse plus facilement dans le cytoplasme (absence de PDE à proximité) pour exercer son effet inhibiteur, tout en maintenant un niveau d'inhibition contraint comme en témoigne l'augmentation de l'effet inhibiteur d'un activateur de la voie de l'AMPc lors de destruction des radeaux lipidiques. Ainsi l'organisation de la voie de l'AMPc sous différentes formes, en microdomaines AMPc ou non, pourrait impliquer des degrés différents d'inhibition plaquettaire par l'AMPc.

Pour le second objectif, l'étude de différentes voies d'administration de l'aspirine chez deux souches de souris nous a permis de définir la voie orale comme étant la voie la plus appropriée pour l'étude de l'effet anti plaquettaire de l'aspirine. Son effet est mesurable 30 min après administration et reste mesurable à 3 heures avec une meilleure reproductibilité chez la souche C56/BL6. La dose de 100 mg/Kg induit une augmentation du temps de saignement et inhibe l'activité plaquettaire comme le montre une inhibition de 50 % de l'agrégation au collagène et la baisse de 85 % de la production de thromboxane B₂. L'administration de l'aspirine durant 4 jours permet d'induire une augmentation de l'expression plaquettaire de MRP4 d'un facteur 2,5.

Ce travail a permis de mieux caractériser le rôle de MRP4 dans la voie de l'AMPc et de définir le modèle préclinique d'administration de l'aspirine afin d'étudier le rôle de MRP4 dans la résistance au traitement.