



N° :

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

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie
Option Biologie Moléculaire et cellulaire

Par

Tovo DAVID

**Cartographie fonctionnelle des domaines intracellulaires du complexe
plaquettaire GPIb-V-IX et identification d'un nouveau partenaire
cytoplasmique.**

Directeur de Thèse

Mr François LANZA

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2006

Membres du jury:

Directeur de Thèse	Mr. François LANZA, Directeur de Recherche INSERM, Strasbourg
Rapporteur externe	Prof. Hans DECKMYN, Korktrijk, Belgique.
Rapporteur externe	Prof. Wolfgang SIESS, Munich, Allemagne.
Rapporteur interne	Mme. Patricia SIMON-ASSMANN, Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg.
Examineur	Mr. François LE NAOUR, Chargé de Recherche INSERM, Villejuif.
Examineur	Prof. Jean Pierre CAZENAVE, Strasbourg.

Application de la loi de Murphy :

« Quand on jette un chat en l'air, il retombe toujours du côté confiture... »

Patrice Cassard

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean-Pierre Cazenave et de m'avoir accueilli au sein de l'Etablissement Français du Sang Alsace, et de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail. Au cours de mon DEA et de ma thèse, j'ai beaucoup appris à vos côtés et je vous en suis très reconnaissant.

Je remercie également le Docteur Christian Gachet de m'avoir accueilli au sein de l'unité INSERM 311 et de m'avoir prodigué ses conseils tout au long de ce travail, avec un œil attentif pour canaliser ma fougue et mes dispersions. Merci à vous.

Un grand merci aux membres de mon jury, Madame Simon-Assmann, Monsieur Le Naour et Messieurs les Professeurs Deckmyn et Siess de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse.

Je remercie sincèrement François Lanza pour m'avoir intégré à son équipe et confié ce projet de recherche. A son contact j'ai pu découvrir la rigueur scientifique et la poursuite du travail bien fait. Tes connaissances et tes conseils m'ont été d'une grande aide, autant pour cette thèse que pour la suite. Merci de ta grande patience à mon égard, j'ai beaucoup appris avec toi.

Merci à Pierre qui a su être de bon conseil, de m'avoir laissé son bureau pendant son absence, et pour les discussions scientifiques autour d'un Coca light. Merci à Catherine d'avoir constitué le comité des fêtes en ma compagnie, ça y est, t'es toute seule pour les cagnottes ! Un grand merci à Dominique pour les 2700 litres de suspension plaquettaire lavés, et toujours avec le sourire. Merci à vous Anita, Fabienne et Jean-Yves pour votre contribution précieuse à mon travail. Merci à Marie-Jeanne pour les transfusions.

Je tiens à féliciter toutes les personnes de l'U311, techniciens, étudiants, secrétaire et chercheurs pour avoir réussi à me supporter pendant ces 5 ans. Pardon pour le bruit, les cris et les blagues graveleuses. Plus sérieusement, ça a été un plaisir de travailler avec vous, j'ai apprécié votre disponibilité et votre sens de l'équipe.

Merci à Madame Perez pour nos discussions du soir, spéciale dédicace à vous.

Un coucou à ceux qui sont partis, Anthony et Martine. Et même s'il ne lira pas ces lignes, je tiens à remercier Gilles avec qui j'ai passé de très bons moments humains mais aussi scientifiques.

Le pire et le meilleur pour la fin. Merci à toi Shiva (Nicolas), pour les grands moments de travail et de complicité. Ce travail n'aurait pas pu autant avancer sans ta contribution massive. C'est maintenant c'est toi le taulier. Sylvie, que dire... Tu aurais pu être ma mère mais tu m'aurais eu à onze ans... Plus sérieusement je me répète mais j'ai beaucoup appris avec toi, autant humainement que scientifiquement. Je te souhaite de trouver bientôt ton nouveau David.

Je tiens à remercier ma famille. Merci à Mamy, Gus et Marie-Andrée, qui m'ont soutenu (et nourri...) pendant ce long parcours. Un merci à Irina, Aline et Haja pour avoir été là. Merci Papa de n'avoir toujours fait confiance, soutenu et laissé libre de mes choix. Cette thèse est pour toi aussi. J'ai une pensée toute particulière pour ma mère, j'espère qu'elle aurait été fière de moi et du trajet parcouru.

Pour finir, merci à toi Marie, pour cet exploit surhumain de partager au quotidien : mes angoisses, mes tics, mes caprices, ma surdité, Maouaw et bien d'autres de mes défauts. C'est peut être un lieu commun mais je ne serais pas là sans toi. J'aborde avec impatience et sans angoisse la suite de notre aventure, on va bien en profiter (et rien comprendre quand on nous parlera). A ce soir...

SOMMAIRE

FIGURES ET TABLEAUX	7
ABRÉVIATIONS	10
INTRODUCTION GENERALE	13
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	18
1. Généralités sur les plaquettes sanguines	19
1.1. Origine des plaquettes, la mégacaryocytopoïèse	19
1.2. Structure des plaquettes	19
1.3. Fonctions des plaquettes	21
2. Les récepteurs d'adhésion	22
3. Les récepteurs impliqués dans l'activation plaquettaire	23
3.1. Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG).....	23
3.2. Les récepteurs activant une cascade de tyrosine kinases (RTK).....	26
3.3. Signalisation « outside-in » des intégrines.....	28
3.3.1. <i>Cascade de phosphorylation qui implique les src kinases.</i>	29
3.3.2. <i>Rôle de la PLCγ₂ pour la formation de lamellipodes.</i>	29
3.3.3. <i>Rôle des PI3kinases.</i>	29
3.3.4. <i>Contrôle par les protéines associées à l'intégrine αIIbβ3.</i>	30
3.3.5. <i>Signalisation par les autres intégrines.</i>	30
3.4. Les récepteurs canaux	30
4. Régulations négatives	31
4.1.1. <i>Les nucléotides cycliques.</i>	31
4.1.2. <i>PECAM-1 : un récepteur à motifs ITIM.</i>	33
4.1.3. <i>Les protéines de la famille Cbl.</i>	34
5. Conséquences de l'activation sur le changement de forme des plaquettes et l'activation des intégrines	34
5.1. Réorganisation du cytosquelette: « le changement de forme des plaquettes»	34
5.1.1. <i>Le cytosquelette des plaquettes au repos.</i>	35
5.1.1.1. Le réseau de microtubules	35
5.1.1.2. Les réseaux de filaments d'actine.....	37
5.1.2. <i>Le cytosquelette des plaquettes activées.</i>	39
5.1.2.1. Le réseau de microtubules	39
5.1.2.2. Le cytosquelette d'actine	39
5.1.2.3. Désassemblage du cytosquelette d'actine	40
5.1.2.4. Formation des sites de nucléation et élongation des filaments d'actine	40
5.1.2.5. Organisation des filaments d'actine : formation de filopodes et de lamellipodes	43
5.1.2.6. Rôle du changement de forme pour les fonctions plaquettares.....	45
5.2. Activation « inside out » des intégrines plaquettares.....	45
6. L'axe GPIb-V-IX-FW	48
6.1. Structure du complexe GPIb-V-IX	48
6.1.1. <i>La GPIba.</i>	49
6.1.2. <i>La GPIbβ.</i>	51
6.1.3. <i>La GPIX.</i>	52
6.1.4. <i>La GPV.</i>	52
6.2. Gènes, biosynthèse et expression du complexe GPIb-V-IX	53
6.3. Les différents modèles d'études <i>in vitro</i> des fonctions du complexe GPIb-V-IX	54
6.4. Fonctions adhésives du complexe GPIb-V-IX.....	56

6.4.1.	<i>Le FW</i>	56
6.4.2.	<i>Régulations de l'interaction GPIbα-FW</i>	57
6.4.3.	<i>Les sites du FW impliqués dans la liaison à la GPIbα</i>	58
6.4.4.	<i>Les sites de liaison sur la GPIbα</i>	59
6.4.5.	<i>Les autres ligands extracellulaires du complexe GPIb-V-IX</i>	60
6.4.5.1.	L' α -thrombine.....	60
6.4.5.2.	Mac-1.....	61
6.4.5.3.	La P-Sélectine.....	61
6.4.5.4.	Le kininogène de haut poids moléculaire (HMWK).....	61
6.4.5.5.	Le facteur XII de la coagulation.....	62
6.4.6.	<i>Rôles des domaines intracellulaires</i>	62
6.5.	La fonction de signalisation du complexe GPIb-V-IX	64
6.5.1.	<i>Mise en évidence</i>	64
6.5.2.	<i>La cascade d'activation dépendante de l'interaction GPIb-FW</i>	64
6.5.2.1.	Signalisation déclenchée par une src kinase.....	65
6.5.2.2.	Rôle de γ Rfc et Fc γ RIIA.....	65
6.5.2.3.	Implication de la PLC γ 2.....	66
6.5.2.4.	Signaux calciques générés.....	66
6.5.2.5.	La PI3kinase.....	66
6.5.2.6.	Rôle de la PKG ?.....	67
6.5.2.7.	Oligomérisation du complexe GPIb-IV-IX et radeaux lipidiques.....	67
6.5.2.8.	Variation des réponses en fonction des conditions expérimentales.....	68
6.5.2.9.	Synthèse sur la signalisation du complexe GPIb-V-IX.....	69
6.5.3.	<i>Rôle des domaines intracellulaires du complexe GPIb-V-IX</i>	70
6.5.3.1.	Rôle du domaine intracellulaire de la GPIb α	71
6.5.3.2.	Rôle du domaine intracellulaire de la GPIb β	72
6.5.3.3.	Rôle des domaines intracellulaires de la GPIX et de la GPV.....	72
6.5.4.	<i>Les partenaires intracellulaires du complexe GPIb-V-IX</i>	73
6.5.4.1.	La Filamine A (FLNA).....	73
6.5.4.2.	La 14-3-3 ζ	75
6.5.4.3.	La calmoduline.....	76
6.5.4.4.	La PI3Kinase.....	78
6.5.4.5.	SHIP-2.....	78
6.5.4.6.	L' α -actinine.....	79
6.5.5.	<i>Les récepteurs associés au complexe GPIb-V-IX</i>	79
6.6.	Importance du complexe GPIb-V-IX dans l'hémostase et la thrombose	79
6.6.1.	<i>Maladie de Willebrand et Syndrome de Bernard-Soulier</i>	79
6.6.2.	<i>Rôle dans la thrombose</i>	80
6.6.3.	<i>Ciblage pharmacologique de la voie GPIbα/FW</i>	81
6.6.3.1.	Les antagonistes de la GPIb α	81
6.6.3.2.	Les antagonistes du FW.....	81
	RESULTATS EXPERIMENTAUX	83
	Cartographie fonctionnelle des domaines intracellulaires des sous-unités GPIbα et GPIbβ	85
	Utilisation de peptides perméants pour l'étude fonctionnelle du domaine intracytoplasmique de la sous-unité GPIb α du complexe GPIb-V-IX.....	85
	Rôle du domaine intracellulaire de la sous-unité GPIb β dans les fonctions d'adhésion et de signalisation du complexe GPIb-V-IX.....	101
	Identification de la cyclophiline A comme nouveau partenaire du complexe GPIb-V-IX.	132
	DISCUSSION GENERALE	174
	ANNEXES	185
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	210

FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Figure 1 :	Rôle du complexe GPIb-V-IX au cours de l'hémostase primaire	14
Figure 2 :	Activation des plaquettes après leur adhésion au FW immobilisé sur une surface	16
Figure 3:	Morphologie et ultrastructure des plaquettes	20
Figure 4:	Principales fonctions et voies d'activation plaquettaire.	21
Figure 5:	Signalisation déclenchée par la GPVI après liaison au collagène fibrillaire	27
Figure 6:	Régulation du taux de nucléotides cycliques dans la plaquette et effecteurs de la protéine kinase A et de la protéine kinase G	32
Figure 7:	Différents changements de formes subis par la plaquette au cours de son activation	35
Figure 8A:	Les anneaux de microtubules d'une plaquette « au repos »	36
Figure 8B:	Représentation schématique d'un filament de microtubule	36
Figure 9:	Image de microscopie électronique montrant la dépolymérisation du réseau d'actine intracellulaire par la cytochalasine B	38
Figure 10:	Représentation schématique du cytosquelette sous-membranaire de la plaquette	38
Figure 11:	Le remaniement du cytosquelette d'actine est contrôlé par une séquence d'évènements	39
Figure 12:	Signaux et partenaires identifiés dans la plaquette, menant à la formation de sites de nucléation et à l'élongation de filaments d'actine	42
Figure 13:	Organisation du cytosquelette d'actine dans les lamellipodes et les filopodes	44
Figure 14:	Mécanisme bidirectionnel de signalisation médié par l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	47
Figure 15:	Représentation schématique du complexe GPIb-V-IX	49
Figure 16:	Structure tridimensionnelle du site N-terminal de 45 kDa de la GPIb α seul ou lié au domaine A1 du FW	50
Figure 17:	Représentation schématique des domaines intracellulaires du complexe GPIb-V-IX et des protéines cytoplasmiques associées	51

Figure 18:	Différents modèles d'étude <i>in vitro</i> des fonctions du complexe GPIb-V-IX	56
Figure 19:	Mécanismes possibles de signalisation déclenchée par le complexe GPIb-V-IX	70
Figure 20:	Représentation de la structure de la filamine A et de son interaction avec la GPIb α	74
Figure 21:	Schéma de la structure cristallographique de la 14-3-3 ζ	76
Figure 22:	Séquences peptidiques des domaines intracellulaires du complexe GPIb-V-IX et sites de liaison aux partenaires intracellulaires	77

Tableaux

Tableau I:	Principaux récepteurs d'adhésion présents à la surface de la plaquette et leur(s) ligand(s) respectif(s)	22
Tableau II:	Principaux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) exprimés à la surface des plaquettes impliqués dans l'activation ou l'inhibition des fonctions plaquettaires.	24

ABRÉVIATIONS

ADP	Adénosine-5'-diphosphate
ADAMTS	A Disintegrin AND Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeat
AMPc	Adénosine-3',5'-monophosphate cyclique
BS	Bernard-Soulier
CIB	Calcium and Integrin Binding protein
CHO	Cellules d'ovaires de hamster
C-MPL	Récepteur thrombopoïétine
CRP	Collagen related peptide
CypA	Cyclophiline A
DAG	Diacylglycérol
Fg	Fibrinogène
FW	Facteur de Willebrand
FLNA	Filamine A
GDP	Guanosine-diphosphate
GEMs	Glycolipids Enriched Microdomains
GTP	Guanosine-triphosphate
GP	Glycoprotéine
GEF	Guanidyl Exchange Factor
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
Ig	Immunoglobuline
IP ₃	Inositol Triphosphate
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine based Inhibition Motif
KO	Knock out
LAT	Linker of activation of T cells
LR	Elément répété riche en Leucine
MT	microtubules
NO	Monoxyde azote
PAR	Protease Activated Receptor
PDE	Phosphodiesterase
PECAM1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PGE ₁	Prostaglandine E1
PGI ₂	Prostacycline
PH	Domaine d'homologie à la pleckstrine
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKA	Protéine kinase A

PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques
RTK	Récepteur à Tyrosine Kinase
SH(2 ou 3)	Domaine d'homologie à src (2 ou 3)
SHIP	SH2 domain-containing Inositol-5-Phosphatase
SCO	Système canaliculaire ouvert
SIPA	Shear Induced Platelet Agregation
TRAP	Thrombin receptor Activating Peptide
TxA2	Thromboxane A2
VASP	Vasodilatator-Stimulated Phosphoprotein
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
γ RFc	Chaîne gamma des récepteurs Fc

INTRODUCTION GENERALE

L'hémostase est un processus physiologique contribuant au maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins et, qui peut être divisé en trois étapes. L'hémostase primaire comprend la constriction du vaisseau lésé et la formation d'un clou plaquettaire obstruant la brèche vasculaire. La coagulation va ensuite renforcer l'agrégation plaquettaire en l'enveloppant d'un réseau insoluble de fibrine. Enfin, la fibrinolyse va permettre la résorption du thrombus et rétablir une circulation sanguine normale. Un dysfonctionnement d'une de ces étapes peut induire une pathologie hémorragique ou thrombotique (**Boneu and Cazenave 1997**).

L'hémostase primaire peut elle-même être divisée en trois grandes étapes. Dans un premier temps, les plaquettes circulantes adhèrent au niveau du sous-endothélium exposé. Une seconde phase correspond à l'activation des plaquettes sur cette surface thrombogène, entraînant un changement de forme et la sécrétion du contenu de leurs granules permettant l'activation de plaquettes environnantes. Enfin, l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ va permettre la formation d'un agrégat plaquettaire mettant fin au saignement (**Figure 1**).

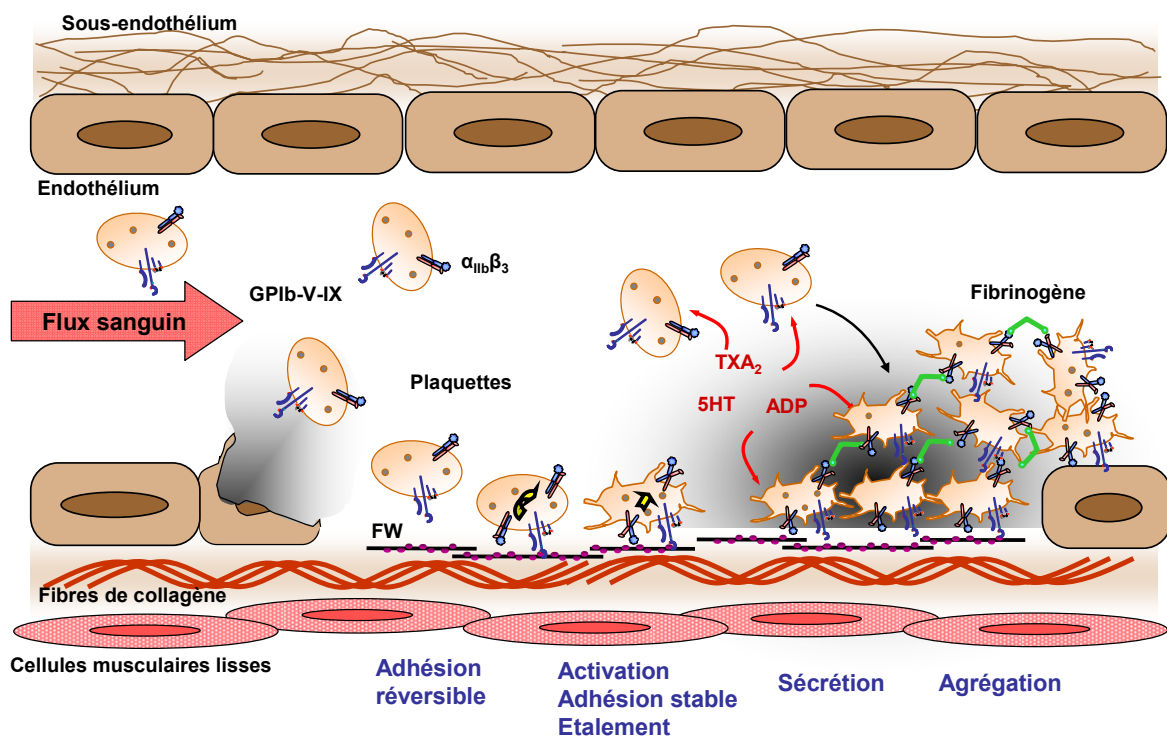


Figure 1 : Rôle du complexe GPIb-V-IX au cours de l'hémostase primaire

L'adhésion des plaquettes se fait en liant deux constituants majeurs de la matrice sous-endothéliale exposée : le Facteur Willebrand (FW) et le collagène. En présence de forces de cisaillement élevées rencontrées dans la microcirculation et les artères, c'est l'interaction entre le FW, lui-même lié au collagène, et le complexe plaquettaire GPIb-V-IX qui permet la capture et le ralentissement des plaquettes. Cette liaison entraîne une activation de faible intensité relayée par une activation plus importante déclenchée par le récepteur au collagène GPVI et les agonistes sécrétés comme l'ADP. Au final, les plaquettes changent de forme et l'engagement des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_2\beta_1$, qui interagissent respectivement avec le fibinogène (Fg) et le collagène permet l'adhésion stable des plaquettes, leur étalement et l'agrégation des plaquettes. L'ensemble de ces phénomènes est soutenu et amplifié par la production d'agonistes solubles, notamment l'ADP et le thromboxane A_2 (Tx A_2). Dans des conditions de flux sanguin plus faible, l'adhésion des plaquettes peut être assurée de manière efficace indépendamment du complexe GPIb-V-IX (**Savage et al. 1998; Tsuji et al. 1999**).

L'importance physiologique du complexe GPIb-V-IX est attestée par l'existence d'une pathologie hémorragique sévère, le syndrome de Bernard-Soulier, provoquée par l'absence ou l'anomalie d'une des sous-unités du complexe. Ce syndrome est caractérisé par un temps de saignement allongé lié au défaut d'adhésion des plaquettes et aussi par une thrombopénie et des plaquettes de grande taille (**Lopez et al. 1998**).

Alors que le rôle du complexe GPIb-V-IX dans l'adhésion des plaquettes est clairement établi (**Berndt et al. 2001**), son implication directe dans la signalisation a été mise en évidence plus récemment. La démonstration la plus claire provient d'études réalisées en conditions d'adhésion sur une surface recouverte de FW en présence d'inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et des boucles d'amplification par l'ADP et le TXA $_2$. Dans ces conditions, les plaquettes subissent un changement de forme caractéristique impliquant le cytosquelette, elles passent d'une forme discoïde à ronde avec émission de filopodes (**McCarty et al. 2006; Yap et al. 2000; Yuan et al. 1999**). Cette activation est encore mal caractérisée, mais il semble établi qu'elle mobilise une src kinase et la phospholipase C γ_2 . Cette dernière va permettre la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires, permettant le remodelage du cytosquelette d'actine responsable du changement de forme des plaquettes (**Mangin et al. 2003; Suzuki-Inoue et al. 2004; Wu et al. 2001b**). Cette signalisation GPIb-dépendante va aussi contribuer à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ nécessaire à l'adhésion stable au FW et à l'agrégation des plaquettes (**Kasirer-Friede et al. 2004**) (**Figure 2**).

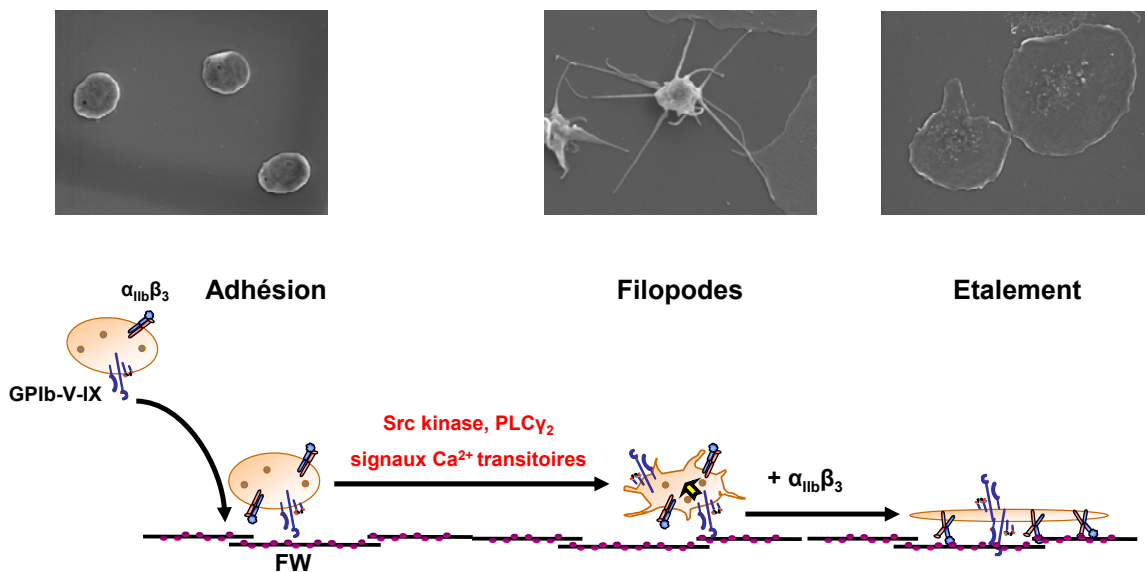


Figure 2 : Activation des plaquettes après leur adhésion au FW immobilisé sur une surface , signalisation spécifique du complexe GPIb-V-IX menant à l'émission de filopodes et à l'étalement après mobilisation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

On ignore encore la nature exacte des signaux proximaux générés par la liaison du FW au complexe GPIb-V-IX. Le complexe GPIb-V-IX n'est pas couplé aux protéines G hétérotrimériques, ne porte pas de motif de signalisation connu ni d'activité enzymatique. L'hypothèse la plus probable est que la signalisation passe par des protéines adaptatrices ou effectrices capables d'interagir avec le domaine intracellulaire du complexe GPIb-V-IX. Jusqu'à présent, trois partenaires directs ont été identifiés : *i*) La filamine A (FLNA) qui interagit avec le domaine intracellulaire de la GPIb α (Cranmer et al. 2005; Nakamura et al. 2006; Williamson et al. 2002). *ii*) La protéine adaptatrice 14-3-3 ζ qui se lie avec la partie intracellulaire de la GPIb α (Bodnar et al. 1999; Mangin et al. 2004) et de la GPIb β (Andrews et al. 1998; Calverley et al. 1998; Feng et al. 2000). *iii*) Plus récemment, la calmoduline a été identifiée comme un partenaire de la GPIb β et de la GPV (Andrews et al. 2001). Le rôle de ces trois partenaires pour la fonction directe de signalisation du complexe menant à l'émission de filopodes n'est pas clairement déterminé. La FLNA en liant

le cytosquelette d'actine permet l'ancrage du complexe GPIb-V-IX au réseau sous-membranaire d'actine. On estime que cette association est requise pour le maintien de la forme et de la taille des plaquettes au repos (**Lopez et al. 1998**). Les plaquettes de patients Bernard-Soulier (BS) sont de grande taille car l'interaction GPIb-FLNA et donc l'association au cytosquelette d'actine font défaut. L'association avec la FLNA semble également importante pour une adhésion efficace des plaquettes en présence de flux élevés (**Williamson et al. 2002**). La protéine 14-3-3 ζ est impliquée dans la régulation de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ par le complexe GPIb-V-IX (**Bialkowska et al. 2003; Gu et al. 1999; Mangin et al. 2004**). Le rôle de la calmoduline n'a pas été déterminé jusqu'à présent.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier la contribution des domaines intracellulaires des sous-unités GPIb α et GPIb β pour les fonctions d'adhésion et de signalisation du complexe GPIb-V-IX et d'en établir une cartographie fonctionnelle. Une première approche dans la plaquette a utilisé des peptides perméants comprenant des portions du domaine intracellulaire de la GPIb α permettant leur ciblage intracellulaire. L'effet de ces peptides sur la capacité des plaquettes à adhérer et à s'activer sur une matrice de FW a été évalué (**Article 1**). Une deuxième approche a consisté à utiliser un modèle cellulaire (CHO) transfecté par le complexe GPIb-IX. Ces cellules reproduisent la capacité des plaquettes à adhérer et à s'activer sur une surface recouverte de FW. Différentes lignées contenant des mutations des parties intracellulaires de la GPIb α et de la GPIb β ont été générées. Puis ces cellules ont été étudiées fonctionnellement (**Article 2**). Enfin, une recherche de nouveaux partenaires du complexe a été engagée, basée sur l'immunoprécipitation du complexe et une analyse des protéines associées par spectrométrie de masse. Un partenaire, la cyclophiline A (CypA), a été plus particulièrement étudié pour préciser son mode d'association ainsi que son rôle dans l'adhésion et l'activation des plaquettes (**Article 3**).

La partie Résultats est précédée d'une partie bibliographique portant sur : *i*) la plaquette et ses grandes fonctions ; *ii*) les récepteurs d'adhésion et d'activation des plaquettes et leurs voies de signalisation ; *iii*) la structure et les fonctions du complexe GPIb-V-IX, notamment sa fonction de signalisation.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les plaquettes sanguines

1.1. Origine des plaquettes, la mégacaryocytopoïèse

Les plaquettes sont des fragments cellulaires anucléés provenant d'énormes cellules, les mégacaryocytes qui sont formés dans la moelle osseuse par prolifération et différenciation de progéniteurs. Un processus d'endo-réplication, qui consiste en une duplication de l'ADN sans division cellulaire, permet au mégacaryocyte d'atteindre le stade mature. Dans le même temps, ces cellules subissent une maturation cytoplasmique (formation des granules et autres organelles plaquettaires, réorganisation des membranes internes). Les cellules matures vont migrer à l'entrée des sinusoides, et vont sous l'influence du flux sanguin, émettre de longs prolongements cytoplasmiques, les proplaquettes, qui seront libérées dans la lumière du vaisseau (**Italiano and Shivdasani 2003**). Les 2/3 de la masse plaquettaire circulent dans le sang à une concentration physiologique variant de 150 000 à 400 000 plaquettes/ μl et le 1/3 restant est séquestré dans la rate. La durée de vie normale des plaquettes humaines est de 8 à 10 jours (**Boneu and Cazenave 1997**).

1.2. Structure des plaquettes

Les plaquettes sont les plus petits éléments figurés du sang circulant. A l'état non activé, elles ont une forme discoïde avec un diamètre moyen de 2 μm et un volume de 7 à 12 μm^3 . L'analyse en microscopie électronique permet de distinguer 3 régions principales : la membrane plasmique, le cytosquelette et les organelles. L'ultrastructure de la plaquette au repos est représentée dans la **Figure 3**.

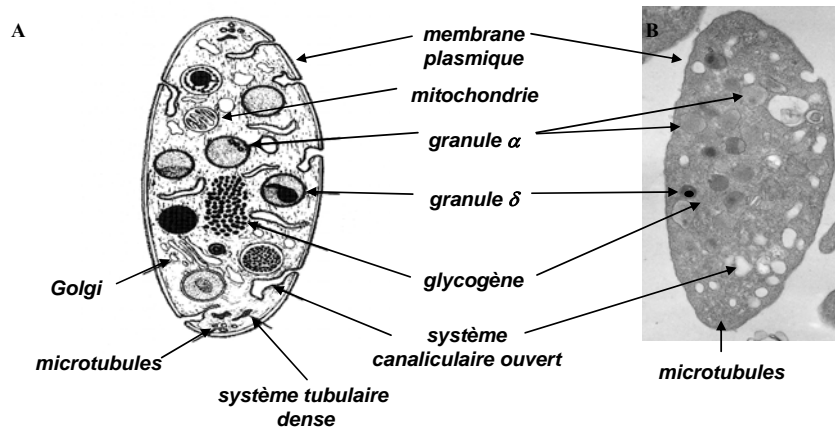


Figure 3: Morphologie et ultrastructure des plaquettes

A. Résumé des principales caractéristiques ultrastructurales observées sur une coupe longitudinale d'une plaquette discoïde. **B.** En regard une coupe de plaquette discoïde au repos examinée en microscopie électronique à transmission.

La membrane présente des invaginations ouvertes sur l'extérieur formant le système canaliculaire ouvert (SCO). Le SCO permet l'endocytose de substances plasmatiques et suite à l'activation plaquettaire favorise la libération du contenu des granules. Le SCO représente une source de membranes utilisable lors du changement de forme des plaquettes. Le système tubulaire dense est un réseau analogue au réticulum endoplasmique qui séquestre le calcium et les enzymes de la voie de synthèse des prostaglandines (**Boneu and Cazenave 1997**).

Le cytosquelette de la plaquette est principalement composé de microtubules (majoritairement la tubuline $\beta 1$), de polymères d'actine et de protéines qui leur sont associées. Les microtubules assurent la forme discoïde des plaquettes au repos. Lors de l'activation plaquettaire, le réseau d'actine est complètement remodelé ce qui permet le changement de forme des plaquettes, l'émission de filopodes et, lors de l'adhésion, l'étalement sur une surface (**Hartwig 2006**).

Les plaquettes renferment dans leur cytoplasme des mitochondries, des grains de glycogène et plusieurs types de granules (les granules denses, alpha et les lysosomes). Lors d'une activation forte, les granules sécrètent leur contenu par un mécanisme d'exocytose. Les granules alpha sont les plus abondants et contiennent de nombreuses protéines dont le facteur plaquettaire 4 (PF4), la β -thromboglobuline, la P-sélectine, des facteurs de coagulation (FV, FXI, FXIII), des protéines adhésives (Fg, FW) et des facteurs de croissance (PDGF, TGF- β , EGF...). Les granules denses contiennent les nucléotides, de l'ADP (~650 mM) et de l'ATP (~450 mM), du pyrophosphate (~300 mM), du calcium (~2 M) et de la sérotonine (~65 mM). Enfin les lysosomes contiennent des hydrolases acides ainsi que des protéases (**Boneu and Cazenave 1997**).

1.3. Fonctions des plaquettes

Dans un vaisseau sain, le sang circule au contact de l'endothélium non thrombogène. Lors d'une brèche, les plaquettes vont adhérer au sous endothélium exposé en liant des constituants de la matrice comme le collagène et le FW. Sur cette surface, les plaquettes vont s'activer : *i)* en passant d'une forme discoïde à ronde avec émission de filopodes suite au remaniement de leur cytosquelette; *ii)* en produisant du TXA₂ à partir de lipides membranaires; *iii)* en sécrétant le contenu de leurs granules, notamment de l'ADP, ce qui va permettre l'amplification de l'activation et le recrutement des plaquettes avoisinantes. L'ensemble de ces événements concourt à l'activation des intégrines plaquettaire, particulièrement l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, nécessaire à l'adhésion stable, l'étalement et l'agrégation des plaquettes permettant la formation d'un clou hémostatique. Par ailleurs, les plaquettes activées exposent une surface procoagulante aboutissant à la formation de thrombine, qui va aboutir à la production d'un réseau de fibrine consolidant le clou plaquettaire. L'ensemble des fonctions de la plaquette est schématisé dans la **Figure 4**.

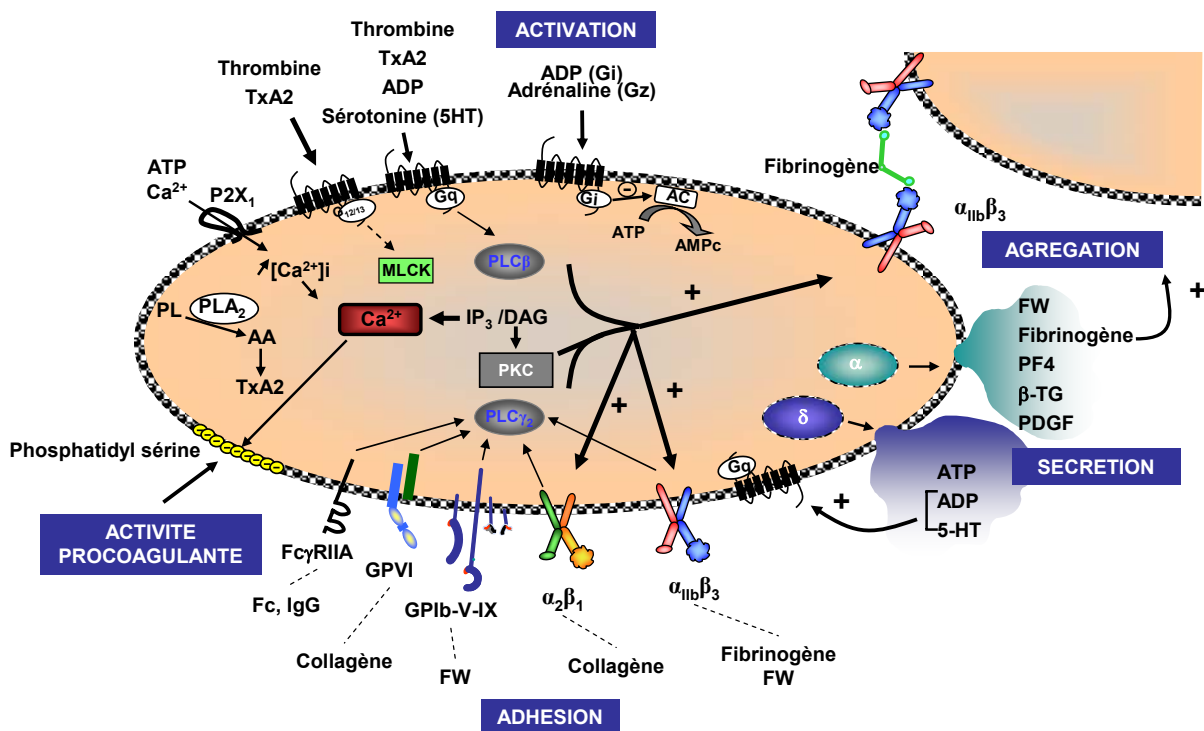


Figure 4: Principales fonctions et voies d'activation plaquettaire. AA: acide arachidonique; AC: adénylate cyclase; DAG: diacyl glycérol; G: protéine G hétérotrimérique; FW: facteur Willebrand; IP3: inositol 1,4,5-triphosphate; PDGF: Platelet-derived growth factor; PF4: facteur plaquettaire 4; PL: Phospholipides; PLA₂: phospholipase A2; MLCK: myosin light chain kinase; TxA₂: thromboxane A2; α : granules α ; β -TG: β -thromboglobuline; δ : granules denses; 5-HT: sérotonine;. (Adaptée d'après Boneu et Cazenave, 1997)

2. Les récepteurs d'adhésion

La plaquette possède des récepteurs pour de nombreuses protéines adhésives (**tableau I**). Les interactions impliquant la fibronectine, la thrombospondine, la vitronectine et la laminine ont été démontrées *in vitro* mais ne semblent pas jouer un rôle clef dans l'hémostase primaire. Cependant, des résultats récents semblent impliquer un rôle de la fibronectine dans la thrombose (**Matuskova et al. 2006**). Le FW et le collagène sont indispensables au recrutement des plaquettes au niveau de la brèche vasculaire. Dans les vaisseaux de petit calibre où l'on observe des forces de cisaillement élevées, l'attachement des plaquettes nécessite le FW déjà présent dans la matrice sous-endothéliale ou capturé à partir du plasma par le domaine A3 du collagène sous-endothélial. L'adhésion plaquettaire est assurée par le complexe GPIb-V-IX en liant le domaine A1 du FW. Cette interaction présente une constante de dissociation élevée ne permettant qu'un attachement transitoire des plaquettes. Une fois ralenties, les plaquettes vont pouvoir lier le FW via l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et s'associer au collagène grâce à la glycoprotéine GPVI et à l'intégrine $\alpha_2\beta_1$. Ces liaisons vont assurer l'adhésion stable ainsi que la pleine activation des plaquettes et permettre leur agrégation (**Moroi et al. 1996; Savage et al. 1998; Tsuji et al. 1999**).

Récepteur plaquettaire	Ligand
Complexe GPIb-V-IX	FW, Thrombine, P-Selectine, FXII, KH, Mac-1
Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogène, FW, Fibronectine, Vitronectine
Intégrine $\alpha_2\beta_1$	Collagène
Intégrine $\alpha_5\beta_1$	Fibronectine
Intégrine $\alpha\nu\beta_3$	Vitronectine, FW
Intégrine $\alpha_6\beta_1$	Laminine
PECAM-1	Collagène, PECAM-1, Glycosaminoglycanes
ICAM-2	LFA-1
Fc γ RIIA	IgG
P-Selectine	PSGL-1, GPIIb
GPVI	Collagène, Thrombospondine

Tableau I: Principaux récepteurs d'adhésion présents à la surface de la plaquette et leur(s) ligand(s) respectif(s). FXII: facteur XII de la coagulation, KH: kininogène de haut poids moléculaire; FW: Facteur de Willebrand, LFA-1: lymphocyte function-associated antigen-1; PSGL-1: P-Selectin Glycoprotein Ligand-1.

L'interaction plaquette-plaquette, ou agrégation plaquettaire, est permise essentiellement par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui va lier le Fg et le FW. L'étude de l'agrégation en suspension dans un agrégomètre a mis en évidence un rôle exclusif de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$. L'activation par un agoniste entraîne un changement de conformation de cette intégrine qui la rend apte à lier le Fg, qui par sa structure dimérique va former des ponts interplaquettaires entre deux $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Xiao et al. 2004). En présence de forces de cisaillement extrêmes dans un viscosimètre ou un système de perfusion ce processus est dépendant de l'interaction entre le FW et GPIb, qui initie les contacts plaquette-plaquette. Puis l'agrégation stable est assurée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Goto et al. 1998; Kulkarni et al. 2000; Ruggeri et al. 1999). A la surface des plaquettes d'autres récepteurs peuvent être trouvés comme le récepteur ICAM-2 qui lie l'intégrine $\alpha_2\beta_2$ à la surface des leucocytes ou DC-SIGN sur les cellules dendritiques. La plaquette activée va exposer la P-sélectine, qui a comme contre récepteur PSGL-1 exprimé à la surface des neutrophiles. Le rôle de ces protéines dans l'hémostase est encore mal défini.

3. Les récepteurs impliqués dans l'activation plaquettaire

L'adhésion au niveau de la lésion ou la mise en contact d'agonistes solubles va déclencher une signalisation intracytoplasmique véhiculée par différentes voies d'activation (Figure 4). Elles se distinguent tout d'abord par le type de récepteur et les premiers effecteurs moléculaires qui leur sont associés. In fine, ces différentes voies vont converger. Les voies de signalisation peuvent être subdivisées en réponse à quatre grands groupes de récepteurs : les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques, les récepteurs associés à une activité tyrosine kinase, les intégrines et les récepteurs canaux.

3.1. Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG)

Plusieurs récepteurs aux agonistes solubles font partie de la famille à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG) (tableau II). Certains RCPG possèdent une fonction inhibitrice (Chapitre 4). La voie de signalisation empruntée, et donc l'impact sur les fonctions plaquettaires, dépend de la protéine G qui est associée au récepteur. Cette protéine est composée de trois sous-unités : $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. La sous-unité $G\alpha$ lie le guanosine-diphosphate (GDP) ou le guanosine-triphosphate (GTP) et porte une activité GTPasique (Kristiansen 2004). Après fixation du ligand, le récepteur subit un changement de

conformation qui va permettre l'association de la sous-unité $G\alpha$ au GTP provoquant la libération de la protéine $G\alpha$ et du complexe $G\beta\gamma$ qui vont pouvoir activer ou inhiber des effecteurs intracellulaires, le type de signalisation engagé dépend essentiellement de la nature de la sous-unité $G\alpha$ (Cordeaux and Hill 2002; Hur and Kim 2002). Le cycle de signalisation se termine lorsque $G\alpha$ hydrolyse le GTP en GDP permettant la reformation de l'hétérotrimère (α,β,γ). Parmi les protéines G connues, les plaquettes expriment les sous-unités G_s , $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha_{12}}$, $G_{\alpha_{13}}$, G_{α_z} , $G_{\alpha_{i2}}$ et $G_{\alpha_{i3}}$.

Ligand	Récepteur	Couplage
<i>ACTIVATION</i>		
Thrombine	PAR1, PAR4	Gq, G ₁₂₋₁₃
ADP	P2Y1	Gq
	P2Y12	Gi
Sérotonine	5-HT _{2A}	Gq
Adrénaline	α_{2A}	Gz
TxA2	Tp α , TP β	Gq, G ₁₂₋₁₃
Vasopressine	V _{1A}	Gq
PGE ₂	EP ₃	Gi
<i>INHIBITION</i>		
Adénosine	A _{2A}	Gs
PGI ₂ /PGE ₁	IP	Gs
PGD ₂	DP	Gs

Tableau II: Principaux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) exprimés à la surface des plaquettes impliqués dans l'activation ou l'inhibition des fonctions plaquettaires.

Les récepteurs à l'ADP P2Y₁, à la sérotonine 5-HT_{2A}, au TXA₂ TP α et TP β , à la thrombine PAR1 et PAR4 sont couplés à la protéine $G_{\alpha q}$. On pourra noter que la thrombine active ses récepteurs (PAR : Protease Activated Receptor) selon un mode d'action particulier : elle hydrolyse la partie N-terminale du récepteur et libère un petit peptide activant le récepteur. La protéine $G_{\alpha q}$ active la Phospholipase C β (PLC β), qui en retour va cliver le phosphatidylinositol 4-5-bisphosphate (PI(4,5)P₂). L'inositol triphosphate (IP₃) et le

diacylglycerol (DAG) produits vont permettre la libération de calcium des stocks internes et l'activation de la protéine kinase C (PKC) **(Rebecchi and Pentylala 2000)**.

Le récepteur à l'ADP P2Y₁₂ est couplé à la protéine G α i. Cette dernière va inhiber l'activité de l'adénylate cyclase, empêchant ainsi une accumulation d'AMP cyclique, ce qui va potentialiser l'activation plaquettaire. Dans la plaquette, le récepteur P2Y₁₂ est responsable de l'amplification de l'activation et de l'agrégation des plaquettes déclenchées par l'ADP **(Hechler et al. 2005)**. Le récepteur α_{2A} est quant à lui couplé à la protéine G α z qui inhibe aussi l'adénylate cyclase.

Les récepteurs PAR à la thrombine sont également associés aux protéines de la famille G_{12/13}. Ces protéines régulent l'activité de la Rho guanine-exchange-factor (RhoGEF) déclenchant une cascade de signalisation qui inclut la petite GTPase RhoA et la Rho kinase. Celle-ci va inhiber la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLC phosphatase) **(Riobo and Manning 2005)** entraînant une augmentation de la quantité de chaîne légère de la myosine phosphorylée et un remaniement du cytosquelette de la plaquette (changement de forme) **(Daniel et al. 1984)**.

Enfin les récepteurs impliqués dans le contrôle négatif de l'activation plaquettaire comme le récepteur à la PGI₂ (IP), le récepteur à l'adénosine A_{2A} ou le récepteur au PGD₂ (DP) sont couplés à la protéine G α s. L'activation de G α s stimule l'adénylate cyclase, qui augmente le taux d'AMP cyclique menant à l'inhibition des fonctions plaquettaires par activation de la protéine kinase A (PKA).

Après activation du RCPG, le complexe $\beta\gamma$ peut aussi lier de nombreuses protéines et réguler leur activité. Parmi ces protéines, on peut trouver : des GPCR, des G-protein-coupled-receptor kinases (GRK), les adénylates cyclases, la PLC β , des GTPases, des canaux calciques voltage-dépendants, les Phosphoinositide 3-kinases (PI3kinases) et les Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) **(Morris and Malbon 1999; Schwindinger and Robishaw 2001)**. Dans le cas du récepteur P2Y₁₂, indépendamment de la diminution du taux d'AMPc par G α i, le complexe G $\beta\gamma$, qui après activation à l'ADP s'est dissocié de G α i₂, pourrait contrôler l'activité des PI3kinases γ ou β décrites en aval de P2Y₁₂ **(Hirsch et al. 2001; Jackson et al. 2005)**. Ces enzymes régulent respectivement la protéine kinase B/Akt (PKB/Akt) et la petite GTPase Rap1b **(Jackson et al. 2005; Kim et al. 2004; Lova et al. 2003; Woulfe et al. 2002)**, ces dernières ont été montrées comme pouvant être importantes pour l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ **(Bertoni et al. 2002; Kirk et al. 2000)**.

L'activité des RCPG est finement régulée. Un des mécanismes le plus fréquemment retrouvé est la désensibilisation. Un exemple dans la plaquette est le récepteur à l'ADP P2Y₁, après une première activation ce dernier ne peut plus être restimulé pendant un certain laps de temps, du fait d'une rapide désensibilisation-internalisation (**Baurand et al. 2000; Baurand et al. 2005**). L'activité des RCPG peut aussi être contrôlée par diverses protéines comme les Guanidyl Exchange Factor (GEF) qui vont favoriser la liaison de GTP ou les Regulators of G-protein Signalling (RGS) qui accélèrent l'hydrolyse du GTP associé à la sous-unité G α en GDP (**Berman and Gilman 1998**). Enfin, l'activation déclenchée par un RCPG peut être atténuée par le recaptage ou la dégradation de son ligand. Les cellules endothéliales du vaisseau présentent à leur surface et sécrètent un large panel d'enzymes, dont le CD39, capable d'hydrolyser ou inversement de rephosphoryler les nucléotides relargués par les globules rouges endommagés et les plaquettes activées (**Zimmermann 2000**).

3.2. Les récepteurs activant une cascade de tyrosine kinases (RTK).

Ces récepteurs RTK agissent principalement en activant une cascade de phosphorylation sur des tyrosines qui converge vers une phospholipase C de type γ . On peut en distinguer deux types: *i*) ceux portant l'activité tyrosine kinase comme Fc γ RIIA, le récepteur à la thrombopoïétine (C-MPL), Tie-1 et le récepteur à l'insuline ; *ii*) ceux associés à une/des tyrosines kinase(s) intracellulaire(s) ou qui déclenchent une cascade de phosphorylation sur tyrosine. Cette classe de récepteurs comprend la GPVI, le complexe GPIb-V-IX, Fc γ RIIA, CD47, CD226, JAM-1, ICAM-2.

La GPVI est probablement le RTK le plus étudié dans la plaquette. Il permet l'activation des plaquettes en réponse au collagène. Ce récepteur fait partie de la super famille des immunoglobulines (Ig) et comprend deux domaines Ig extracellulaires. Son domaine intracellulaire est associé à un dimère de chaîne gamma des récepteurs Fc (γ RFc) (**Clemetson and Clemetson 2001**). Chaque γ RFc contient un motif Immune Tyrosine-containing Activation Motif (ITAM) qui va participer à la signalisation déclenchée par la GPVI. La liaison du collagène à la GPVI va provoquer la multimérisation du récepteur et la phosphorylation de motifs ITAM intracellulaires par les src kinases Fyn et Lyn constitutivement associées au domaine intracellulaire riche en proline (**Bridson and Watson 1999; Ezumi et al. 1998; Quek et al. 2000; Suzuki-Inoue et al. 2002**). La phosphorylation des motifs ITAM permet l'autophosphorylation de la tyrosine kinase Syk (**Asselin et al.**

1997) qui va promouvoir la formation d'un complexe multi-protéique de signalisation comprenant : LAT (Linker for Activation of T-cells), SLP76 et Gad, toutes des protéines adaptatrices qui vont permettre l'association de différentes protéines (Btk et Vav) entraînant l'activation de la phospholipase $C\gamma_2$ (PLC γ_2) (Pasquet et al. 1999b; Pearce et al. 2004; Quek et al. 1998). La PLC γ_2 activée va produire de l'IP $_3$ et du DAG pour aboutir au changement de forme, à la sécrétion et à l'agrégation des plaquettes. L'utilisation de deux inhibiteurs de structures distinctes (wortmannin et LY294002) a permis de démontrer que la PI3kinase est également nécessaire pour une pleine activation au collagène (Pasquet et al. 1999a). Les produits de la PI3kinase comme le PI(3,4,5)P $_3$ permettront le recrutement à la membrane de protéines de signalisation qui portent un motif pleckstryn homologue (PH), comme par exemple la PLC γ_2 . La **Figure 5** reprend les principales étapes de la cascade de signalisation déclenchée par l'activation de la GPVI.

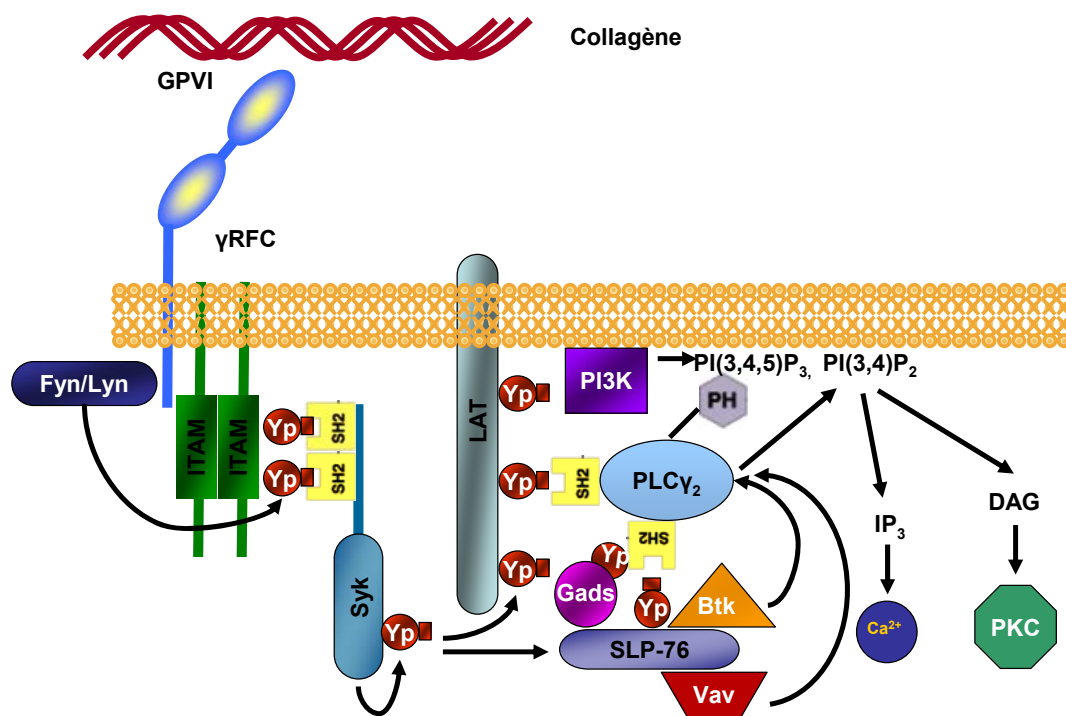


Figure 5: Signalisation déclenchée par la GPVI après liaison au collagène fibrillaire. SH2 : src homology domain; PH : pleckstrin homology domain; Yp : tyrosine phosphorylée; γRFC : chaîne gamma des récepteurs Fc; ITAM : Immune Tyrosine-containing Activation Motifs; LAT : linker of T-cell activation; SLP-76 : SH2 domain-containing leukocytes protein of 76kDa; PLC : phospholipase C; Btk : Bruton's tyrosine kinase; PI3K : phosphoinositide 3-kinase; PI : phosphoinositide; IP $_3$: inositol (1,4,5)-triphosphate; DAG : diacyl glycérol; PKC : protein kinase C (d'après Watson et al, 2005).

Le récepteur Fc γ RIIA est un autre RTK de 40 kDa appartenant à la famille des IgG. La liaison d'anticorps par leur partie Fc agrégés ou de complexes immuns, déclenche l'activation des plaquettes par un mécanisme comparable à celui de la GPVI, qui se traduit par un

changement de forme, une sécrétion des granules et l'agrégation plaquettaire (**Anderson et al. 1995**).

Le complexe GPIb-V-IX pourrait s'apparenter aux récepteurs à activité tyrosine kinase. La signalisation déclenchée par ce récepteur est encore mal caractérisée mais elle présente de nombreuses similitudes avec la voie d'activation contrôlée par la GPVI. La liaison du FW à la GPIb active une src kinase et aboutit à l'activation de PLC γ_2 , qui en produisant de l'IP $_3$ va permettre la libération de calcium des stocks intracellulaires. Le calcium libéré va permettre le remaniement du cytosquelette d'actine responsable du changement de forme des plaquettes. La signalisation contrôlée par le complexe GPIb-V-IX sera abordée plus en détail dans la section 6.5.

3.3. Signalisation « outside-in » des intégrines.

La majorité des voies d'activation plaquettaires convergent vers l'activation des intégrines, qualifiée de signalisation « inside-out » (**Shattil and Newman 2004**). En retour, les intégrines activées sont capables après interaction avec leur ligand de transmettre une signalisation intracellulaire qualifiée d'«outside-in». Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques ($\alpha\beta$). Dans la plaquette, on trouve les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_6\beta_1$. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, ou complexe GPIIb-IIIa, est la plus abondante (entre 50 000 et 80 000 copies) et lie le récepteur du Fg, le FW et la vitronectine. Elle est impliquée dans l'adhésion et l'étalement sur ces matrices et est nécessaire à l'agrégation des plaquettes, permettant la croissance et la stabilisation du thrombus. L'importance de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ est soulignée par l'existence d'une maladie hémorragique grave, la thrombasthénie de Glanzmann, qui est due à un défaut d'expression ou fonctionnel de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Nurden 2005**).

La signalisation « outside-in » possède des similitudes avec celle déclenchée par les récepteurs à tyrosine kinase. La liaison du Fg à l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ va entraîner la phosphorylation de nombreuses protéines (**Haimovich et al. 1993**), la libération de calcium intracellulaire (**Pelletier et al. 1992**), la réorganisation du cytosquelette d'actine menant à la formation de lamellipodes (**Haimovich et al. 1993; Savage and Ruggeri 1991**). La liaison du Fg par les intégrines va promouvoir leur regroupement ou « clustering », pour former des fibres de stress et des plaques d'adhérence focale regroupant des protéines de signalisation et des composants du cytosquelette (**Giancotti and Ruoslahti 1999; Hato et al. 1998; Romer et al. 2006**). L'ensemble de ces événements contribuent à renforcer les fonctions adhésives des plaquettes, amplifier leur activation et permettre leur agrégation.

3.3.1. Cascade de phosphorylation qui implique les src kinases.

La signalisation « outside-in » déclenche une cascade de phosphorylation sur tyrosines menant à l'activation de la PLC γ_2 , qui est très similaire à celle observée pour la GPVI (Watson et al. 2005). L'utilisation d'inhibiteurs et de souris déficientes a permis d'établir le rôle des src kinases en amont de PLC γ_2 (Oberfell et al. 2002). p60^{c-src} est constitutivement associée au domaine intracellulaire de la sous-unité β_3 via son domaine SH3 (src homology domain-3). Lors de l'activation et de la multimérisation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, cette enzyme est autophosphorylée, ce qui permet le recrutement et l'activation de Syk qui en retour régule positivement SLP-76, les GEF de la famille Vav et SLAP-130 (Gao et al. 1997; Oberfell et al. 2002; Oberfell et al. 2001).

3.3.2. Rôle de la PLC γ_2 pour la formation de lamellipodes.

Une des conséquences de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sur une surface recouverte de Fg ou de FW est la formation d'un lamellipode circulaire (Haimovich et al. 1996; Yuan et al. 1999). Deux travaux ont montré que la PLC γ_2 , sous le contrôle d'une src kinase, est nécessaire à la voie d'activation permettant la formation de lamellipodes sur une surface recouverte de Fg (Goncalves et al. 2003; Wonerow et al. 2003).

3.3.3. Rôle des PI3kinases

Enfin les PI3kinases et leurs produits jouent un rôle essentiel dans l'initiation et l'amplification de l'activation provenant de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Les PI3Kinases sont des lipides kinases qui catalysent la phosphorylation de phosphoinositides en position D3 pour générer notamment du PI(3,4)P₂ et du PI(3,4,5)P₃. Dans la plaquette, quatre sous types appartenant aux classes I et II ont été identifiées (classe IA : PI3Kinase α , β et δ ; classe IB : PI3Kinase γ ; une PI3Kinase de type II) (Selheim et al. 2000). Le PI(3,4)P₂ est le substrat de la PLC γ_2 et le PI(3,4,5)P₃ permet le recrutement et la concentration à la membrane de protéines de signalisation contenant des motifs PH, SH2 ou FYVE comme la PLC γ_2 , les GEF Vav ou les Tec kinases.

Des plaquettes stimulées à la thrombine ou avec un peptide activateur du récepteur PAR1 montrent une production progressive de PI(3,4)P₂. L'utilisation du peptide RGDS ou de plaquettes de patients ayant une thrombasténie de Glanzmann montre que l'activation de cette intégrine est requise pour la production de PI(3,4)P₂ (Sorisky et al. 1992; Sultan et al. 1991).

Ces enzymes interviennent également en réponse à l'ADP, et dans la signalisation déclenchée par la GPVI.

3.3.4. Contrôle par les protéines associées à l'intégrine α IIb β 3.

La signalisation « outside-in » peut être contrôlée par des protéines intracellulaires qui s'associent aux intégrines (**van der Flier and Sonnenberg 2001a**) qui peuvent être classées en trois groupes : 1) les protéines associées au cytosquelette d'actine comme l' α -actinine (**Lyman et al. 1997**), la taline (**Knezevic et al. 1996**) et la filamine (**Pfaff et al. 1998**), permettant l'ancrage des intégrines et la focalisation de protéines de signalisation, 2) les tyrosines kinases comme l'integrin-linked kinase (ILK) (**Hannigan et al. 1996**) ou la focal adhesion kinase (FAK) (**Schaller et al. 1995**), 3) les protéines CIB (Calcium and Integrin Binding protein) et β_3 -endonexine dont les fonctions sont encore mal définies (**Naik et al. 1997**). Une étude récente a montré que CIB pourrait réguler l'activité de la tyrosine kinase FAK permettant la formation d'adhérences focales et l'étalement des cellules sur une surface recouverte de Fg (**Naik and Naik 2003**).

3.3.5. Signalisation par les autres intégrines

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ lie plus efficacement le collagène fibrillaire à la suite d'une signalisation « inside-out » (**Jung and Moroi 2000**). Une notion plus récente est que ce récepteur pourrait également assurer une signalisation « outside-in » car des plaquettes auxquelles manque le 2^e récepteur au collagène, la GPVI, adhèrent et s'étaient sur une surface recouverte du motif GFOGER du collagène de type I qui lie $\alpha_2\beta_1$ (**Inoue et al. 2003**) à la suite de phosphorylations des protéines Syk, SLP76 et PLC γ_2 . Une activation « outside-in » des intégrines $\alpha_5\beta_1$ (le récepteur à la fibronectine) et $\alpha_6\beta_1$ (le récepteur à la laminine) a été également rapportée (**Chang et al. 2005; McCarty et al. 2004**).

3.4. Les récepteurs canaux

Un récepteur comme P2X $_1$ activé par l'ATP a la propriété d'assurer une entrée directe de Ca $^{2+}$ (**Hechler et al. 2005**). La stimulation de P2X $_1$ par un agoniste spécifique ($\alpha\beta$ MeATP) déclenche la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et stimule la MAPK ERK1/2 (**Toth-Zsomboki et al. 2003**), provoque un changement de forme transitoire des plaquettes (**Rolf et al. 2001**) et la centralisation des granules (**Toth-Zsomboki et al. 2003**). Ce récepteur

peut agir en synergie avec le récepteur P2Y₁ pour générer un signal calcique plus rapide et plus intense (Vial et al. 2002). Le récepteur P2X₁ a été décrit comme participant à l'activation au collagène ou à l'agrégation déclenchée par des forces de cisaillement élevées (Oury et al. 2004; Oury et al. 2001).

4. Régulations négatives

Ce chapitre abordera le rôle des voies dépendant de la prostacycline (PGI₂) et du monoxyde d'azote (NO), qui mènent à la production des nucléotides cycliques AMPc et GMPc. Le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (PGI₂) produits par les cellules endothéliales participent au maintien des plaquettes dans un état dit de « repos ». Un rôle du récepteur PECAM-1 (couplé aux tyrosines phosphatases SHP1 et SHP2) et des protéines de la famille Cbl sera également évoqué.

4.1.1. Les nucléotides cycliques.

L'élévation du taux intracellulaire de nucléotides cycliques, plus particulièrement l'augmentation du taux d'AMPc, est le plus puissant mécanisme d'inhibition des fonctions plaquettaires.

L'AMPc et le GMPc sont synthétisés respectivement par l'adénylate cyclase et la guanylate cyclase. L'adénylate cyclase est une glycoprotéine membranaire qui catalyse la production d'AMPc à partir d'ATP. Cette protéine est stimulée par la sous-unité G α_s de la protéine G hétérotrimérique couplée aux récepteurs EP des prostaglandines (PGE₁ et PGE₂), au récepteur IP de la PGI₂ et aux récepteurs de l'adénosine (Offermanns 2000). La guanylate cyclase existe dans la plaquette sous forme cytosolique. Elle est activée par le NO produit par les cellules endothéliales. Le taux de ces nucléotides cycliques peut être régulé négativement par les phosphodiésterases (PDE) qui vont hydrolyser la liaison 3'-phosphoester de l'AMPc ou du GMPc, les convertissant en métabolites inactifs. Il existe dans la plaquette 3 types de PDE : les PDE2, PDE3 et PDE5 qui diffèrent par leur affinité pour l'AMPc ou le GMPc et par leur mode de régulation (Haslam et al. 1999).

Les effecteurs moléculaires se trouvant en aval de l'AMPc et du GMPc sont principalement la PKA et la PKG, dont les fonctions sont de phosphoryler sur sérine ou thréonine un grand nombre de protéines et ainsi de réguler négativement diverses fonctions plaquettaires (Schwarz et al. 2001) (Figure 6).

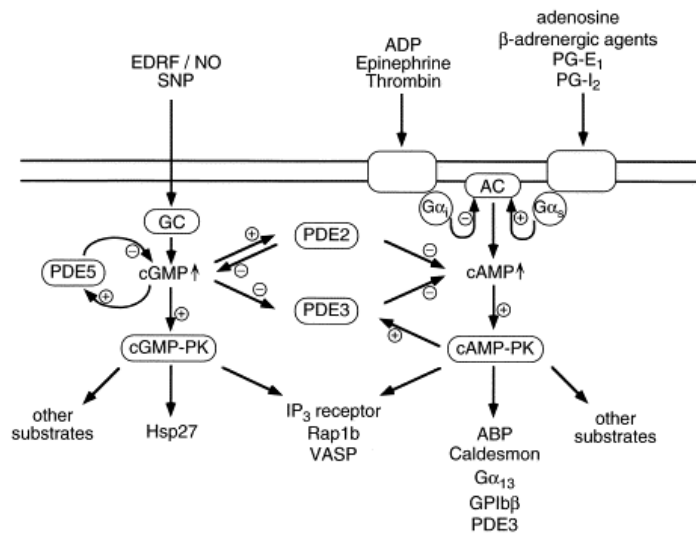


Figure 6: Régulation du taux de nucléotides cycliques dans la plaquette et effecteurs de la protéine kinase A et de la protéine kinase G. EDRF : endothelium relaxing factor; GC : guanylate cyclase; AC : adénylate cyclase; PDE : phosphodiesterase; cGMP-PK : protéine kinase G; cAMP-PK : protéine kinase A; IP₃ : inositol triphosphate (d'après Schwartz et al. 2001).

Un taux augmenté en nucléotides cycliques est capable d'inhiber l'élévation du taux de calcium intracellulaire à partir des stocks internes, d'une part en empêchant la resynthèse du substrat des PLC, le PI(3,4)P₂ (Ryningen et al. 1998) et d'autre part en permettant la phosphorylation des récepteurs à l'IP₃ inhibant la libération de calcium à partir du système tubulaire dense (Cavallini et al. 1996).

La protéine Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP) est l'un des principaux substrats de la PKA et de la PKG. En fonction de son état de phosphorylation et du système cellulaire étudié, cette protéine est décrite comme associée au cytosquelette d'actine où elle participe à son remodelage (Bachmann et al. 1999; Huttelmaier et al. 1999; Kwiatkowski et al. 2003; Mejillano et al. 2004; Walders-Harbeck et al. 2002). Les plaquettes de souris déficientes pour VASP sont décrites comme plus réactives en réponse à différents agonistes (Hauser et al. 1999). Ces travaux suggèrent que VASP phosphorylée pourrait contribuer à l'inhibition de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ par les nucléotides cycliques (Horstrup et al. 1994).

La FLNA et la caldesmon sont également des substrats de la PKA, leur phosphorylation empêche un remodelage du cytosquelette de la plaquette en stabilisant le réseau de filaments d'actine (Chen and Stracher 1989; Hettasch and Sellers 1991). Les nucléotides cycliques sont également capables de moduler l'activité de la myosine par phosphorylation de la MLCK

(Nishikawa et al. 1984). La voie des nucléotides cycliques est donc un moyen de contrôler l'activité contractile et le changement de forme des plaquettes.

La GPIIb β , une des sous-unités du complexe GPIb-V-IX, est également phosphorylée par la PKA sur la sérine en position 166 (Wardell et al. 1989). L'importance fonctionnelle de cette phosphorylation n'est pas clairement établie. Cette sérine phosphorylée semble impliquée dans une liaison avec la protéine adaptatrice 14-3-3 ζ (Calverley et al. 1998) et dans le contrôle des propriétés adhésives du complexe GPIb-V-IX mais avec des conclusions opposées selon les études (Bodnar et al. 2002; Perrault et al. 2003) (voir chapitre 6.4.6).

Les nucléotides cycliques agissent donc à de nombreux niveaux, en inhibant la libération ou la formation de seconds messagers, en affectant le cytosquelette de la plaquette empêchant son changement de forme et en modulant l'état d'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

4.1.2. PECAM-1 : un récepteur à motifs ITIM

PECAM-1 (ou CD31) est présent à la surface des monocytes, des granulocytes, des plaquettes et des cellules endothéliales. Cette glycoprotéine, de la famille des immunoglobulines, porte au niveau de son domaine intracellulaire deux immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIM) qui régulent négativement la signalisation provenant des récepteurs à des motifs ITAM (Newman and Newman 2003). PECAM-1 est activé à la suite d'interactions homophiliques, mais également après liaison d' $\alpha_v\beta_3$ et CD38 (Buckley et al. 1996; Horenstein et al. 1998). L'activation des plaquettes au collagène et à la thrombine ou le pontage de PECAM-1 provoque la phosphorylation des domaines ITIM, qui permet le recrutement des tyrosines phosphatases SHP-2 et SHP-1 (Cicmil et al. 2000; Edmead et al. 1999; Hua et al. 1998; Jackson et al. 1997). Les substrats de SHP-1 et SHP-2 ne sont pas clairement déterminés mais le pontage de PECAM-1 inhibe le profil global de phosphorylation sur tyrosines. On observe également une inhibition des signaux calciques, de la sécrétion, de l'agrégation et de la formation de thrombus pour des plaquettes activées au collagène. Inversement, des plaquettes de souris déficientes pour PECAM-1 montrent une agrégation et une sécrétion augmentées (Cicmil et al. 2002; Jones et al. 2001). Rathore et al ont montré une adhésion et une activation augmentées au FW dans ces mêmes souris (Rathore et al. 2003).

4.1.3. Les protéines de la famille Cbl

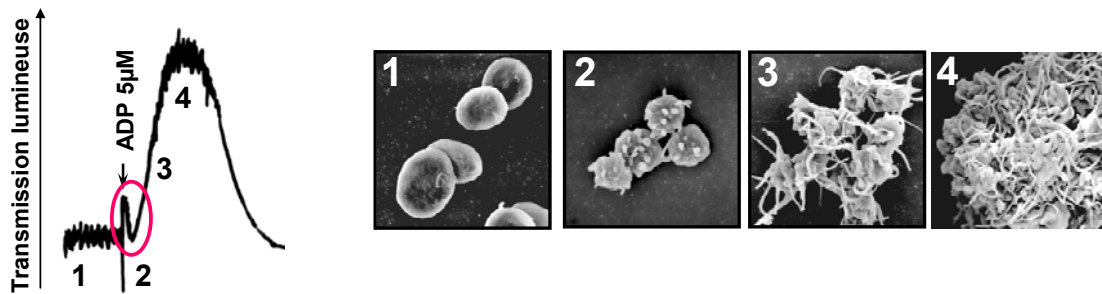
Un second système de contrôle négatif de la signalisation des récepteurs à tyrosine kinase est représenté par les protéines adaptatrices cytoplasmiques de la famille Cbl (**Thien and Langdon 2005**) qui est composé de c-Cbl, Cbl-b et Cbl-3. Ces protéines participent à l'ubiquitination des RTK, avec comme conséquences l'internalisation et la dégradation des RTK dans les lysosomes ou le protéasome. Dans la plaquette, c-Cbl est phosphorylée sur tyrosines après activation via la GPVI, Fc γ RIIA ou l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Auger et al. 2003; Saci et al. 1999; Saci et al. 2000**). Des plaquettes de souris KO pour c-Cbl montrent une activation GPVI-dépendante exacerbée avec une phosphorylation augmentée des principaux effecteurs de cette voie d'activation (Syk et PLC γ_2) et une agrégation accrue en réponse au CRP (**Auger et al. 2003**).

5. Conséquences de l'activation sur le changement de forme des plaquettes et l'activation des intégrines

5.1. Réorganisation du cytosquelette: « le changement de forme des plaquettes »

Dans un état non stimulé les plaquettes circulent dans le sang sous la forme de disques. Leur activation entraîne d'importants remaniements du cytosquelette leur permettant de changer de forme. Selon le mode de stimulation, les plaquettes subissent des modifications morphologiques différentes. Des plaquettes en suspension stimulées par un agoniste vont contracter leur corps cellulaire et émettre de longs prolongements cytoplasmiques appelés filopodes (**Figure 7A**). Des plaquettes mises à adhérer sur une surface comme le FW ou le Fg vont subir un changement de forme quelque peu différent. Après leur adhésion, elles vont également prendre une forme ronde et émettre des filopodes, puis les plaquettes vont étendre un large feuillet membranaire circulaire appelé lamellipode et s'étaler sur la surface (**Figure 7B**).

A. Plaquettes stimulées en suspension



B. Plaquettes activées sur une surface

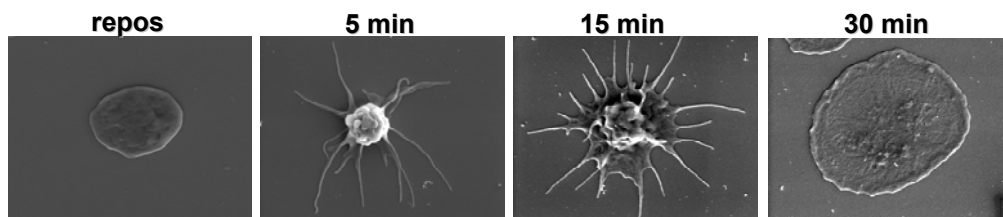


Figure 7: Différents changements de formes subis par la plaquette au cours de son activation.

Des plaquettes en suspension stimulées à l'ADP en présence de fibrinogène vont contracter leur corps cellulaire et émettre de longs prolongements cytoplasmiques appelés filopodes (A). Des plaquettes mises à adhérer sur une surface recouverte de FW vont subir un changement de forme différent. Après leur adhésion, elles vont également prendre une forme ronde et émettre des filopodes, puis les plaquettes vont étendre un large feuillet membranaire circulaire appelé lamellipode et s'étaler sur la surface (B).

L'objet de ce chapitre est de décrire les différentes protéines qui structurent et organisent la forme des plaquettes, puis de présenter les effecteurs moléculaires impliqués dans la production de ces extensions membranaires, pour enfin aborder leur rôle potentiel dans les fonctions plaquettaires.

5.1.1. Le cytosquelette des plaquettes au repos

Le maintien de la forme des plaquettes est sous le contrôle du réseau de microtubules et des filaments d'actine.

5.1.1.1. Le réseau de microtubules

Par rapport au cytosquelette d'actine, le rôle des microtubules (MT) pour les fonctions des plaquettes est beaucoup moins connu. Il est établi que la forme discoïde dépend de ce réseau circulaire de MT sous-membranaire formant de 8 à 12 tours sur lui-même (Figure 8A). Un filament de MT est formé par l'assemblage de sous-unités de tubuline α et β (principalement l'isoforme β_1) en protofilaments qui eux-mêmes s'associent en filament (Figure 8B). Ce filament est orienté, il dispose d'une extrémité positive de polymérisation et

une extrémité négative de dépolymérisation. Dans la plaquette, la tubuline se trouve à une concentration de 70 μM et plus de 60% de cette tubuline est sous forme polymérisée. Le rôle de ces filaments a pu être déterminé en étudiant les plaquettes de souris invalidées pour le gène de la tubuline β_1 ou d'individus présentant le polymorphisme Q^{43} en P sur la tubuline β_1 . Les plaquettes de ces souris ou de ces patients ont au repos une forme sphérique (**Freson et al. 2005; Italiano et al. 2003**).

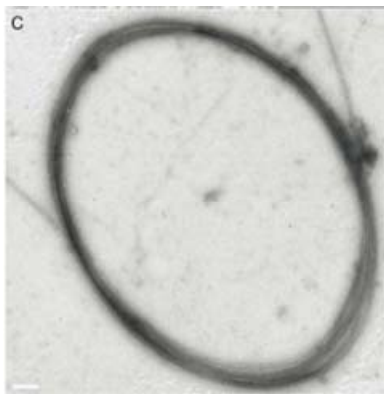


Figure 8A: Les anneaux de microtubules d'une plaquette « au repos ». Des plaquettes non stimulées sont fixées en suspension. Elles sont perméabilisées et les microtubules sont observés par ombrage de surface en microscopie électronique à transmission (d'après Hartwig et al.2006).

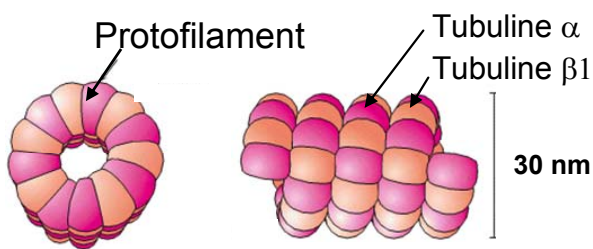


Figure 8B: Représentation schématique d'un filament de microtubule. Un filament de microtubule est formé par l'assemblage de sous unités de tubuline α et β_1 en protofilaments qui eux-mêmes s'associent en filament.

Les microtubules peuvent s'associer à des protéines qui vont les stabiliser comme MAP2 (**Tablin et al. 1988**) ou à des protéines « moteurs » comme la dynéine et la kinésine. Ces protéines se déplacent le long des filaments de MT par un mécanisme ATP-dépendant. La dynéine se déplace vers les extrémités négatives et fait glisser un second MT dans la direction opposée. Dans le mégacaryocyte, la dynéine est utilisée pour allonger les extensions

cytoplasmiques appelées proplaquettes et contribue à la formation des futures plaquettes (**Patel et al. 2005**). La kinésine se déplace vers les extrémités positives des MT et dans le mégacaryocyte elle est utilisée pour transporter les organelles et les granules plaquettaires aux extrémités des proplaquettes (**Richardson et al. 2005**). Les rôles de la dynéine et de la kinésine pour les fonctions plaquettaires ne sont pas établis.

5.1.1.2. Les réseaux de filaments d'actine

Au-delà du rôle des microtubules pour la forme discoïde des plaquettes, c'est l'organisation du cytosquelette d'actine qui va déterminer les contours de la cellule. Les filaments d'actine sont les produits de la polymérisation d'actine monomérique (ou actine G) en protofilaments, qui eux-mêmes s'associent deux à deux pour former un filament appelé actine F. L'actine F possède une extrémité présentant une activité nette de polymérisation (l'extrémité barbée) et à son autre extrémité une activité nette de dépolymérisation (l'extrémité pointue). L'actine est présente dans la plaquette à une concentration de 550 μM et dans la plaquette au repos plus 60% de cette protéine est sous forme d'actine G.

On distingue deux types de cytosquelettes d'actine : le réseau d'actine intracellulaire et le cytosquelette sous membranaire (**Figure 9**). Le réseau d'actine intracellulaire est constitué de longs filaments qui traversent de part en part la cellule. Différentes protéines sont associées à ces structures comme l' α -Actinine, la tropomyosine ou la caldesmone. Ces dernières vont contrôler l'association des filaments d'actine entre eux ou de l'actine F à d'autres protéines (**Fox 2001**). Le réseau d'actine sous membranaire est une structure dense correspondant à un maillage de filaments d'actine courts qui tapissent la face interne de la membrane plasmique et du système canaliculaire ouvert. Sont associées à ce maillage d'actine F des protéines organisant l'embranchement de l'actine F (la spectrine, la Dystrophin-related protein, la skelemine ou la filamine), des protéines qui coiffent les extrémités des filaments (adducine, CapZ) et des protéines qui ancrent des récepteurs comme les intégrines ou le complexe GPIb-V-IX au cytosquelette sous membranaire (filamine, taline, moesine) (**Fox 2001**). La **Figure 10** donne une représentation schématique de la composition et de l'organisation du cytosquelette d'actine sous membranaire.

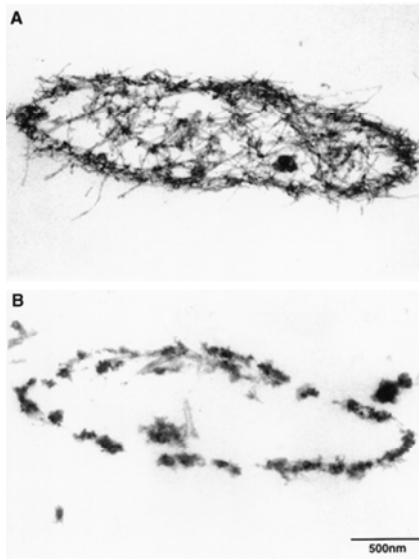


Figure 9: Image de microscopie électronique montrant la dépolymérisation du réseau d'actine intracellulaire par la cytochalasine B. Des plaquettes « au repos » ont été incubées en absence (A) ou présence (B) de cytochalasine B. Les cellules sont ensuite fixées et lysées, la fraction détergent insoluble est préparée pour une observation en microscopie électronique à transmission. Dans le panneau A, le réseau d'actine intracellulaire est préservé, dans l'image B il a été dépolymérisé sous l'action de la cytochalasine B et seul le cytosquelette sous membranaire est intact (d'après Fox et al. 1996).

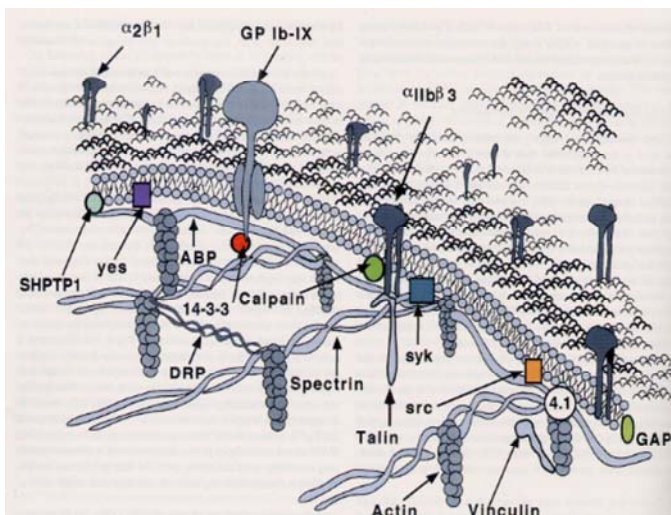


Figure 10: Représentation schématique du cytosquelette sous-membranaire de la plaquette. DRP : Dystrophin-related protein (Extrait de Fox. 2001).

5.1.2. Le cytosquelette des plaquettes activées

5.1.2.1. Le réseau de microtubules

Suite à l'activation des plaquettes, le réseau de MT est complètement remanié. Les plaquettes prennent une forme sphérique et présentent dans leur cytoplasme soit de courts filaments de MT rayonnants du centre de la cellule, soit l'anneau se retrouve contracté au centre de la plaquette. Ce remaniement du réseau de MT ne semble pas essentiel pour les fonctions plaquettaires. Des plaquettes traitées avec des agents stabilisant (le taxol) ou dépolymérisant (la vinblastine) des MT ont un changement de forme et une activité sécrétrice normale (Hartwig 2006). Les plaquettes de souris KO pour la tubuline $\beta 1$ ont une agrégation normale en réponse à l'ADP ou la thrombine et montrent une thrombose comparable à celle de souris sauvages dans un modèle de thrombose *in vivo* au chlorure de fer (Italiano et al. 2003).

5.1.2.2. Le cytosquelette d'actine

C'est un complet réarrangement du cytosquelette d'actine qui est à l'origine du changement de forme des plaquettes activées. Ce mécanisme complexe se déroule en trois étapes. 1) Le cytosquelette sous membranaire doit être désassemblé. 2) Des sites de nucléation et de polymérisation sont formés. 3) Les filaments d'actine formés sont assemblés et organisés pour donner naissance soit aux filopodes soit aux lamellipodes (Figure 11).

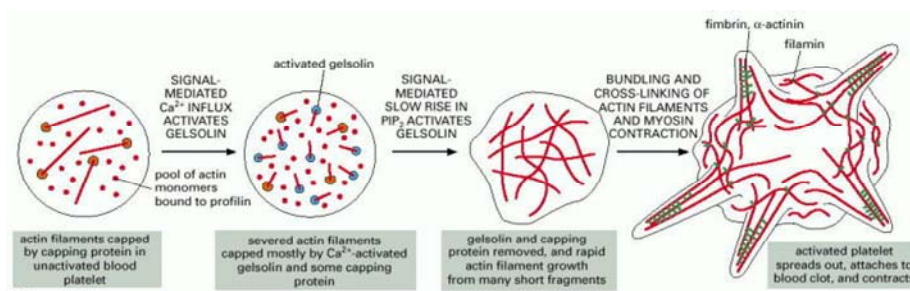


Figure 11: Le remaniement du cytosquelette d'actine est contrôlé par une séquence d'événements : le coiffage et le clivage de l'actine F, l'élongation des filaments à partir des extrémités libres et l'assemblage des filaments en faisceaux ou en un réseau de fibres orthogonales (D'après Molecular Biology of the Cell, fourth edition).

5.1.2.3. Désassemblage du cytosquelette d'actine

La désorganisation des filaments d'actine F préexistants dans la plaquette au repos est une étape nécessaire, car elle va mettre à disposition un grand nombre d'extrémités libres (« barbed ends ») disponibles pour le réarrangement et l'élongation. L'augmentation du calcium intracytoplasmique (de 0,1 jusqu'à 2 μM) via les des stocks internes ou par influx est un signal essentiel pour cette désorganisation (**Ohlmann et al. 2004**). Le calcium libéré provoque un changement de conformation de la gelsoline (90 kDa) nécessaire à son activité de coiffage et de clivage des filaments d'actine (**McGough et al. 2003**). La gelsoline reste associée aux fragments d'actine F générés et sera déplacée par des polyphosphoinositides produits lors de l'activation plaquettaire. Des plaquettes de souris déficientes pour le gène de la gelsoline montrent une polymérisation d'actine inhibée d'environ 80% en réponse à divers agonistes (**Hartwig 2006**). La cofiline (15 kDa) est régulée par déphosphorylation, par les phosphoinositides et le pH (**Paavilainen et al. 2004**). Après son activation, la cofiline se lie à l'actine F et applique une contrainte qui va favoriser la libération de monomères d'actine et la cassure du filament.

5.1.2.4. Formation des sites de nucléation et élongation des filaments d'actine.

Les extrémités libres générées par la gelsoline vont servir d'amorce pour la polymérisation de nouveaux filaments. Les Rho GTPases comme Rac ou Cdc42 en combinaison avec le PI(4,5)P₂ vont activer les protéines de la famille Wiskott-Aldrich Syndrome protein (N-WASP, WASp et Scar/WAVE 1-3) qui elles mêmes régulent l'activité du complexe de nucléation Arp2/3. Le complexe Arp2/3 va s'associer aux extrémités libres des filaments d'actine, pour amplifier la polymérisation de l'actine en filaments (**Hartwig 2006**). Cette cascade d'activation a longtemps été proposée comme la voie principale permettant la formation d'actine F. Récemment, les contributions du complexe Arp2/3 et des protéines de la famille WASp ont été réévalués et d'autres mécanismes indépendants d'Arp2/3 ont été proposés (**Schirenbeck et al. 2006; Schirenbeck et al. 2005**).

Les RhoGTPases Cdc42 et Rac ont été décrites dans d'autres systèmes cellulaires comme étant requises pour, respectivement, la formation de filopodes et de lamellipodes (**Kozma et al. 1995; Nobes and Hall 1995; Ridley et al. 1992**). Ces GTPases se comportent comme des interrupteurs moléculaires, en passant de la forme active associée au GTP à une forme inactive lié au GDP. Leur activité est régulée par différents types de protéines comme

les GEF (comme les protéines de la famille Vav), les GTPase activating-protein (GAP) et les GDI (GDP dissociation inhibitor) favorisant ou inhibant le passage à la forme active. Une fois activées, ces GTPases sont capables de cibler plus d'une cinquantaine d'effecteurs. L'activation de Rac induit la polymérisation d'actine pour former des lamellipodes et des protrusions membranaires, tandis que Cdc42 permet la production de filopodes.

Dans la plaquette, Rac et Cdc42 sont activées en réponse à différents agonistes : le peptide TRAP activateur de PAR1 (**Azim et al. 2000**), la convulxine un agoniste de la GPVI (**Vidal et al. 2002**) et l'ADP (**Soulet et al. 2005**). Les plaquettes de souris déficientes pour Rac sont incapables de former des lamellipodes sur diverses matrices (**McCarty et al. 2005**). Il n'existe pas de données établissant le rôle d'un type de GTPase pour la production de filopodes ou de lamellipodes dans la plaquette. A signaler, la contribution possible d'autres GTPases comme RalA qui pourrait être impliquée dans la formation de filopodes (**Ohta et al. 1999**) ou de lamellipodes (**Takaya et al. 2004**).

Les principaux effecteurs des Rho GTPases pour le remodelage du cytosquelette sont les protéines WASp dont l'absence est responsable du syndrome de Wiskott-Aldrich caractérisé par une thrombocytopénie et des plaquettes de petites tailles. Ces protéines en combinaison avec le PI(4,5)P₂ sont recrutées par les Rho GTPases pour activer le complexe de nucléation Arp2/3 (**Stradal et al. 2004**). La contribution de WASp dans le changement de forme des plaquettes n'est pas clairement établie. En effet, les plaquettes de patients Wiskott-Aldrich ou de souris invalidées pour WASp sont capables d'émettre des filopodes et de produire des lamellipodes (**Falet et al. 2002a; Gross et al. 1999**).

Le complexe Arp2/3 s'associe aux extrémités libres des filaments d'actine où il forme un complexe de nucléation avec ces 7 sous-unités pour permettre l'élongation d'un second filament (**Falet et al. 2002b**). Différents arguments placent Arp2/3 au centre du processus de polymérisation d'actine. Arp2/3 est capable de catalyser *in vitro* la polymérisation d'actine G en un réseau de fibres avec des branchements à 70° (**Amann and Pollard 2001**). Il est utilisé par différents pathogènes intracellulaires (*Listeria monocytogenes*, *Shigella* ou le virus de la vaccine) pour leur incorporation et leur déplacement au sein de la cellule, des mécanismes dépendants de la polymérisation d'actine (**Frischknecht and Way 2001**). Par lui-même ce complexe n'a qu'une faible capacité à induire la polymérisation d'actine (**Falet et al. 2002b**), qui nécessite la fragmentation des filaments d'actine par la gelsoline. Ni la protéine WASp ni le complexe Arp2/3 n'ont pu être visualisés dans les filopodes de fibroblastes murins (**Snapper et al. 2001**). Une déplétion par siRNA d'Arp2/3 a montré que des fibroblastes

étaient cependant capables de produire des lamellipodes en réponse à des facteurs de croissance (Di Nardo et al. 2005).

Il est possible que d'autres effecteurs des petites GTPases interviennent comme les formines, qui associées à VASP seraient responsables de la production de filopodes (Schirenbeck et al. 2006; Schirenbeck et al. 2005). La Figure 12 reprend les voies de signalisation impliquées dans la formation de complexe de nucléation et dans l'élongation de filaments d'actine.

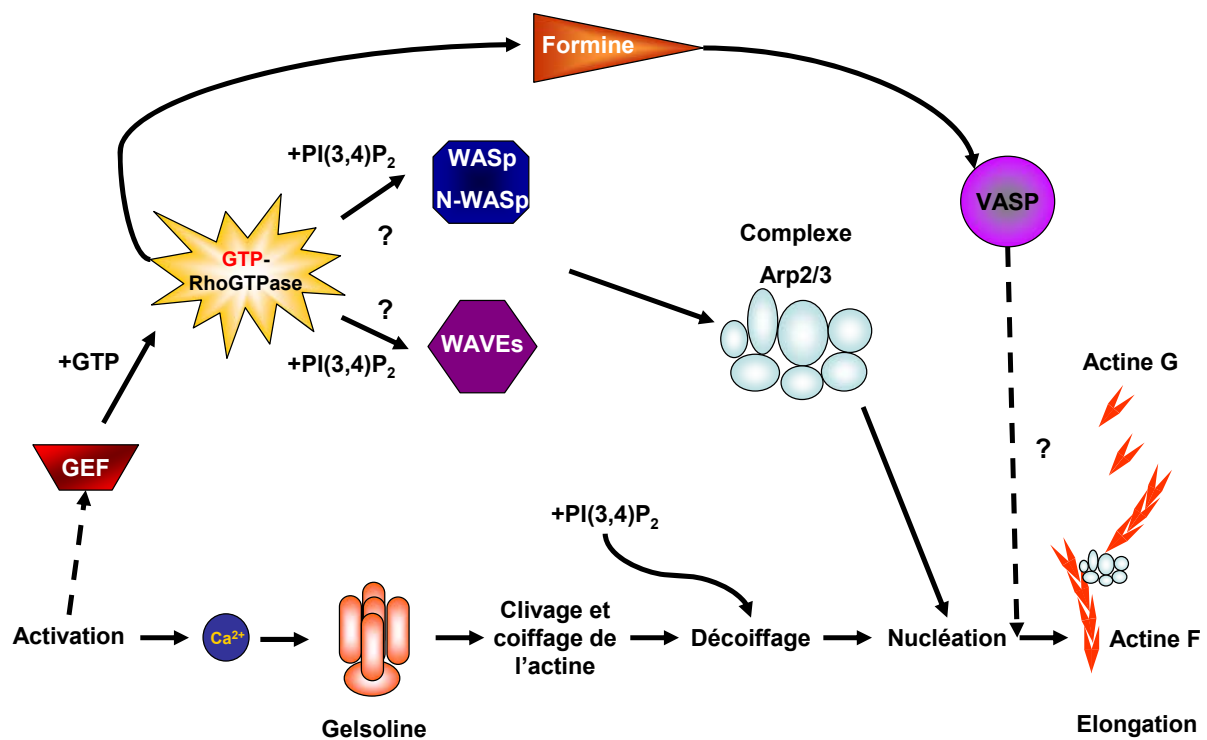


Figure 12: Signaux et partenaires identifiés dans la plaquette, menant à la formation de sites de nucléation et à l'élongation de filaments d'actine. GEF: Guanidyl Exchange Factor; GTP: guanosine-triphosphate; WASp: Wiskott-Aldrich syndrome protein; VASP: Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein; $PI(3,4)P_2$: phosphoinositide (4,5)-biphosphate.

5.1.2.5. Organisation des filaments d'actine : formation de filopodes et de lamellipodes.

Les filopodes sont des extensions membranaires composées par des filaments d'actine organisés en faisceaux (**Figure 13 d,e**). La plaquette produit des filopodes en réponse à de nombreux agonistes, tout particulièrement lors de la phase précoce de son activation. Les mécanismes impliqués dans la formation des filopodes dans la plaquette sont très peu connus. Des études de cellules de mélanome ou des fibroblastes murins, ont suggéré que les filopodes se forment à partir de lamellipodes préexistants. Sous l'action des protéines de la famille Ena/VASP, les protéines de coiffe (comme CapZ) se dissocient des extrémités barbées des filaments d'actine et permettent l'assemblage en faisceaux de l'actine F (**Mejillano et al. 2004**). Les protéines qui composent et structurent le filopode dans la plaquette ne sont pas connues mais l' α -actinine, la fascine et la fimbrine sont communément décrites dans de telles structures dans d'autres types cellulaires (**Small et al. 2002**).

Le lamellipode est une extension membranaire relativement plate présentant un réseau de filaments courts d'actine branchés entre eux à 70-90°, formés sous l'action du complexe Arp2/3 (**Figure 13abc**). Ces larges feuillets membranaires d'actine qui peuvent s'étendre sur plusieurs μm^2 sont utilisés par les cellules pour s'étaler et se mouvoir. Les plaquettes ne disposent pas d'activité motrice, mais une fois activées, elles s'étalent en formant un grand lamellipode circulaire. Ici encore, la composition en protéines des lamellipodes est mal connue dans la plaquette. Arp2/3 a été localisé dans ces structures (**Falet et al. 2002b**) ainsi que la FLNA qui organise l'actine F en filaments orthogonaux (**Dyson et al. 2003**) et des protéines de coiffe, comme CapZ, qui s'associent aux extrémités barbées de l'actine F empêchant ainsi toute polymérisation d'actine supplémentaire (**Barkalow et al. 1996**).



Figure 13: Organisation du cytosquelette d'actine dans les lamellipodes et les filopodes. a) aux extrémités du lamellipode; b) au sein du maillage d'actine; c) aux sites de désassemblage de l'actine; d) au sommet des filopodes; e) au cœur du faisceau de filaments d'actine. (Small et al. 2002)

5.1.2.6. Rôle du changement de forme pour les fonctions plaquettaires.

Il n'existe pas vraiment de bon modèle qui permettrait d'étudier uniquement l'impact du changement de forme pour les fonctions plaquettaire. On ne peut donc formuler que quelques hypothèses quant à son rôle: *i)* l'émission de filopodes pourrait intervenir dans le ralentissement des plaquettes au niveau de la lésion; *ii)* les filopodes ou les lamellipodes pourraient aussi renforcer les contacts entre plaquettes ou avec la surface thrombogène, participant ainsi à la formation et la stabilisation des agrégats plaquettaires ; *iii)* par analogie avec la synapse immunologique qui se forme dans les lymphocytes T (**Grakoui et al. 1999**), le changement de forme pourrait assurer une présentation optimale des récepteurs d'adhésion et d'activation plaquettaires tels que les intégrines ; *iv)* enfin, l'étalement des plaquettes sur la surface activatrice, permettrait d'augmenter la surface recouverte par la plaquette, optimisant ainsi le processus d'occlusion de la lésion.

5.2. Activation « inside out » des intégrines plaquettaires

Une conséquence majeure de l'activation des plaquettes est l'engagement de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui est nécessaire à l'agrégation des plaquettes et participe à l'amplification de la réponse plaquettaire et au renforcement de leurs propriétés adhésives. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est dans un état constitutivement inactif à la surface de la plaquette au repos et présente une faible affinité pour le Fg. L'activation « inside-out » entraîne des changements conformationnels qui vont conférer à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ un état de haute affinité pour le Fg (**Liddington and Ginsberg 2002**) (**Figure 8A**). Par contre, la liaison de petits peptides comme le tripeptide RGD ou l'interaction avec du fibrinogène immobilisé sur une surface ne nécessite pas d'activation « inside-out » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Les mécanismes menant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sont encore incomplètement élucidés. Les seconds messagers générés par les différentes voies d'activation plaquettaires (calcium, produits des phospholipases, cascades de phosphorylation sur tyrosine) vont activer divers effecteurs moléculaires qui vont contribuer à l'activation des intégrines. Les protéines kinases PKB et PKC, les PI3kinases, et Rap1b sont décrites comme étant importantes pour l'activation de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Bertoni et al. 2002; Kirk et al. 2000; Yap et al. 2002**), cependant leur mode d'action n'est pas encore déterminé.

Au cours de son activation l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ va subir toute une série de changements de conformation qui vont aussi bien affecter sa partie cytoplasmique, transmembranaire qu'extracellulaire.

Les domaines intracellulaires jouent un rôle important dans le maintien du récepteur dans un état de faible affinité pour son ligand. En effet, la délétion du domaine intracellulaire de la sous-unité β_3 , ou la mutation des résidus R⁹⁹⁵ sur la α_{IIb} et D⁷²³ de β_3 (deux acides aminés impliqués dans un pont salin) conduisent à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

La mutagenèse a également révélé que les domaines transmembranaires participent au processus d'activation. La mutation de résidus de la β_3 (693,701 et 708) ou de l' α_{IIb} (972, 976, 980 et 981) a pour effet de rompre l'association entre les deux sous-unités et provoque une fixation spontanée du Fg (Li et al. 2004a; Li et al. 2003a; Li et al. 2005; Luo et al. 2005). De plus, la séparation des domaines transmembranaires va favoriser le processus de multimérisation (Li et al. 2001; Li et al. 2005).

C'est au niveau extracellulaire que surviennent les principaux changements de conformation conduisant au passage à un état de haute affinité. Les techniques de microscopie électronique, de RMN et l'analyse des données cristallographiques ont permis de déterminer que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ prenait une forme repliée au repos et que l'activation entraîne un dépliement du récepteur (Beglova et al. 2002; Takagi et al. 2002; Xiong et al. 2001) (Figure 14).

Les protéines associées aux domaines intracellulaires de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ interviennent dans ces mécanismes d'activation. Tout particulièrement la taline, une protéine de 270 kDa associée au cytosquelette (Calderwood et al. 1999; Knezevic et al. 1996). L'association via son domaine globulaire aux domaines intracellulaires de l'intégrine provoque la séparation des parties cytoplasmiques du complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$ déclenchant l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Kim et al. 2003; Vinogradova et al. 2002). Les protéines CIB et β_3 -endonexine, qui s'associent respectivement aux sous-unités α_{IIb} et β_3 , semblent également impliquées dans l'activation de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$. Une surexpression de β_3 -endonexine dans des cellules CHO exprimant l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ provoque une augmentation de la fixation du fibrinogène et une agrégation plus importante (Eigenthaler et al. 1997; Kashiwagi et al. 1997), alors que l'association de CIB au domaine cytoplasmique de l' α_{IIb} augmente la liaison de Fg et qu'un peptide palmitoylé bloquant l'interaction CIB- α_{IIb} inhibe l'activation de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Tsuboi 2002).

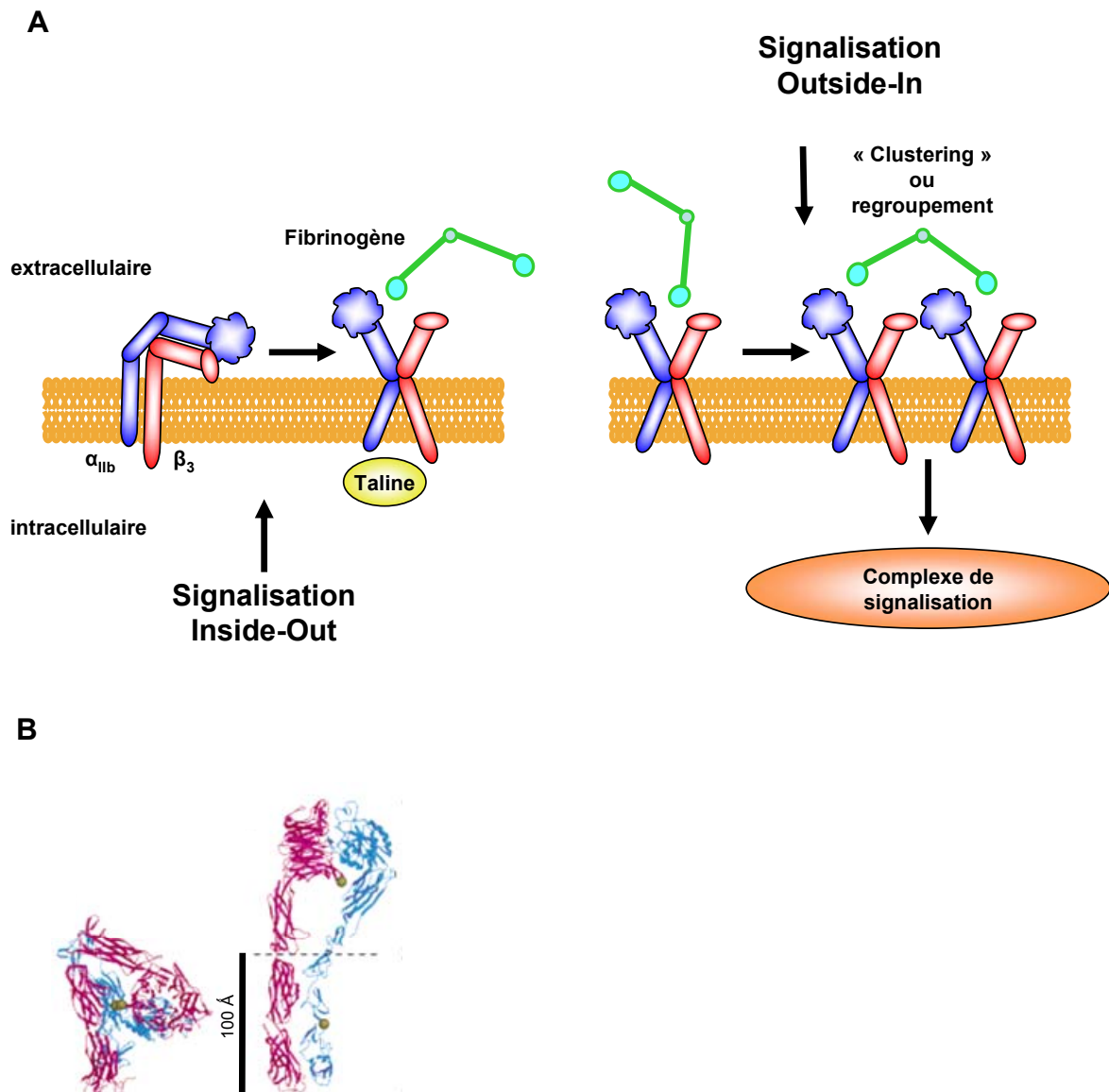


Figure 14: A. Mécanisme bidirectionnel de signalisation médié par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. (Adaptée de Shattil et al, 2004). B. Représentation par diagramme en rubans de la structure tridimensionnelle au repos et dépliée adoptée par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. (D'après Takagi et al, 2002).

6. L'axe GPIb-V-IX-FW

En présence de forces de cisaillement élevées, les étapes initiales d'adhésion des plaquettes au niveau d'un vaisseau lésé sont assurées par l'interaction entre le complexe GPIb-V-IX plaquettaire et le FW. Cette fonction d'adhésion fait de ce récepteur un acteur majeur de l'hémostase primaire. Un rôle supplémentaire, mis en évidence plus récemment, est sa capacité à transmettre une signalisation intracellulaire. L'étude de cette voie d'activation a été l'objet central de ce travail de thèse. Au cours de ce chapitre seront abordés successivement la structure moléculaire et génomique du complexe, sa biosynthèse, ses propriétés adhésives et enfin l'état des connaissances sur son mode de signalisation.

6.1. Structure du complexe GPIb-V-IX

Le complexe GPIb-V-IX est constitué de 4 glycoprotéines transmembranaires de type I : la GPIb α (135 kDa) et la GPIb β (26 kDa) qui sont liées par un pont disulfure, la GPV (82 kDa) et la GPIX (20 kDa) qui sont associées de manière non covalente. A la surface de la plaquette, on dénombre environ 25 000 copies du complexe GPIb-IX et 12 000 copies de GPV (**Berndt et al. 2001**) (**Figure 15**). Ces 4 glycoprotéines appartiennent à la famille des protéines riches en leucine (LR) qui comprend des protéines aux fonctions diverses intervenant dans l'adhésion cellulaire, la signalisation ou le développement (**Kobe and Deisenhofer 1994**). Chaque domaine LR est composé de 20 à 29 acides aminés qui forment un court feuillet β relié par une boucle à une hélice α . L'assemblage des ces modules LR crée une structure concave de type fer à cheval. Chaque sous-unité du complexe porte un nombre variable de LR (la GPIb α 8, la GPV 15, la GPIb β et la GPIX 1) qui sont flanquées à leur extrémités N et C terminales d'une ou deux boucles formées par l'appariement de cystéines (**Hickey et al. 1989; Lanza et al. 1993; Lopez et al. 1988; Uff et al. 2002**). Les domaines LR et les régions flanquantes de la GPIb α sont impliqués dans la liaison du FW (6.4.4).

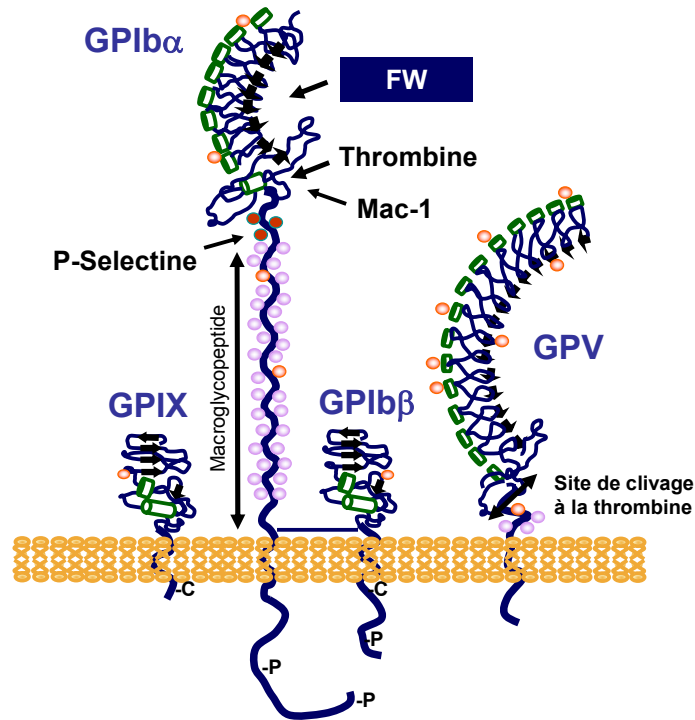


Figure 15: Représentation schématique du complexe GPIb-V-IX. C: cystéine palmytoylée ou myristoylée; \diamond : domaine riche en leucine; \bullet : tyrosine sulfatée; \circ : O-glycosylation; \circ : N-glycosylation; -P: phosphorylation

6.1.1. La GPIb α

Elle peut être divisée en 4 grands domaines : *i*) la partie N-terminale extracellulaire de 42 kDa, d'aspect globulaire en microscopie électronique, contenant les 8 domaines LR et leurs régions flanquantes, *ii*) une région de 19 acides aminés fortement chargée négativement portant 3 tyrosines sulfatées, *iii*) une région hautement glycosylée, le macroglycopeptide, *iv*) un domaine transmembranaire et un segment intracellulaire de 96 résidus de long.

La cristallisation de la partie N-terminale (*i+ii*) seule ou associée au domaine A1 du FW a permis d'en établir la structure 3D. Schématiquement ce domaine prend l'aspect d'une main vue de profil qui saisiserait le FW en le pinçant avec la partie C-terminale flanquant le domaine LR composée d'une double-boucle cystéine (**Dumas et al. 2004; Huizinga et al. 2002; Uff et al. 2002**) (**Figure 16**). La portion N-terminale de 45 kDa porte également les sites de liaison pour l' α -thrombine, Mac-1, la P-sélectine, les facteur XI et XII de la coagulation et le kininogène de haut poids moléculaire (**Berndt et al. 2001**). La structure 3D de la GPIb α associée à la thrombine a également été établie, montrant une interaction avec la boucle cystéine et la région chargée négativement (**Dumas et al. 2003**). Cette dernière région est

également impliquée via les tyrosines sulfatées dans l'interaction avec la P-sélectine alors que Mac-1 requiert le domaine LR. Le macroglycopeptide constitue une région fortement O-glycosylée et peu flexible, facilitant l'accès aux sites de liaison N-terminaux en éloignant la tête globulaire d'environ 45 nm par rapport à la membrane plasmique. Le macroglycopeptide présente un polymorphisme faisant varier sa taille en multiples de 13 acides aminés (de 1 à 4 répétitions). Le domaine intracellulaire de la GPIb α porte les sites de liaison pour la FLNA (Cranmer et al. 2005; Nakamura et al. 2006; Williamson et al. 2002) et des motifs phospho-sérines impliqués dans l'association à la protéine adaptatrice 14-3-3 ζ (Bodnar et al. 1999; Mangin et al. 2004) (Figure 17). Ces deux protéines cytoplasmiques sont impliquées respectivement dans la régulation des fonctions adhésives et d'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (voir chapitre 6.5.4).

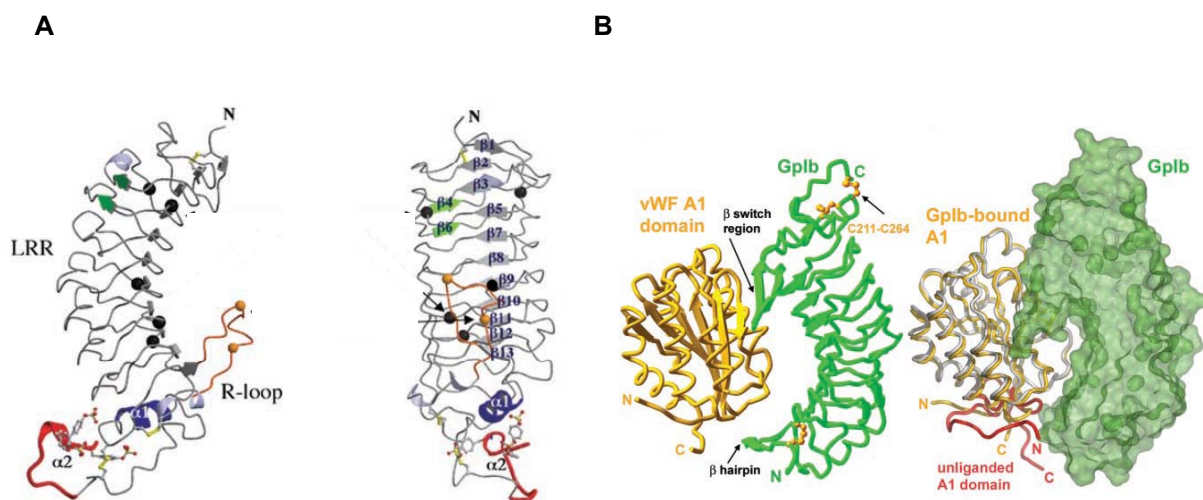


Figure 16: Structure tridimensionnelle du site N-terminal de 45 kDa de la GPIb α seul (A) ou lié (B) au domaine A1 du FW. A) Représentation «en ruban» de la GPIb α vue sur le côté (à gauche) et de la surface concave (à droite) formée par les domaine LR (selon Uff et al. 2002). B) Représentation du complexe entre la GPIb α et le domaine A1 du FW (à droite) comparé à un domaine A1 non associé (à gauche). En vert la GPIb α , en jaune le domaine A1, en gris les régions du domaine A1 qui ne diffèrent pas lors de l'association à la GPIb α et en rouge les régions qui ont changé de conformation (selon Dumas et al. 2004).

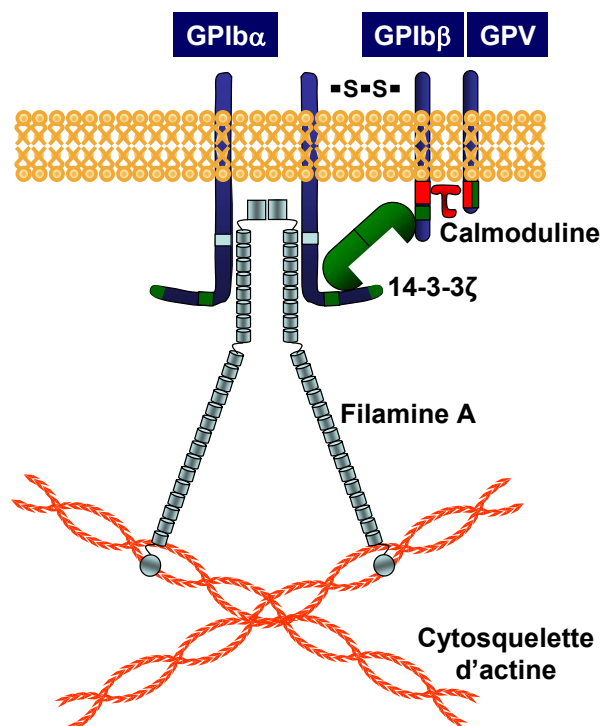


Figure 17: Représentation schématique des domaines intracellulaires du complexe GPIb-V-IX et des protéines cytoplasmiques associées. □ Site d'interaction pour la filamine A; ■ Sites d'interaction pour la 14-3-3ζ; ■ Sites d'interaction pour la calmoduline

6.1.2. La GPIbβ

La GPIbβ est liée à la GPIbα par un pont disulfure juste au dessus de la membrane plasmique. Elle dispose d'un seul domaine LR contenant une N-glycosylation. Le domaine intracellulaire de cette sous-unité fait 34 acides aminés (C¹⁴⁷-S¹⁸¹) et porte en position 147 une cystéine palmitoylée qui pourrait intervenir dans l'ancrage de cette sous-unité dans la membrane plasmique (**Muszbek and Laposata 1989**) et dans la relocalisation du complexe dans les radeaux lipidiques lors d'une activation (**Lopez et al. 2005**). La GPIbβ joue un rôle essentiel lors de la biosynthèse du complexe et facilite l'expression des sous-unités GPIbα et GPIIX à la surface des plaquettes. Sa région cytoplasmique comprend également une sérine en position 166 phosphorylable par la PKA, qui interviendrait dans l'interaction avec la protéine 14-3-3ζ (**Bodnar et al. 2002; Feng et al. 2000; Wardell et al. 1989**) et dans la régulation des propriétés adhésives du complexe (**Dai et al. 2005; Perrault et al. 2003**). RAM.1, un anticorps monoclonal de rat dirigé contre la partie extracellulaire des la GPIbβ, réduit de 50% l'adhésion de plaquettes et de cellules transfectées au FW en présence de flux et inhibe la phosphorylation PKA-dépendante de la GPIbβ (**Perrault et al. 2003; Perrault et al. 2001**).

Ces résultats sont des arguments indirects pour un rôle de la GPIIb/IIIa dans les fonctions adhésives du complexe. La GPIIb/IIIa a été également décrite comme étant liée à la calmoduline (**Andrews et al. 2001**). Le rôle de la calmoduline pour le complexe n'est pas encore établi. (**Figure 17**).

6.1.3. La GPIIX.

La GPIIX possède 60% d'identité de séquence avec la GPIIb/IIIa. De manière identique, elle dispose d'un domaine LR, de régions flanquantes et d'un site de N-glycosylation. La GPIIX est associée à la GPIIb de manière non covalente mais le mode d'interaction n'est pas clairement établi. Fonctionnellement, aucun rôle n'a été attribué à cette unité à l'exception d'un rôle possible de la cystéine de son court domaine cytoplasmique (6 acides aminés). Ce résidu myristoylé pourrait intervenir dans l'adressage du complexe GPIIb-V-IX dans les radeaux lipidiques (**Muszbek and Laposata 1989; Schick and Walker 1996**).

6.1.4. La GPV

Par comparaison à la GPIIX, la sous-unité GPV est associée au complexe GPIIb-IX de manière plus lâche et son interaction peut être rompue lorsque les plaquettes sont lysées avec un détergent comme le Triton X-100. La partie extracellulaire de la GPV comprend 15 LR et 8 sites de N-glycosylation. Cette partie extracellulaire est sensible au clivage par la thrombine, qui libère un fragment f1 soluble de 69 kDa dans la circulation. La signification physiologique de ce clivage reste à établir (**Lanza et al. 1993**) mais la libération du fragment f1 en fait un bon marqueur d'activation plaquettaire. Cette propriété a été exploitée pour développer un kit de diagnostic actuellement utilisé en clinique (**Aleil et al. 2003; Morel et al. 2004a; Morel et al. 2004b; Wolff et al. 2005**). La GPV peut également être clivée par la calpaïne et par ADAM-17 (TACE) après activation des plaquettes par d'autres agonistes forts (**Fox 1994; Rabie et al. 2005**). La GPV pourrait moduler la réponse des plaquettes au collagène et à la thrombine, puisque des plaquettes de souris KO montrent une agrégation diminuée au collagène et une activation augmentée aux faibles doses de thrombine (**Moog et al. 2001; Ramakrishnan et al. 2001**). Le domaine cytoplasmique de la GPV comporte 15 acides aminés décrits comme liant la calmoduline (**Andrews et al. 2001**) et la 14-3-3ζ (**Andrews et al. 1998**) (**Figure 17**).

6.2. Gènes, biosynthèse et expression du complexe GPIb-V-IX

Chaque sous-unité est codée par un gène distinct. Le gène codant pour la GPIb α est localisé sur le bras court du chromosome 17 (Wenger et al. 1989), le gène de la GPIb β sur le bras long du chromosome 22 (Kelly et al. 1994) et les gènes de la GPIX et de la GPV sur le bras long du chromosome 3 (Hickey et al. 1989; Lanza et al. 1993; Yagi et al. 1994). La séquence codante des sous-unités GPIb α , GPIX et GPV est contenue dans un seul exon, alors que celle de la GPIb β est contenue dans deux exons. Les promoteurs de ces quatre gènes présentent des similitudes. Ils contiennent des sites de reconnaissance pour les facteurs de transcription GATA et ETS qui sont retrouvés dans d'autres gènes exprimés dans les lignées mégacaryocytaire et érythroïde (Deveaux et al. 1996; Lemarchandel et al. 1993; Roth et al. 1996). La grande majorité des études ont montré que le complexe GPIb-V-IX ne s'exprime que dans le mégacaryocyte et la plaquette. Toutefois, certains ont montré une expression dans la cellule endothéliale, notamment dans des conditions d'inflammation (Perrault et al. 1997; Sprandio et al. 1988; Wu et al. 1997).

Des cellules transfectées par différentes combinaisons des sous-unités du complexe ont démontré la nécessité de GPIb α , GPIb β et GPIX pour une expression optimale à la surface des cellules (Lopez et al. 1992). Ceci est confirmé par l'étude de patients Bernard-Soulier qui montrent qu'un défaut d'une des trois sous-unités entraîne une diminution sévère de l'expression du complexe dans la plaquette (Lopez et al. 1998). La GPIb β semble jouer un rôle central, par sa capacité à interagir et à stabiliser ses deux partenaires. (Lopez et al. 1994). Le travail récent de Mo et al a mis en évidence l'importance des domaines transmembranaires de la GPIb α et de la GPIb β pour une bonne expression du complexe (Mo et al. 2006). Une biosynthèse efficace du complexe GPIb-IX a lieu en l'absence de GPV (Kahn et al. 1999; Li et al. 1995). A l'inverse, l'expression de la GPV à la surface de la cellule nécessite la présence des trois sous-unités (Strassel et al. 2004).

Le complexe est assemblé dès le compartiment du réticulum endoplasmique où débute le processus de N-glycosylation. Puis, lors du transit au travers des compartiments du Golgi d'autres modifications post-traductionnelles ont lieu telles que les O-glycosylations, la sulfatation des tyrosines, la palmitoylation ou la myristoylation des cystéines (Dong et al. 1998; Ulsemer et al. 2001).

6.3. Les différents modèles d'études *in vitro* des fonctions du complexe GPIb-V-IX

Le complexe GPIb-V-IX porte à la fois une fonction d'adhésion (liaison au FW) et une fonction d'activation (signalisation intracellulaire déclenchée par l'interaction GPIb-FW). Plusieurs systèmes d'étude *in vitro* existent, qui permettent d'évaluer à divers degrés ces différentes propriétés fonctionnelles du complexe.

L'agrégométrie est une méthode utilisée permettant d'évaluer de manière simple l'interaction avec le FW. Une suspension plaquettaire est placée sous agitation (1100 tours/min) en présence de FW humain et d'un inducteur comme la botrocétine ou la ristocétine (voire chapitre 2.6.4.2), et l'agglutination des plaquettes est appréciée par l'augmentation de la transmission lumineuse au travers de la suspension. Ce processus est passif puisqu'il est observé avec des plaquettes métaboliquement inactives, fixées ou traitées par l'EDTA. En absence de blocage de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (EDTA, antagonistes), l'agglutination se poursuit par l'agrégation plaquettaire, qui fait intervenir l'activation de l'intégrine et la liaison de fibrinogène. Le terme d'agglutination correspond donc aux interactions plaquette-plaquette strictement sous le contrôle de la GPIb α (**Figure 18A**). L'agglutination peut également être observée en absence d'inducteurs en utilisant du FW bovin ou de porc, ou du FW humain dépourvu d'acide sialique.

L'interaction plaquette-plaquette dépendant de la GPIb peut également être étudiée avec un viscosimètre où une suspension plaquettaire est soumise à des taux de cisaillement élevés (de 2600 à plus de 10.000 s⁻¹) qui pourraient se rencontrer dans un vaisseau sténosé. Dans ces conditions, une agrégation des plaquettes induite par le flux (ou Shear Induced Platelet Aggregation : SIPA) est observée qui ne nécessite pas l'addition d'un inducteur. Cependant, nous n'avons pas affaire ici à une agglutination mais à une véritable agrégation où l'interaction GPIb-FW s'accompagne d'une activation soutenue par les nucléotides sécrétés (ADP, ATP) et le TxA2 aboutissant à la mobilisation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Goto et al. 1998; Oury et al. 2004; Resendiz et al. 2003**) (**Figure 18B**).

D'autres systèmes se rapprochant plus des conditions du vaisseau permettent d'étudier les fonctions adhésives et de signalisation dans un système où le FW est immobilisé sur une surface. L'interaction avec le FW peut être observée dans des conditions statiques, mais nécessite pour être efficace des inducteurs ou des FW modifiés. Un attachement plus efficace est obtenu dans des conditions de flux qui permettent de reproduire les grandes étapes de l'adhésion observées au niveau du sous endothélium (adhésion, activation et changement de forme) (**Maxwell et al. 2006; Yuan et al. 1999**) (**Figure 18C**).

Plusieurs systèmes d'adhésion en flux ont été développés. Tout d'abord, la chambre dite de Baumgartner où les plaquettes ou le sang sont perfusés dans un tube de verre contenant un vaisseau sanguin où l'endothélium a été dénudé (**Baumgartner et al. 1976**). Un autre modèle a été développé par Cazenave *et al.*, constitué d'une tige rotatoire mise au contact avec du sang ou des plaquettes lavées, et recouverte d'un segment de vaisseau ou de protéines adhésives (**Cazenave et al. 1975**). Une évolution de la chambre de perfusion développée par Sakariassen *et al.*, comprend une lame de verre plane recouverte de protéines adhésives, adaptée sur une chambre rectangulaire dans laquelle le sang ou les plaquettes sont perfusées (**Sakariassen et al. 1983**). Enfin, l'adhésion des plaquettes peut également être étudiée par perfusion au travers d'un capillaire cylindrique ou rectangulaire (**Cranmer et al. 1999; Mulvihill et al. 1987**).

L'ensemble de ces systèmes permet de faire varier le flux et de passer de conditions veineuses à celles trouvées dans les artères sténosées. Les systèmes de type chambre Sakariassen ou microcapillaire rectangulaire permettent l'observation au microscope. L'analyse par caméra couplée à l'ordinateur, permet la quantification de l'adhésion ainsi qu'une étude morphométrique des plaquettes et des agrégats. Des améliorations ont été apportées grâce aux nouvelles techniques d'imagerie, permettant la mesure en temps réel des signaux calciques générés par les plaquettes lors de l'adhésion (**Mazzucato et al. 2002; Nesbitt et al. 2002**).

La présence de globules rouges est un paramètre important, en plus de l'immobilisation du FW sur une surface et du flux, élevé pour une adhésion efficace et pour la dépendance vis-à-vis de GPIIb. Tout comme l'agrégation ou la « SIPA », il est nécessaire de contrôler les mécanismes d'amplification par l'ADP, TxA2 et $\alpha_{IIb}\beta_3$ pour établir une réponse strictement dépendante de GPIIb. La mise en évidence d'une signalisation GPIIb a clairement été démontrée dans ce type de chambres, de perfusion ou de capillaires (**Mazzucato et al. 2002; Nesbitt et al. 2002**). Par comparaison, l'activation observée dans les systèmes en suspension est classiquement la composante de signaux GPIIb relayés par une activation impliquent à divers degrés l'ADP, TxA2 et $\alpha_{IIb}\beta_3$.

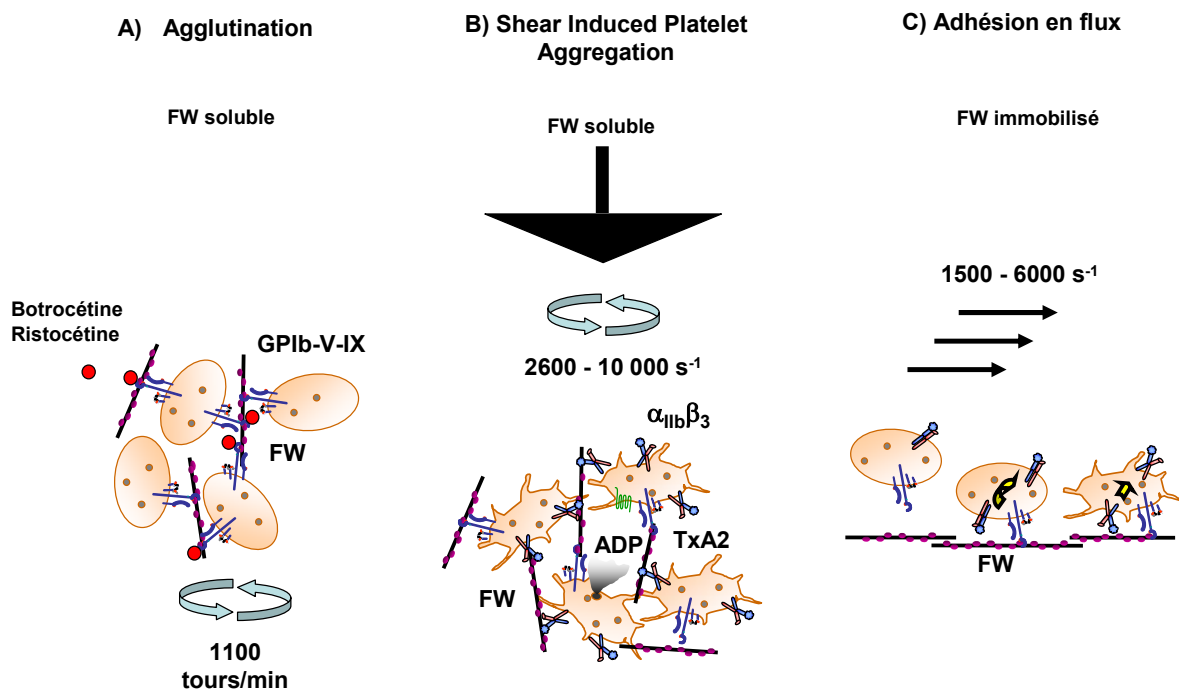


Figure 18: Différents modèles d'étude *in vitro* des fonctions du complexe GPIIb-V-IX. SIPA : Shear induced platelet aggregation; TxA2: thromboxane A2. Le taux de cisaillement est exprimé en s^{-1}

6.4. Fonctions adhésives du complexe GPIIb-V-IX

Le FW est le ligand principal du complexe GPIIb-V-IX. En s'associant au collagène du sous endothélium mis à nu lors de la lésion, il va permettre le recrutement des plaquettes et l'initiation de leur activation.

6.4.1. Le FW

Le FW est une glycoprotéine adhésive multimérique qui circule à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ dans le plasma et dont le poids moléculaire varie de 500 à 20 000 kDa pour les multimères de haut poids moléculaires. Le FW est également localisé dans les granules α des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, d'où il ne sera sécrété dans le plasma qu'après activation. Le FW est également déposé de manière passive dans le sous endothélium, mais après lésion vasculaire, il est principalement accumulé par la liaison du FW plasmatique aux fibres de collagène. Il circule dans le plasma associé au facteur VIII de la coagulation. Le FW contient plusieurs domaines fonctionnels : un domaine A1 qui permet son association à la GPIIb, un domaine A3 permettant son association au

collagène et enfin un module C1 contenant le motif RGD responsable de la liaison aux intégrines $\alpha_{11b}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$ (**Ruggeri 1999**). L'importance physiologique du FW est souligné par l'existence de deux maladies : la maladie de Willebrand, un syndrome hémorragique dû à un déficit qualitatif ou quantitatif de FW (**Keeney and Cumming 2001**), et le purpura thrombotique thrombocytopénique qui résulte de l'accumulation plasmatique de multimères de facteur Willebrand (FW) de très haut poids moléculaire due à un défaut de protéase ADAMTS13 (A Disintegrin AND Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeat). Cette maladie entraîne l'apparition d'une thrombopénie et d'évènements thrombotiques dans la microcirculation (**Galbusera et al. 2006**). Il existe une forme particulière de maladie de FW (type Iib) qui est due à une affinité augmentée pour le GPIIb α entraînant une déplétion des stocks plasmatiques.

6.4.2. Régulations de l'interaction GPIIb α -FW

Dans des conditions physiologiques, les plaquettes n'interagissent ni avec le FW plasmatique circulant, ni avec les cellules endothéliales non activées qui n'exposent pas de FW à leur surface. Par contre, l'immobilisation du FW à la surface du collagène après lésion vasculaire va permettre le recrutement des plaquettes via le GPIIb.

L'immobilisation du FW sur une surface est un paramètre important, qui pourrait modifier directement l'affinité du FW pour la GPIIb, ou en multipliant la périodicité des sites de liaison, augmenter l'avidité du FW pour la GPIIb. Néanmoins, l'efficacité des plaquettes à lier du FW immobilisé sur une surface en condition statique indique que l'immobilisation ne peut à elle seule assurer l'interaction entre la GPIIb α et le FW.

Dans des conditions de flux élevées, les globules rouges occupent le centre du vaisseau et poussent les plaquettes contre les parois offrant ainsi des conditions optimales pour l'interaction GPIIb-FW. Le flux élevé entraîne d'autres conséquences favorables à l'interaction en transformant le FW d'une forme globulaire à une chaîne allongée exposant des domaines intramoléculaires qui étaient jusque là masqués (**Siedlecki et al. 1996**). Miyata et al ont mis en évidence la nécessité du déploiement du FW pour augmenter ses propriétés adhésives (**Miyata et al. 1996**).

Les multimères de FW de très haut poids moléculaires sont les formes les plus efficaces pour permettre l'adhésion des plaquettes. Ces derniers sont libérés par les granules de Weibel-Palade et par les plaquettes, et dans des conditions normales ils ne sont pas présents dans le plasma. Ceci est dû à leur clivage par la métalloprotéinase ADAMTS13, qui fait défaut lors

du purpura thrombotique thrombocytopénique (**Galbusera et al. 2006**). Ce clivage prévient la formation de longs filaments de FW auxquels les plaquettes pourraient s'associer spontanément pour former des microagrégats rapidement éliminés de la circulation.

In vitro, sous faible agitation dans un agrégomètre, la liaison du FW au complexe GPIb-V-IX ne peut être observée qu'en présence de médiateurs comme la ristocétine, la botrocétine ou en présence de FW modifiés. L'ajout des médiateurs à un mélange de FW et d'une suspension plaquettaire, provoque l'agglutination des plaquettes, qui est un mécanisme indépendant du calcium extracellulaire et de l'activation plaquettaire. La ristocétine est un antibiotique isolé de l'actinomycète *Nocardia lurida*, elle catalyse la liaison entre le FW et la GPIb α en reconnaissant la GPIb α et le FW (**De Luca et al. 2000; Girma et al. 1990; Vicente et al. 1990**). La botrocétine est une protéine extraite du venin de serpent *Bothrops jararaca*, elle lie uniquement le FW en utilisant un site distinct de celui de la ristocétine (**Sugimoto et al. 1991**). Certains FW sont capables de lier la GPIb α humaine en absence de médiateur, le FW bovin, le FW porcin, le FW désialilé et le FW provenant de patients souffrant de la maladie de Willebrand de type 2B (**Altieri et al. 1986; De Marco et al. 1987; Pareti et al. 1992; Vermylen et al. 1973**).

6.4.3. Les sites du FW impliqués dans la liaison à la GPIb α .

Le domaine A1 du FW représente le site d'interaction avec la GPIb α (**Clemetson 1983**). L'utilisation de peptides du domaine A1 a permis d'identifier plusieurs résidus impliqués dans cette interaction. Les motifs (539-553, 569-583 et 629-643) inhibent la liaison induite par la botrocétine (**Sugimoto et al. 1991**) alors que le peptide 514-542 inhibe la liaison en présence de botrocétine ou de ristocétine (**Berndt et al. 1992**). Des mutations de type 2B couvrant la zone 543-578 montrent une capacité augmentée à lier la GPIb (**Emsley et al. 1998; Sugimoto et al. 1991**).

L'analyse cristallographique du domaine A1 lié à la GPIb α a permis d'affiner la cartographie fonctionnelle (**Dumas et al. 2004; Huizinga et al. 2002**). Le domaine A1 possède une structure de type α/β fold avec un domaine hydrophobe constitué de 5 feuillets β parallèles encadrés par 3 hélices α (**Figure 16B**), qui présente des similitudes avec les domaines I des sous-unités α_2 , α_M et α_L des intégrines et avec le domaine A3 du FW (**Emsley et al. 1997**). Une modélisation du complexe GPIb α -domaine A1, ainsi que des expériences de liaison de la GPIb α associée à un domaine A1 normal, contenant des mutations rencontrées dans la de maladie de Willebrand, ou présentant une inversion de charge ont mis en évidence

l'importance des régions 559-566, 594-603 et tout particulièrement de la lysine en position 599 pour l'association au complexe (**Matsushita et al. 2000; Vasudevan et al. 2000**). On pourra noter que ces résultats sont différents de ceux obtenus pour certains peptides bloquant l'interaction GPIb-FW.

6.4.4. Les sites de liaison sur la GPIb α

Le site de liaison du FW sur la GPIb α est situé sur le domaine N-terminal de 45 kDa qui comprend les 282 premiers acides aminés, dont la séquence flanquante N-terminale, les 8 domaines LR, la région flanquante C-terminale et la région anionique comprenant trois tyrosines sulfatées.

La région anionique constitue un premier site de liaison. L'utilisation de fragments protéolytiques de la GPIb α , a montré un rôle de ce domaine pour l'agglutination médiée par la botrocétine (**Ward et al. 1996**). L'inhibition de la sulfatation des tyrosines (Tyr 276, 278 et 279) ou la mutation des résidus anioniques (Asp 272, 274 et 277) empêchent la liaison de GPIb α au FW en présence de botrocétine et la diminuent en présence de ristocétine (**Dong et al. 1995; Marchese et al. 1995**).

La double boucle cystéine C-terminale, entre les cystéines 209 et 248, joue un rôle clef. Des patients atteints de maladie de FW de type plaquettaire présentent des mutations de type gain de fonction sur cette boucle (Gly²³³ en Val et Met²³⁹ en Val) (**Andrews et al. 1999**). La reproduction de ces complexes GPIb-IX mutés dans des cellules CHO, ainsi que la mutation des résidus Asp²³⁵ et Lys²³⁷ en Val, leur confèrent une capacité accrue à lier le FW (**Dong et al. 2000**).

Les domaines LR constituent le troisième site de liaison au FW. Des expériences de liaison à des GPIb α chimères où la séquence humaine est progressivement remplacée par celle du chien, suggèrent que les LR 2, 3 et 4 sont impliqués (**Shen et al. 2000**). L'existence de mutations dans ces domaines entraînant une perte de fonction chez certains patients BS ayant une forme variante du syndrome, conforte leur rôle pour la liaison du FW (**de la Salle et al. 1995a; De Marco et al. 1990; Miller 1996**).

L'utilisation d'un anticorps liant la partie flanquante N-terminale a permis d'établir que ce domaine est également impliqué dans l'interaction GPIb-FW (**Wu et al. 2002**).

Les études cristallographiques du complexe domaine A1-GPIb α ont permis de définir 3 zones de contact (**Dumas et al. 2004; Huizinga et al. 2002**). *i*) au niveau de la double boucle

cystéine N-terminale (Ser¹¹, His¹², Glu¹⁴, Asn¹⁶) ; *ii*) dans les LRs (His³⁷, Glu¹²⁸, Lys¹⁵², Asp¹⁷⁵, Thr¹⁷⁶, Phe¹⁹⁹) ; *iii*) sur la double boucle cystéine C-terminale (Glu²²⁵, Asn²²⁶, Tyr²²⁸, Ser²⁴¹). Dans la face concave négativement chargée formée par les LRs (59-128), seul le résidu Glu¹²⁸ est en contact avec le FW. Cela suggère des interactions à longue distance avec une zone positivement chargée du FW. Sur la base de deux co-cristallisations de FW avec la GPIb α , un modèle dynamique d'association a été proposé. Ces deux protéines pourraient subir des changements de conformation en fonction du flux. La GPIb α agirait comme une pince agrippant la boucle A1 par l'extrémité comprenant les doubles boucles cystéines (appelée β switch ou β hairpin). L'ouverture et la fermeture de la pince seraient contrôlées par le flux (**Sadler 2002**).

6.4.5. Les autres ligands extracellulaires du complexe GPIb-V-IX

6.4.5.1. L' α -thrombine

La thrombine est une enzyme clef de l'hémostase qui clive le fibrinogène en fibrine insoluble qui permet de consolider le clou plaquettaire formé. Elle est également un puissant agoniste plaquettaire en activant des récepteurs de la famille PAR (PAR-1 et PAR-4 chez l'homme) (**Coughlin 2005**).

La réponse plaquettaire à la thrombine dépend également de son interaction avec la GPIb α . En effet, l'absence de complexe dans les patients Bernard-Soulier (**Lopez et al. 1998**), le clivage du domaine N-terminal (**Ramakrishnan et al. 2001; Soslau et al. 2001**) ou son blocage par des anticorps (**Mazzucato et al. 1998; Yamamoto et al. 1985**) entraînent une réponse diminuée à la thrombine. De plus, plusieurs études ont montré une activation plaquettaire en réponse à la thrombine dépourvue d'activité enzymatique et donc incapable d'activer les PAR et qui dépendrait de la GPIb α (**Adam et al. 2003; Dubois et al. 2004; Soslau et al. 2001**).

La structure cristallographique du complexe GPIb α -thrombine a été résolue, permettant l'identification des sites d'interaction (**Celikel et al. 2003; Dumas et al. 2003**). L'analyse des cristaux montre qu'une même GPIb α peut à la fois interagir avec l'exocyste I via son 6^{ième} motif LR et avec la double boucle cystéine qui lui fait suite, et interagir avec l'exocyste II d'une seconde molécule de thrombine grâce à son domaine anionique sulfaté.

6.4.5.2. *Mac-1*

L'intégrine $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1, CD11b/CD18, CR3) des monocytes dispose d'un domaine I ayant des similitudes avec le domaine A1 du FW (Emsley et al. 1997). Cette intégrine a été impliquée dans l'adhésion stable, puis la migration, des leucocytes aux plaquettes recrutées au niveau d'une lésion vasculaire (Wang et al. 2005). Cette adhésion est assurée par l'interaction entre la partie globulaire N-terminale de la GPIb α et le domaine I de Mac-1 (Simon et al. 2000). Cette même association intervient dans le processus d'élimination des plaquettes exposées au froid par les macrophages du foie (Hoffmeister et al. 2003; Josefsson et al. 2005).

6.4.5.3. *La P-Sélectine*

La P-sélectine est une protéine transmembranaire de 140 kDa présente dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales ou dans les granules α des plaquettes. Elle est exposée à la surface de ces cellules activées par un processus d'exocytose. La P-sélectine se lie à un contre-récepteur, la PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1), qui est exprimé à la surface des neutrophiles. Cette association permet le roulement et le ralentissement des leucocytes au niveau d'un site inflammatoire (Springer 1995). PSGL-1 et la GPIb α disposent de motifs similaires comme un domaine sialomucine et une zone contenant des tyrosines sulfatées. Il a été montré que la GPIb α peut lier la P-sélectine via la zone sulfatée (Romo et al. 1999). Cette liaison va permettre aux plaquettes, tout comme les leucocytes, de rouler à la surface des cellules endothéliales activées (Frenette et al, 1995). Le rôle de cette interaction pourrait être de faciliter le recrutement des leucocytes au niveau d'une zone thrombotique.

6.4.5.4. *Le kininogène de haut poids moléculaire (HMWK)*

Le kininogène, une α -globuline de 110 kDa présente dans le plasma, participe en tant que co-activateur à la phase contact de la coagulation. Cette protéine a comme autre propriété d'inhiber l'activation plaquettaire déclenchée par la thrombine (Puri et al. 1991). Cet effet inhibiteur est quasi absent pour des patients Bernard-Soulier, suggérant une liaison avec le complexe GPIb-V-IX (Bradford et al. 1997). Cette même étude a montré que des peptides du kininogène et des anticorps dirigés contre la GPIb α inhibent la liaison du kininogène aux plaquettes et que la GPIb est retenue sur une colonne d'affinité couplée au kininogène de haut poids moléculaire. Cette liaison dépendante du Zn^{2+} , fait intervenir le domaine C3 du kininogène et la région N-terminale de la GPIb α (Bradford et al. 1997; Joseph et al. 1999).

6.4.5.5. Le facteur XII de la coagulation

Le facteur XII est une glycoprotéine plasmatique de 80 kDa, qui elle aussi intervient dans le processus de phase contact de la coagulation. Cette pro-enzyme (ou zymogène) est activée par clivage pour donner le facteur XIIa. Il va en association avec d'autres cofacteurs (comme le kininogène) cliver/activer le Facteur XI impliqué dans l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation. De façon similaire au kininogène, le facteur XIIa inhibe l'aggrégation à la thrombine. Une interaction directe entre la GPIb α et le facteur XII activé ou non a été mise en évidence. Des expériences de compétitions montrent que le facteur XII et le kininogène partagent le même site de liaison à la GPIb α (**Bradford et al. 2000**).

6.4.6. Rôles des domaines intracellulaires

Les domaines intracellulaires du complexe GPIb-V-IX assurent son ancrage au cytosquelette d'actine en interagissant avec la FLNA et lient des protéines adaptatrices comme la 14-3-3 ζ et la calmoduline qui pourraient réguler les fonctions d'adhésion et de signalisation du complexe. Il existe des arguments en faveur d'une régulation des propriétés adhésives du complexe par sa partie cytoplasmique. Ceux-ci proviennent essentiellement de modèles cellulaires transfectés par un complexe GPIb-IX contenant des mutations intracellulaires. La transfection du complexe GPIb-IX dans les cellules CHO permet de reproduire en grande partie les propriétés d'adhésion des plaquettes au FW.

Des réponses divergentes ont été obtenues dans un modèle CHO contenant une GPIb α progressivement tronquée de son domaine cytoplasmique puisque deux études ont montré une capacité réduite à lier le FW (**Dong et al. 1997; Schade et al. 2003**), alors qu'une troisième a montré une liaison normale après délétion des 2/3 de la partie cytoplasmique (délétion de 545 à 610) (**Cunningham et al. 1996**).

Des délétions plus limitées ont permis de localiser le site d'interaction avec la FLNA (régions 557-568 et 569-579) (**Williamson et al. 2002**) et d'évaluer plus précisément les répercussions sur l'adhésion. Deux types de réponses ont été observés en fonction du modèle utilisé. La délétion de ce domaine entraîne une agglutination augmentée des cellules CHO exprimant GPIb-IX, qui rejoignent les observations d'une augmentation de l'agglutination après traitement par la cytochalasine D dans des plaquettes ou des cellules exprimant un complexe normal (**Englund et al. 2001; Mistry et al. 2000; Williamson et al. 2002**). Ces résultats indiquent que l'interaction avec le cytosquelette d'actine en limitant la mobilité du récepteur dans la membrane plasmique exerce un contrôle négatif sur l'adhésion. Dans un

deuxième modèle où les cellules adhèrent au FW immobilisé en conditions de flux, la perte d'interaction avec la FLNA se traduit par une interaction moins efficace et instable. La perte d'interaction avec le cytosquelette d'actine entraîne un arrachement du complexe GPIb-IX par la matrice, aboutissant à la perte progressive d'adhésion et le détachement des cellules **(Cranmer et al. 1999; Williamson et al. 2002)**. Selon les conditions expérimentales le domaine intracellulaire de GPIb α peut donc moduler l'adhésion au FW de manière négative ou permettre une adhésion plus stable. Une étude dans la plaquette basée sur l'internalisation d'un peptide de la GPIb α (557-575) grâce à un peptide cargo (PEP1) a montré une inhibition de l'aggrégation des plaquettes au FW induite par la ristocétine ou la SIPA **(Feng et al. 2003)**. Ces données suggèrent un rôle de la partie cytoplasmique de la GPIb α dans la régulation des propriétés adhésives du complexe.

Un rôle du domaine intracellulaire de la sous-unité GPIb β a également été mis en évidence mais avec également des résultats contradictoires. Le domaine cytoplasmique de la GPIb β porte en position 166 une sérine qui peut être phosphorylée par la PKA **(Wardell et al. 1989)**. Les études dans les cellules transfectées ont surtout porté sur le rôle de cette sérine.

Une mutation de ce résidu en glycine, qui prévient sa phosphorylation, a montré dans les CHO, mais également les K562, un modèle cellulaire plus proche de la plaquette, une adhésion inhibée sur une surface de FW en présence de flux **(Perrault et al. 2003)**. Dans une étude du groupe de Du *et al.*, la mutation de la Ser¹⁶⁶ en alanine ou la délétion de la zone 165-181 du domaine cytoplasmique de la GPIb β dans des CHO a au contraire pour effet d'augmenter la liaison de FW et de permettre une adhésion efficace au FW **(Bodnar et al. 2002)**. Le mécanisme proposé par cette équipe est que la GPIb β via sa Ser¹⁶⁶ phosphorylée séquestrerait la 14-3-3 dans un état inactif. Une fois la Ser¹⁶⁶ déphosphorylée, la 14-3-3 ζ pourrait se dissocier de la GPIb β et activer les fonctions d'adhésion du complexe GPIb-V-IX **(Dai et al. 2005)**. Il est difficile d'expliquer ces différentes réponses qui pourraient être liées aux modèles cellulaires. Les cellules CHO transfectées avec le complexe GPIb-IX sauvage utilisées par Du *et al.*, montrent en effet une adhésion au FW peu efficace voire quasi nulle, un comportement complètement différent de ce qui a été rapporté par d'autres groupes **(Cranmer et al. 1999; Cunningham et al. 1996; Schade et al. 2003)**.

Le rôle de la Ser¹⁶⁶ et de sa phosphorylation a également été évalué dans la plaquette en utilisant soit un inhibiteur de PKA (PKI) ou en stimulant la production d'AMPC par la PGE₁ ou la forskoline. A nouveau les résultats divergent selon les équipes avec une inhibition de la liaison de FW par la forskoline et une augmentation avec PKI **(Bodnar et al. 2002)** ou au

contraire une augmentation de l'adhésion des plaquettes sur du FW en flux après traitement à la PGE₁ (Perrault et al. 2003).

6.5. La fonction de signalisation du complexe GPIb-V-IX

6.5.1. Mise en évidence

L'existence et la nature d'une signalisation dépendante du complexe GPIb-V-IX sont l'objet de débats. Ce récepteur est longtemps resté cantonné dans un rôle d'adhésion permettant le recrutement des plaquettes au niveau de la brèche vasculaire. L'agglutination efficace de plaquettes fixées renforçait encore cette idée d'un rôle passif (Allain et al. 1975). Les premières indications d'une signalisation déclenchée par le complexe ont été la mesure de signaux calciques, la production de TXA₂ et l'activation de la PKC lors d'agrégations déclenchées en présence de FW et de ristocétine, ou de FW de type IIB, ou en SIPA (Francesconi et al. 1993; Kroll et al. 1991). D'autres indications provenaient d'études en systèmes d'adhésion en flux où l'attachement des plaquettes au FW déclenchait une activation menant à l'engagement de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Savage et al. 1996). La démonstration claire d'une signalisation GPIb-dépendante a été montrée dans des expériences d'adhésion de plaquettes ou de cellules transfectées par le complexe GPIb-IX en absence de co-activation par d'autres récepteurs d'adhésion ou par les agonistes plaquettaires (Mangin et al. 2003; Yuan et al. 1999). Dans ces systèmes, on observe une activation des cellules, au cours de laquelle le cytosquelette est remodelé menant au changement de forme des cellules avec notamment l'émission de filopodes (Yuan et al. 1999).

6.5.2. La cascade d'activation dépendante de l'interaction GPIb-FW

L'agglutination des plaquettes ou leur agrégation dans un viscosimètre induit la phosphorylation sur tyrosine de diverses protéines, dont une protéine de 64 kDa non identifiée (Ozaki et al. 1995), de p125^{FAK} (Mekrache et al. 2003), p72^{syk} (Asazuma et al. 1997; Yanabu et al. 1997), et des protéines de la famille des src kinases comme p60^{c-src} (Jackson et al. 1994) et p54/58^{lyn} (Asazuma et al. 1997; Satoh et al. 2000). Au cours de l'activation, plusieurs protéines comme la PI3kinase, p60^{c-src} et lyn s'associent et se relocalisent au niveau du cytosquelette d'actine (Asazuma et al. 1997; Jackson et al. 1994; Satoh et al. 2000).

6.5.2.1. Signalisation déclenchée par une src kinase.

La signalisation dépendante de l'interaction GPIb-FW présente de nombreuses similitudes avec celle déclenchée par la GPVI. Des expériences d'immunoprécipitation dirigée contre la GPIb α ont mis en évidence l'association de GPIb et d'une tyrosine kinase non identifiée qui ferait partie de la famille des src kinases (**Asazuma et al. 1997**). Une étude de Wu et *al* a montré, lors de l'agglutination de plaquettes au FW induite par la botrocétine, la phosphorylation sur tyrosine de γ Rfc, de Syk, LAT et de la PLC γ_2 (**Wu et al. 2001b**). Une phosphorylation du récepteur Fc γ RIIA en réponse au FW et à la ristocétine a également été rapportée (**Torti et al. 1999**). L'utilisation d'un inhibiteur sélectif des src kinases (PP1) place ces enzymes en amont de cette voie de signalisation, puisque PP1 inhibe complètement cette cascade de phosphorylation (**Wu et al. 2001b**). Tout comme dans la signalisation du récepteur GPVI, Syk activée par les src kinases pourrait promouvoir la formation d'un complexe de signalisation menant à l'activation de la PLC γ_2 .

6.5.2.2. Rôle de γ Rfc et Fc γ RIIA.

Lors de l'agrégation de plaquettes au FW induite par la ristocétine ou la botrocétine, la phosphorylation sur tyrosine de γ Rfc et Fc γ RIIA, deux protéines contenant des motifs de signalisation ITAM, a été rapportée (**Canobbio et al. 2001; Wu et al. 2001b**). Wu et *al* montrent une coprécipitation de γ Rfc avec le complexe GPIb-V-IX pour des plaquettes lysées avec le Brij 35, suggérant un couplage fonctionnel entre ces deux protéines (**Wu et al. 2001b**). Des expériences de transfert d'énergie de fluorescence (FRET), une approche de double hybride, ainsi que l'inhibition de liaison de FW à la GPIb par l'anticorps IV.3, ont également suggéré une association physique et fonctionnelle avec le récepteur Fc γ RIIA, un récepteur aux fragments Fc des IgG (**Moore et al. 1978; Sullam et al. 1998; Sun et al. 1999**). La présence d'un changement de forme normal lors de l'adhésion des cellules CHO GPIb-IX, qui sont dépourvues de Fc γ RIIA, ou de plaquettes traitées par l'anticorps IV.3 remettent en cause un rôle de cette association dans la signalisation. D'autre part, une signalisation calcique et un changement de forme normaux ont été observés pour des plaquettes de souris KO pour γ Rfc mises à adhérer sur une surface recouverte par du FW ou sur du domaine A1 (**Kasirer-Friede et al. 2004; Mangin et al. 2003**). Ces résultats indiquent que γ Rfc et Fc γ RIIA ne sont pas essentiels à la transduction du signal déclenché par la GPIb.

6.5.2.3. Implication de la PLC γ 2.

Une implication de la PLC γ 2 est suggérée par sa phosphorylation dans des conditions d'agglutination en réponse au FW (**Canobbio et al. 2001; Mangin et al. 2003; Wu et al. 2001b**). Par comparaison à la phosphorylation en réponse à GPVI, l'intensité est nettement plus faible et concerne d'autres résidus tyrosine de PLC γ 2 (**Suzuki-Inoue et al. 2004**). Le rôle de la PLC γ 2 a été plus fermement établi par l'étude de plaquettes ou de cellules transfectées par le complexe GPIb-IX, traitées par un antagoniste spécifique des PLC (U73122) et de plaquettes de souris KO pour PLC γ 2. Dans toutes ces conditions, la signalisation calcique et le changement de forme sont nettement réduits lors de l'adhésion sur une matrice de FW (**Mangin et al. 2003**). Toutefois, cette inhibition n'est pas complète, suggérant la contribution d'une autre PLC γ , comme PLC γ 1 qui est également exprimée dans la plaquette. Une fois activée les PLC γ 2/1 vont cliver les phospholipides membranaires et générer de l'IP $_3$ et du DAG permettant respectivement la libération de calcium à partir des stocks internes et l'activation de la PKC.

6.5.2.4. Signaux calciques générés.

Des signaux calciques générés par l'interaction GPIb-FW peuvent être mesurés dans des systèmes d'adhésion en conditions statiques ou en présence de flux dans des conditions indépendantes des agonistes sécrétés ou de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Mangin et al. 2003; Yuan et al. 1999**). Cette signalisation est mesurée à l'aide de sondes calciques (Oregon Green 488 BAPTA-AM-1, Fura Red ou Fluo-3) par microscopie confocale à fluorescence. Les pics calciques sont transitoires et de faible amplitude mais permettent d'activer localement des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$. (**Mazzucato et al. 2002; Nesbitt et al. 2002; Yap et al. 2000**). Ces signaux de faible intensité (appelés signaux α,β) peuvent être observés en absence de calcium extracellulaire. Des signaux plus intenses et prolongés sont dus à un influx de calcium extracellulaire et sont sous le contrôle de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et de l'ADP sécrété (**Mazzucato et al. 2002; Nesbitt et al. 2002**).

6.5.2.5. La PI3kinase

Plusieurs travaux suggèrent également un rôle des PI3kinases dans la signalisation déclenchée par le complexe : *i*) la PI3kinase se relocalise dans le cytosquelette d'actine après activation au FW dans l'agrégomètre en présence de ristocétine en compagnie de p60^{c-src}, Lyn et du complexe GPIb-V-IX (**Jackson et al. 1994; Munday et al. 2000**) ; *ii*) dans ces mêmes conditions un complexe de signalisation a été observé comprenant la GPIb, la 14-3-3 ζ , la PI3kinase et p60^{c-src} (**Munday et al. 2000; Wu et al. 2003**). Cependant, des inhibiteurs de

PI3Kinase (Ly294002, wortmannin) n'empêchent pas la signalisation lors de l'adhésion au FW ou au domaine A1 (signaux calciques, émission de filopodes) (**Kasirer-Friede et al. 2004; Nesbitt et al. 2002; Yap et al. 2002; Yuan et al. 1999**). La PI3K serait donc plutôt impliquée dans l'activation et la signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui suit l'activation par la GPIb (**Kasirer-Friede et al. 2004; Nesbitt et al. 2002; Yap et al. 2002**).

6.5.2.6. Rôle de la PKG ?

Une élévation des taux de GMPc est classiquement décrite comme un mécanisme inhibiteur de l'activation plaquettaire. De manière surprenante, Li et al ont décrit une liaison de FW augmentée pour des cellules CHO exprimant le complexe GPIb-V-IX transfectées par une PKG recombinante, un étalement inhibé sur une surface de FW pour des souris KO pour la PKG et un effet potentialisateur d'analogie stable du GMPc sur l'agrégation au FW (**Li et al. 2003b**). Cette étude a été étendue à d'autres voies de signalisation (thrombine, TxA_2) et a montré une potentialisation de la sécrétion par le GMPc (**Li et al. 2004b**). Toutefois, une autre étude utilisant une approche similaire n'a pu confirmer le rôle activateur du GMPc pour la signalisation du complexe GPIb-V-IX (**Marshall et al. 2004**).

6.5.2.7. Oligomérisation du complexe GPIb-IV-IX et radeaux lipidiques.

Les multimères de FW permettent un recrutement plus efficace des plaquettes et une meilleure activation que les formes monomériques. Ces résultats suggèrent qu'une oligomérisation ou « clustering » du complexe GPIb-V-IX pourrait intervenir et faciliter la signalisation (**Andrews et al. 1989**). Un argument dans ce sens a été fourni avec des lignées CHO exprimant $\alpha_{IIb}\beta_3$ et un complexe GPIb-IX portant un motif de dimérisation FKBP au niveau du domaine intracellulaire de GPIX. L'oligomérisation de GPIb-IX confère aux cellules une capacité d'adhésion au FW augmentée en conditions statique et de flux, ainsi qu'une signalisation qui va phosphoryler Syk et activer l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Kasirer-Friede et al. 2002**). Ce mécanisme de multimérisation est utilisé par d'autres récepteurs plaquettaires pour des ligands macromoléculaires, comme la GPVI ou l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, qui une fois rassemblés déclenchent une signalisation. De manière similaire, le « clustering » du complexe GPIb-V-IX pourrait permettre de recruter les effecteurs moléculaires nécessaires à la transduction du signal.

Les radeaux lipidiques ou rafts sont des domaines membranaires enrichis en sphingolipides et saturés en phospholipides et en cholestérol. Ils sont présents dans les membranes de nombreux types cellulaires dont les plaquettes. Les GEMs (« glycolipids enriched microdomains »)

constituent une plateforme de signalisation d'où peuvent être sélectivement inclus ou exclus des effecteurs de signalisation (He et al. 2005). Les rafts sont impliqués dans l'activation des plaquettes au collagène. La GPVI et γ RFc sont colocalisés dans les rafts et leur destruction diminue l'activation GPVI-dépendante (Ezumi et al. 2002). Le complexe GPIb-V-IX a été identifié au sein de radeaux lipidiques, dans lesquels il pourrait être ciblé par les acylations de la GPIb β et de la GPIX. L'agglutination des plaquettes au FW induite par la ristocétine augmente la proportion de complexe GPIb-V-IX présent dans les radeaux lipidiques (de 8% à 50%) (Shrimpton et al. 2002). Cette relocalisation pourrait jouer un rôle dans l'adhésion plaquettaire au FW et dans la signalisation.

6.5.2.8. Variation des réponses en fonction des conditions expérimentales

Les réponses et les mécanismes décrits dans la littérature comme étant contrôlés par le complexe GPIb-V-IX sont nombreux et de natures variées. Certains travaux rapportent une forte activation déclenchée par ce récepteur (Canobbio et al. 2001; Falati et al. 1999; Torti et al. 1999), d'autres n'ont pas pu observer de signaux détectables (Kuwahara et al. 1999) et d'autres études concluent à l'existence de signaux faibles (Jackson et al. 1994; Kroll et al. 1991; Mazzucato et al. 2002; Nesbitt et al. 2002; Yuan et al. 1999).

Ces observations différentes découlent de l'utilisation de conditions expérimentales différentes qui compliquent la comparaison des résultats publiés et leur interprétation. Une première source de difficulté est la grande variété de ligands de la GPIb α utilisés pour étudier cette signalisation (FW humain, bovin, porcin, FW désialilé, FW recombinant ou de type IIb, protéines issues de venins de serpent (alboaggregin A)), ainsi que l'addition ou non d'inducteurs (botrocétine ou ristocétine). Deuxièmement, les différentes méthodes de préparation des plaquettes et leur origine (humaines et de souris) ou l'utilisation de différents systèmes cellulaires transfectés par le complexe (CHO et K562) peut être à l'origine de réponses contradictoires. Troisièmement, les différents systèmes utilisés *in vitro* (agrégométrie, SIPA, adhésion sur une surface en présence ou absence de flux) compliquent la comparaison des données (voir section 6.3). Quatrièmement, l'identification de signaux provenant directement du complexe GPIb-V-IX est compliquée par l'existence des boucles d'amplification de l'activation plaquettaire, dues aux agonistes sécrétés (ADP) et TXA₂ et à l'intervention d'autres récepteurs plaquettaires capables de lier le FW, notamment les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_V\beta_3$. Enfin, l'absence ou les taux faibles de calcium extracellulaire sont connus pour modifier la réactivité plaquettaire et potentialiser la sécrétion et la production de

TxA₂. Or, un nombre important d'études ont été réalisées dans ces conditions et font état de signalisation calcique ou d'activation de plaquettes via le complexe GPIb-V-IX, bloquées par des antagonistes des récepteurs à l'ADP, au TxA₂, ou de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Francesconi et al. 1995; Francesconi et al. 1993; Garcia et al. 2005; Kroll et al. 1991; Liu et al. 2006**). Les études de la signalisation GPIb-dépendante devraient donc veiller à maintenir des niveaux physiologiques de calcium extracellulaire et à contrôler les différentes voies d'auto-amplification de l'activation plaquettaire.

6.5.2.9. Synthèse sur la signalisation du complexe GPIb-V-IX

Ces réponses contradictoires compliquent l'établissement d'un modèle consensus de la signalisation déclenchée par le complexe GPIb-V-IX. Toutefois, une séquence qui semble maintenant admise est que l'interaction entre le GPIb-V-IX et FW mobilise une src kinase, la PLC γ_2 , IP₃ et aboutit à la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires. Cette signalisation va contribuer, par des mécanismes mal connus qui pourraient impliquer une PI3kinase, à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Figure 19**). De nombreuses zones d'ombre persistent: *i*) comment les signaux provenant de la liaison au FW sont-ils répercutés aux domaines intracellulaires du complexe ? *ii*) quels sont les effecteurs moléculaires proximaux qui vont permettre d'activer les src kinases ? *iii*) quelles sont les molécules impliquées dans l'activation de la PLC γ_2 ? *iv*) les signalisations GPVI et GPIb-dépendantes sont elles superposables ? *v*) quelle est la nature de la signalisation « inside-out » déclenchée par le complexe menant à l'activation de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$?

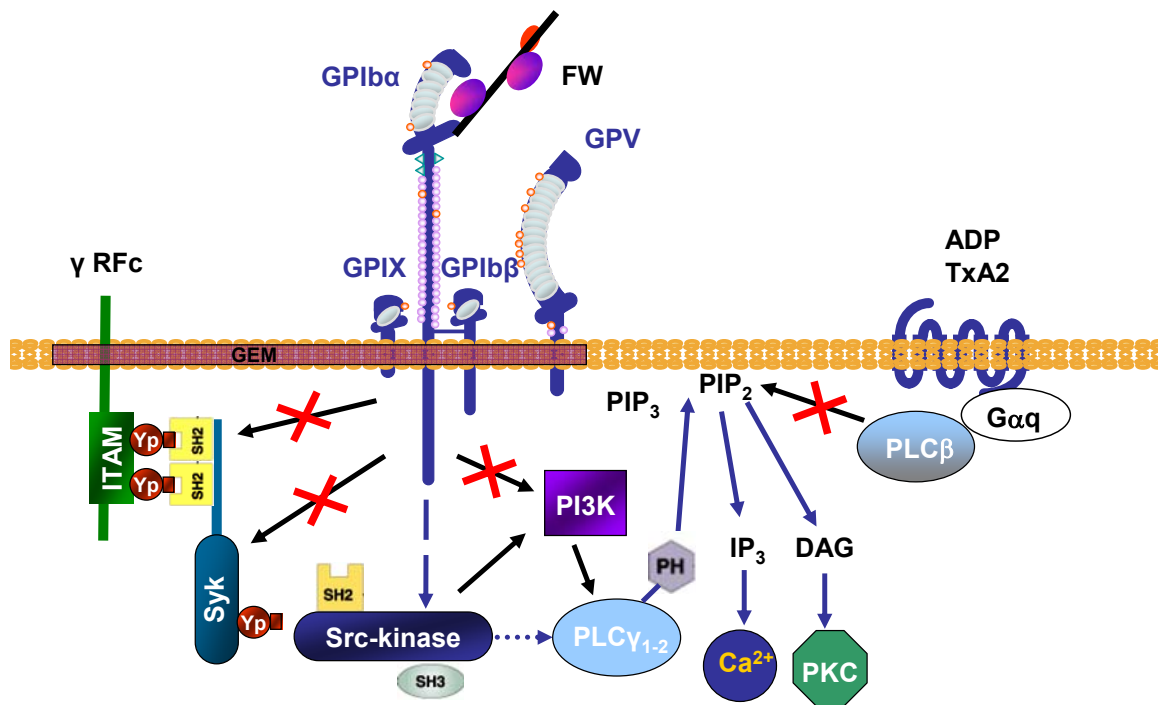


Figure 19: Mécanismes possibles de signalisation déclenchée par le complexe GPIb-V-IX. SH2 : src homology domain; PH : pleckstrin homology domain; Yp : tyrosine phosphorylée; γ RfC : chaîne gamma des récepteurs Fc; ITAM : Immune Tyrosine-containing Activation Motif; PLC : phospholipase C; PI3K : phosphoinositide 3-kinase; PIP₃ : phosphoinositide (3,4,5)-triphosphate; PIP₂ : phosphoinositide (3,4)-biphosphate; IP₃ : inositol (1,4,5)-triphosphate; DAG : diacyl glycérol; PKC : protein kinase C; GEM : glycosphingolipid-enriched microdomains. Les croix rouges indiquent que la signalisation du complexe GPIb-V-IX n'implique pas ces voies d'activation

6.5.3. Rôle des domaines intracellulaires du complexe GPIb-V-IX

Le complexe GPIb-V-IX n'est pas couplé aux protéines G hétérotrimériques, ne porte pas de motif de signalisation connu et on ne lui a pas trouvé d'activité enzymatique. La signalisation doit donc être relayée par des protéines capables d'interagir avec son domaine intracellulaire. A ce jour 6 protéines ont été décrites comme interagissant directement ou indirectement avec les portions cytoplasmiques du complexe GPIb-V-IX : la FLNA, la 14-3-3 ζ , la calmoduline, la sous-unité régulatrice p85 de la PI3kinase, SHIP-2 et l' α -actinine. Le mode d'association ainsi que les rôles respectifs de ces différentes protéines pour les fonctions du complexe seront abordés plus loin (chapitre 6.5.4).

Les études fonctionnelles des domaines intracellulaires du complexe reposent essentiellement sur l'utilisation de cellules transfectées (CHO ou K562), qui expriment un complexe portant des délétions ou des mutations au niveau de ses domaines intracellulaires. Un complexe GPIb-IX normal reconstitué dans ces cellules assure une adhésion efficace au FW en absence ou présence de flux (Yuan et al. 1999). Il déclenche une signalisation similaire à celle observée dans la plaquette menant au changement de forme avec émission de

filopodes et étalement sur le FW (**Mangin et al. 2004; Yuan et al. 1999**). Enfin, les interactions avec les partenaires intracellulaires connus (FLNA et 14-3-3) sont retrouvées dans ce modèle cellulaire (**Cranmer et al. 2005; Mangin et al. 2004**).

6.5.3.1. Rôle du domaine intracellulaire de la GPIb α

L'association du complexe avec la FLNA et donc au cytosquelette d'actine est probablement clef pour maintenir la forme des plaquettes (**Lopez et al. 1998**) et a été également impliquée dans les fonctions adhésives (voir chapitre 6.4.6). Une lignée CHO exprimant une GPIb α incapable d'interagir avec la FLNA (délétion de la zone 570-610) montre une adhésion et une émission de filopodes normales sur une matrice de FW (**Mistry et al. 2000**). D'autres études où la région 560-610 a été délétée décrivent un étalement augmenté des cellules sur le FW (**Cunningham et al. 1996**), suggérant un rôle dans la signalisation menant à l'activation des intégrines. Enfin, un peptide de la GPIb α comprenant le site de liaison à la FLNA associé à un peptide cargo perméant (PEP-1) a montré dans la plaquette intacte une agglutination à la ristocétine, une SIPA et une phosphorylation de différentes protéines de signalisation significativement diminuées (**Feng et al. 2003**). Ces résultats sont en faveur d'un rôle d'une association GPIb α avec la FLNA dans la signalisation du complexe GPIb-V-IX. Les conclusions sont à tempérer dans la mesure où les expériences sont réalisées dans des conditions où la sécrétion d'ADP ou la production de TXA₂ peuvent intervenir. Il est donc difficile de conclure à un effet spécifique sur la signalisation GPIb-dépendante.

La partie C-terminale de la GPIb α porte des motifs phosphorylés sur sérine (580-590 et 605-610) impliqués dans l'association à la 14-3-3 ζ (**Bodnar et al. 1999; Du et al. 1996; Mangin et al. 2004**). La délétion de ces sites dans des lignées cellulaires entraîne une perte de capacité à s'étaler sur une matrice de FW (**Gu et al. 1999; Mangin et al. 2004**), suggérant un rôle de ces domaines et des sérines qu'ils contiennent dans la signalisation tardive menant à l'activation des intégrines. L'analyse par microscopie à fluorescence a montré que ces sérines sont déphosphorylées après adhésion des plaquettes au FW, cette déphosphorylation pourrait entraîner une libération de la 14-3-3 ζ (**Bodnar et al. 1999; Mangin et al. 2004**). Cette dissociation a pu être visualisée après agrégation des plaquettes en présence de FW dans un viscosimètre (**Feng et al. 2000**). Une fois libérée, la 14-3-3 ζ participerait à la signalisation menant à l'activation des intégrines par un processus impliquant la PI3kinase (**Munday et al. 2000**). Une autre étude utilisant une approche comparable montre au contraire qu'une lignée

exprimant une GPIb α tronquée de la région 591-610 présente un étalement augmenté sur une surface recouverte de FW (**Bialkowska et al. 2003**). Ces auteurs suggèrent donc un modèle inverse où la portion C-terminale de la GPIb α exerce une régulation négative sur l'activation des intégrines par séquestration de la 14-3-3 ζ . Une des explications possibles pour ces observations différentes serait l'utilisation de lignées cellulaires différentes.

6.5.3.2. Rôle du domaine intracellulaire de la GPIb β

La sous-unité GPIb β porte une sérine en position 166, qui est phosphorylée par la PKA (**Wardell et al. 1989**). Cette Ser¹⁶⁶ phosphorylée contribue à la liaison efficace de la 14-3-3 ζ mais qui n'est pas indispensable (**Andrews et al. 1998; Calverley et al. 1998; Feng et al. 2000**). Son rôle pour les fonctions adhésives du complexe a été abordé dans la section 2.6.4.6. Un site de liaison à la calmoduline a également été identifié dans la partie juxtamembranaire de la GPIb β mais son implication pour les fonctions du complexe demeure inconnue (**Andrews et al. 2001**). A l'exception de l'association à la 14-3-3 ζ et à la calmoduline, il n'existe pas d'argument fonctionnel en faveur d'un rôle de la GPIb β dans l'activation déclenchée par le complexe GPIb-V-IX. Une exception est l'effet d'un peptide palmitoylé comprenant la portion 151-161 du domaine intracellulaire de la GPIb β montrant une inhibition de l'agrégation des plaquettes au FW, de leur adhésion sur une surface recouverte de FW, où en présence de flux il augmente la vitesse de roulement des plaquettes. Toutefois les effets de ce peptide ne sont pas restreints au FW, puisqu'il inhibe la réponse des plaquettes à divers agonistes (faibles doses de thrombine, collagène et à un analogue structural du TXA₂) (**Martin et al. 2003**). Il est donc difficile de conclure à un effet spécifique sur la voie GPIb-V-IX.

6.5.3.3. Rôle des domaines intracellulaires de la GPIX et de la GPV

Le rôle du très court domaine intracellulaire de la GPIX (6 acides aminés) n'est pour l'instant pas connu. De même le rôle des cystéines acylées de la GPIX et de la GPIb β n'a pas été étudié. Elles pourraient permettre la localisation du complexe dans les radeaux lipidiques.

Le domaine intracellulaire de la GPV, tout comme celui de la GPIb β , pourrait interagir avec la 14-3-3 ζ et la calmoduline (**Andrews et al. 1998; Andrews et al. 2001**). Les souris déficientes en GPV ne présentent pas de syndrome de Bernard-Soulier et leurs plaquettes adhèrent et s'activent normalement sur une matrice de FW, suggérant que la GPV et son domaine intracellulaire n'ont que peu ou pas d'influence dans la fonction de signalisation du complexe GPIb-IX (**Moog et al. 2001**).

6.5.4. Les partenaires intracellulaires du complexe GPIb-V-IX

6.5.4.1. La Filamine A (FLNA)

Les filamines sont des composants majeurs du cytosquelette d'actine. Cette famille de protéines est composée de trois membres : la FLNA et la FLNB sont distribuées dans tous les tissus, la FLNC se trouve uniquement dans les cellules musculaires striées squelettiques et cardiaques. Ces protéines sont organisées en homodimères associés par l'extrémité C-terminale. Chaque sous-unité (entre 240-280 kDa) contient au niveau de son extrémité N-terminale un motif de liaison à l'actine (ABD : actin binding domain) (**Lebart et al. 1994**). Pour la FLNA, ce domaine est suivi par 24 répétitions d'un motif de 96 acides aminés qui vont s'organiser en 7 feuillets β se recouvrant suivis d'une boucle. Entre les répétitions 15-16 et 23-24 se place une boucle contenant un site de clivage par la calpaïne et cette boucle confère de la flexibilité à la protéine (**Gorlin et al. 1990**) (**Figure 20A**). Les filamines se lient à l'actine et organisent le cytosquelette membranaire des plaquettes en branchant les filaments de manière orthogonale. En plus de leur association au réseau d'actine, ces protéines lient des récepteurs transmembranaires tels que les intégrines (**Calderwood et al. 2000**) ou le complexe GPIb-V-IX ainsi que des protéines de signalisation comme les Rho GTPases et RalA (**Ohta et al. 1999**). Ainsi elles sont responsables du bon ancrage des récepteurs au cytosquelette d'actine et servent de point de rencontre pour des protéines de signalisation. La FLNA peut être phosphorylée par diverses kinases comme la PKA, la PKC ou la calcium/calmodulin-dependent kinase II. Sa phosphorylation pourrait moduler son affinité pour l'actine ou protéger la protéine contre un clivage par la calpaïne (**van der Flier and Sonnenberg 2001b**). La mutation chez l'homme du gène codant pour la FLNA est à l'origine de l'hétérotopie nodulaire périventriculaire, qui est une malformation cérébrale. Un KO pour la FLNA a récemment été développé dans la lignée plaquettaire mais les résultats n'ont pas encore été publiés (**Falet et al, non publié**).

L'utilisation de peptides synthétiques du domaine intracellulaire de la GPIb α et de lignées cellulaires exprimant des délétions progressives de la GPIb α ont initialement identifié un site d'interaction pour la FLNA dans la zone 536-570 (**Andrews and Fox 1992; Cunningham et al. 1996**). Des lignées présentant des délétions plus courtes ont permis d'affiner la localisation du site de liaison dans les régions 557-568 et 569-579 (**Williamson et al. 2002**). Finalement, des expériences de liaison à la FLNA avec des peptides GPIb α mutés ainsi que la cristallisation du complexe FLNA-peptide GPIb α (557-577) ont identifié la zone 560-573 de la GPIb α et tout particulièrement les acides aminés Phe⁵⁶⁸ et Trp⁵⁷⁰ comme essentiels pour la liaison à la FLNA (**Cranmer et al. 2005; Nakamura et al. 2006**). L'étude cristallographique a également montré

que les résidus G¹⁸⁹⁷ et C¹⁹¹² des feuillettes β C et D de l'élément répété 17 de la FLNA sont importants pour la liaison à la GPIbα (Nakamura et al. 2006) (Figures 20B et 22).

Une perte d'association du complexe GPIb-V-IX à la FLNA a un impact sur les fonctions adhésives du complexe. Premièrement, cette protéine assure une adhésion efficace des cellules en présence de forces de cisaillement élevées (Williamson et al. 2002) (chapitre 6.4.6). Au contraire, une perte d'association à la FLNA n'empêche pas l'émission de filopodes sur une surface de FW (Mistry et al. 2000) et aurait même pour conséquence un étalement augmenté sur (Cunningham et al. 1996) (chapitre 6.5.3.1). Une autre fonction attribuée à cette interaction est le maintien de la forme des plaquettes. Les plaquettes de taille augmentée et de forme anormale des patients BS sont des arguments en faveur de ce rôle (Lopez et al. 1998). Cette hypothèse semble confirmée par l'étude de souris déficientes en GPIbα, dans lesquelles la réintroduction du domaine intracellulaire entraîne la récupération d'une taille quasi normale des plaquettes (Kanaji et al. 2002; Ware et al. 2000).

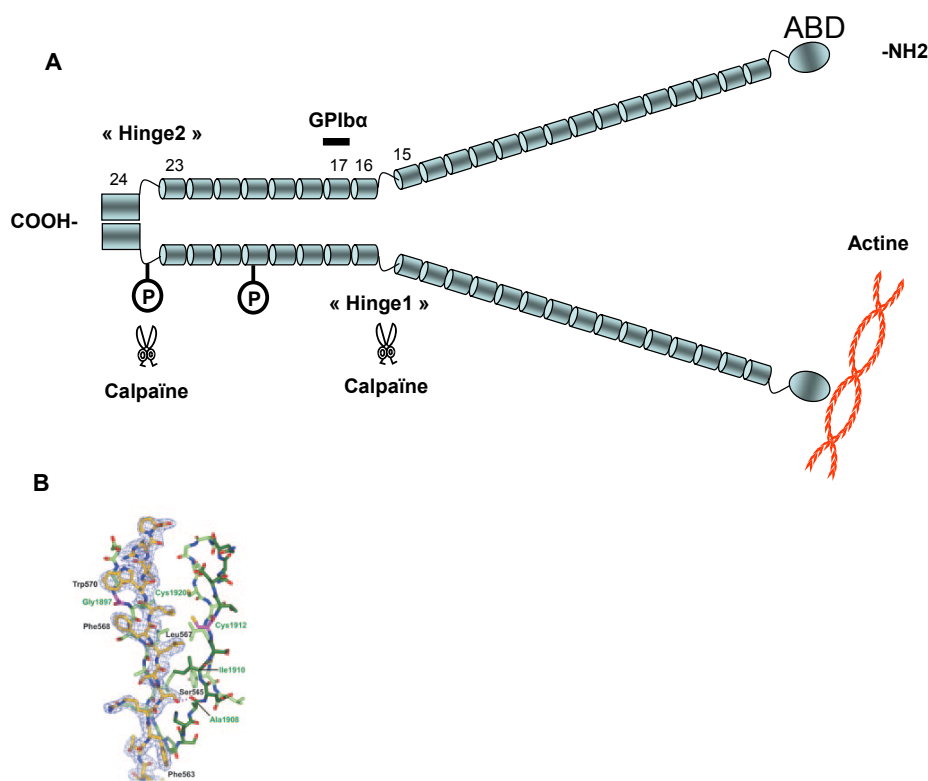


Figure 20: Représentation de la structure de la filamine A et de son interaction avec la GPIbα

(A) Structure schématique de la Filamine A. ABD: Actin Binding Domain; P: phosphorylation; Hinge: articulation

(B) Représentation détaillée de l'interaction entre le peptide 557-577 de la GPIbα et le feuillet C de la répétition 17 de la filamine A (D'après Nakamura et al, 2006)

6.5.4.2. *La 14-3-3ζ*

La 14-3-3ζ appartient à la famille des protéines 14-3-3 qui est exprimée dans toutes les cellules eucaryotes. Ces protéines ont une masse comprise entre 29 et 32 kDa et la plaquette exprime fortement les isoformes ζ, β, γ ainsi que des faibles niveaux d'isoforme ε et η (**Wheeler-Jones et al. 1996**). La structure cristallographique de la 14-3-3 a été résolue, et a permis d'établir que la 14-3-3 est constituée par un homo ou un hétérodimère. Chaque monomère est composé de 9 hélices α antiparallèles formant une large poche négativement chargée permettant son association au ligand (**Liu et al. 1995**) (**Figure 21**). Les 14-3-3 interagissent avec un grand nombre de protéines de signalisation cytoplasmiques et nucléaires comme c-Raf, la PKC, p130^{Cas}, BAD, la PI3kinase, Cdc25 et Wee1 (**Aitken 2006**). La majorité des protéines qui s'associent à la 14-3-3 portent les motifs consensus (Arg-Ser-X-pSer-X-Pro, Arg-X-(Tyr/Phe)-X-pSer-X-Pro ou Arg-X-Ser-X-pSer/pThr-X-Pro) initialement trouvés dans la séquence de c-Raf (**Muslin et al. 1996**).

La copurification par chromatographie d'affinité a révélé l'association de la GPIbα à la 14-3-3ζ (**Du et al. 1996**). L'utilisation de CHO transfectées par une GPIbα comportant des délétions progressives de son domaine intracellulaire a permis de délimiter un site d'interaction dans la région 605-610. Cette séquence (⁶⁰⁵Ser-Gly-His-Ser-Leu⁶¹⁰) présente des analogies avec les motifs consensus décrits plus haut. La GPIbα est majoritairement phosphorylée au niveau de la Ser⁶⁰⁹ dans les plaquettes au repos et cette phosphorylation est requise pour l'interaction avec la 14-3-3ζ (**Bodnar et al. 1999**). Ultérieurement, l'étude de formes mutées a permis d'identifier un second site d'interaction dans la zone 580-590 et montré l'importance de la Ser⁵⁹⁰ (**Mangin et al. 2004**). Une interaction de la 14-3-3ζ avec la GPIbβ et la GPV, a également été proposée sur la base d'une liaison de peptides synthétiques (**Andrews et al. 1998**), observations confortées par des expériences en système double-hybride. Lors de cette étude, un renforcement de l'association de la GPIbα à la 14-3-3ζ par la Ser¹⁶⁶ phosphorylable par la PKA a été mis en évidence (**Calverley et al. 1998; Wardell et al. 1989**) (**Figure 22**). Un site de liaison sur la 14-3-3ζ pour GPIbα été localisé au niveau de l'hélice I C-terminale (résidus 202 à 231). Ce site est distinct de ceux impliqués dans la liaison d'autres partenaires comme c-Raf qui est situé dans l'hélice G (**Gu and Du 1998**) (**Figure 21**).

Une perte d'association entre la GPIbα et la 14-3-3ζ dans des cellules CHO transfectées inhibe fortement l'étalement sur une surface de FW (**Gu et al. 1999; Mangin et al. 2004**) (voir section 6.5.3.1). Ces résultats suggèrent donc un rôle de cette zone et de la 14-3-3ζ dans l'activation des intégrines par un mécanisme de libération de la 14-3-3ζ suite à la

déphosphorylation de GPIb α (Bodnar et al. 1999; Feng et al. 2000; Mangin et al. 2004). L'activation via la 14-3-3 ζ pourrait faire intervenir la PI3Kinase, qui formerait un complexe ternaire avec la 14-3-3 ζ et le GPIb (Munday et al. 2000). Cependant une autre étude a rapporté une observation contraire, où les cellules avec un GPIb incapable d'interagir avec 14-3-3 ζ montrent un étalement augmenté (Bialkowska et al. 2003) (voir section 6.5.3.1). Le rôle de la 14-3-3 ζ dans la fonction d'adhésion du complexe GPIb-V-IX a été discuté dans le chapitre 6.4.6.

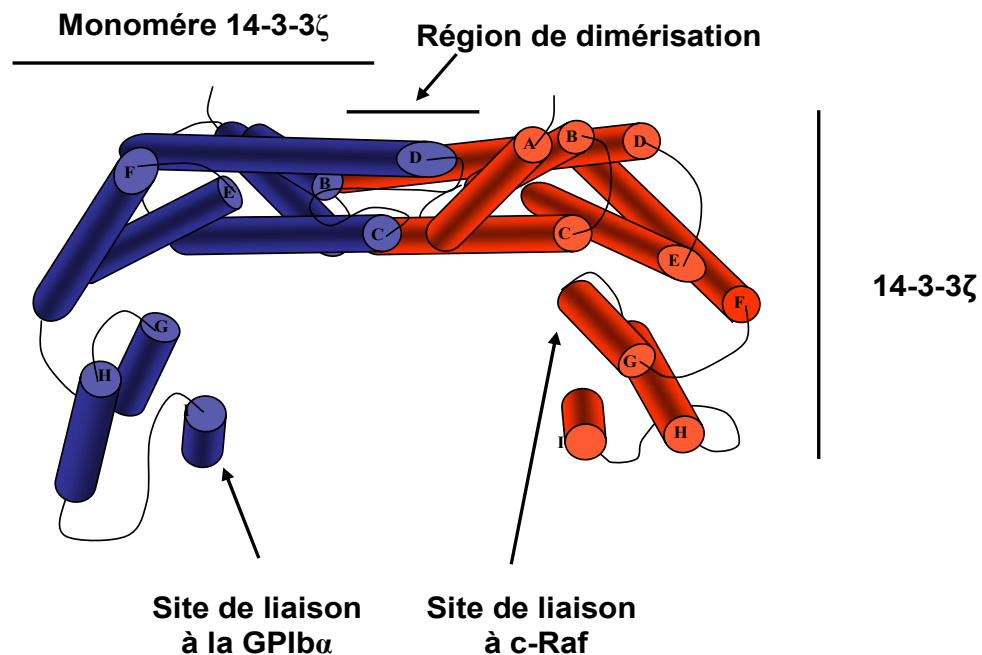


Figure 21: Schéma de la structure cristallographique de la 14-3-3 ζ . Les cylindres marqués par des lettres de A à I représentent les 9 hélices α antiparallèles qui constituent la structure d'un monomère de 14-3-3 ζ (29 kDa). L'homodimérisation se fait par la région N-terminale, et laisse apparaître un large canal amphipatique qui contient des sites de liaison. Le site de liaison à la GPIb α se trouve au niveau de l'hélice I. Le site de liaison à Raf-1 se trouve au niveau de l'hélice G. (Selon Liu et al, 1995)

6.5.4.3. *La calmoduline*

La calmoduline est une calciprotéine de 18 kDa très conservée et présente dans tous les organismes eucaryotes. Elle contrôle de nombreux processus biologiques comme la croissance, la prolifération ou la migration cellulaire. Elle est constituée de quatre domaines structuraux « EF-Hand », capables de lier le calcium entraînant un changement de conformation lui permettant d'assurer le relai vers une réponse cellulaire (Chin and Means 2000). Dans les plaquettes, la calmoduline joue un rôle important dans le changement de forme en réponse aux agonistes, en activant la MLCK, après liaison du calcium libéré par les

stocks internes (**Dandona et al. 1996; Paul et al. 1999**). Une association entre le complexe GPIb-V-IX et la calmoduline a été rapportée (**Andrews et al. 2001**). Une analyse des séquences primaires des domaines intracellulaires de la GPIb β et de la GPV a révélé la présence de sites consensus d'association à la calmoduline. Ces observations ont été validées par des expériences d'immunoprécipitation en présence de peptides synthétiques qui impliquent la zone Arg¹⁴⁹-Leu¹⁶⁷ de la GPIb β et toute la partie cytoplasmique de la GPV (Lys⁵²⁹-Gly⁵⁴⁴) (**Figure 22**). A ce jour il n'existe pas de données expérimentales fiables impliquant la calmoduline dans les fonctions du complexe GPIb-V-IX.

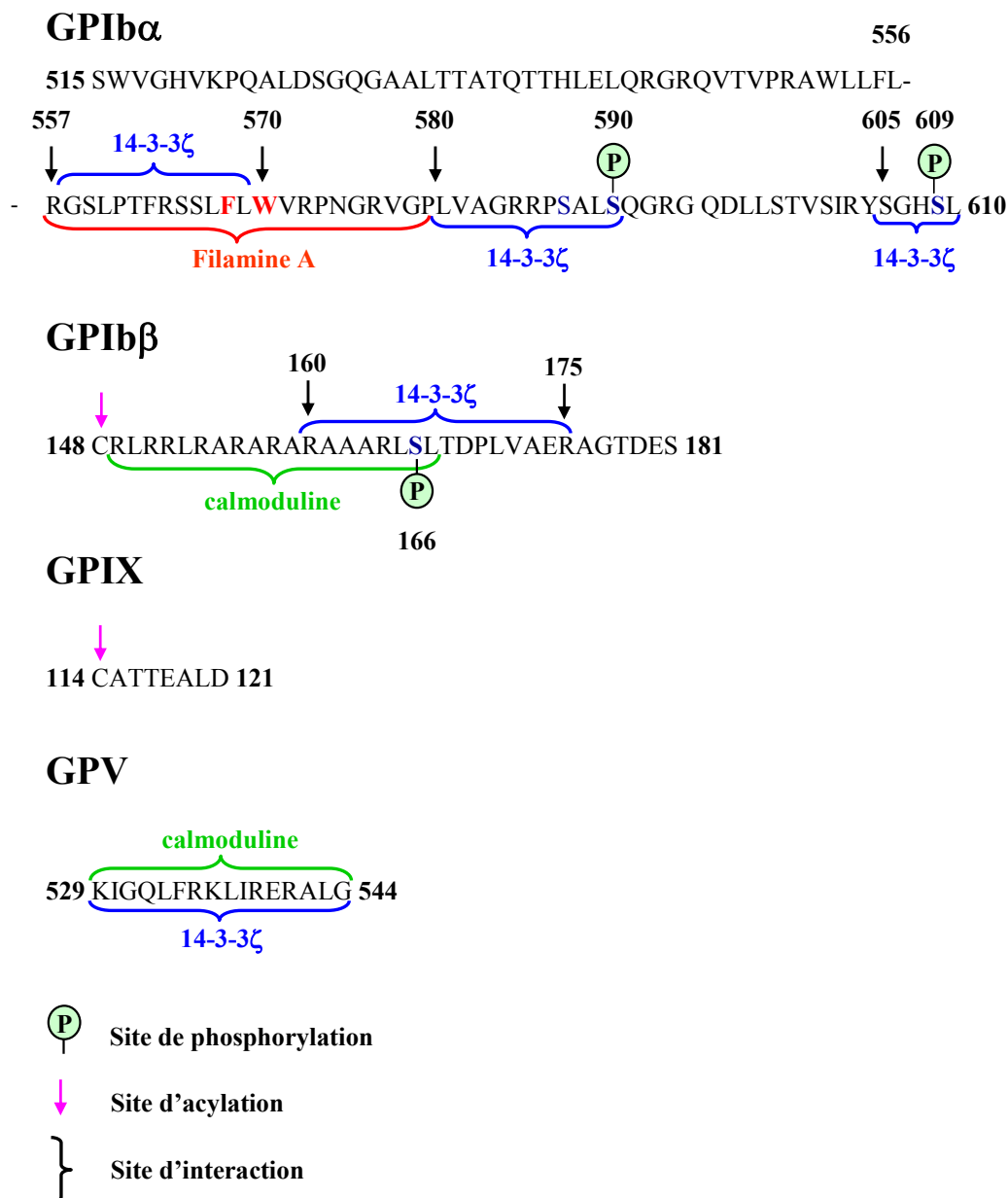


Figure 22: Séquences peptidiques des domaines intracellulaires du complexe GPIb-V-IX et sites de liaison aux partenaires intracellulaires

6.5.4.4. La PI3Kinase

Le rôle d'une PI3Kinase pour l'activation dépendante du complexe GPIb-V-IX a été décrit dans le chapitre 2.6.5.2.5. Une étude a montré la co-migration dans le cytosquelette d'actine de la GPIb, de la 14-3-3 ζ et de la PI3kinase après activation des plaquettes à la thrombine ou au FW. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que la sous-unité p85 de la PI3Kinase était liée indirectement au complexe GPIb-V-IX via la 14-3-3 ζ . Ce complexe se dissocie après activation des plaquettes à la thrombine ou au FW (**Munday et al. 2000**). Une analyse de la séquence peptidique de la sous-unité p85 a montré la présence du motif consensus d'association à la 14-3-3 ζ (Arg-Ser-X_pSer-X-Pro). Ces résultats indiquent que la 14-3-3 ζ pourrait séquestrer la PI3Kinase dans la plaquette au repos. Après activation, ce complexe co-migre vers le cytosquelette d'actine et s'y dissocie. La PI3kinase relocalisée et libérée va pouvoir participer à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et à sa signalisation « outside-in » (**Kasirer-Friede et al. 2004; Nesbitt et al. 2002; Yap et al. 2002**).

6.5.4.5. SHIP-2

La SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP-2) hydrolyse en position 5 le groupement phosphate du PI(3,4,5)P₃ pour former du PI(3,4)P₂. Cette enzyme de 148 kDa se localise aux bords des cellules où elle contrôlerait négativement les mécanismes de réarrangement du cytosquelette d'actine et la formation de lamellipodes (**Dyson et al. 2001**). Cette protéine ubiquitaire contient un domaine SH2 (pour Src homology domain 2), un domaine central portant l'activité phosphatase et un domaine riche en proline en position C-terminale (**Ishihara et al. 1999**). Dans les cellules COS-7, SHIP-2 se localise à la membrane grâce à son interaction avec la FLNA (**Dyson et al. 2001**).

SHIP-2 est indirectement associée au complexe GPIb-V-IX via son interaction avec la FLNA. Après activation à la thrombine ou au FW, le complexe FLNA-SHIP-2 se relocalise au niveau du cytosquelette d'actine et se redistribue dans des compartiments cellulaires différents de ceux où se trouve le complexe GPIb-V-IX (**Dyson et al. 2003**). Cette étude ne présente pas de données montrant un rôle de cette enzyme pour les fonctions du complexe, mais avance l'hypothèse d'une régulation de l'activation plaquettaire par SHIP-2 en dégradant les produits de la PI3kinase qui est elle-même associée au complexe GPIb-V-IX via la 14-3-3 ζ .

6.5.4.6. L' α -actinine.

L' α -actinine est une protéine de 100 kDa qui intervient dans le branchement des filaments d'actine du cytosquelette sous membranaire. Cette protéine forme des homodimères s'associant à l'actine F et vient renforcer le réseau d'actine. Des expériences de co-immunoprécipitation ont mis en évidence une association de l' α -actinine au complexe GPIb-V-IX dans des plaquettes mises à agréger dans un viscosimètre. Cette association est dépendante des forces appliquées et augmente au cours du temps. La co-précipitation de l' α -actinine nécessite sa phosphorylation par une voie d'activation contrôlée par la tyrosine kinase Syk. Un rôle proposé pour l' α -actinine serait de servir au cours de l'activation GPIb-dépendante de protéine adaptatrice qui recruterait des protéines de signalisation comme la PI3Kinase et la protéine kinase N (Feng et al. 2002).

6.5.5. Les récepteurs associés au complexe GPIb-V-IX.

Les associations entre GPIb-V-IX et le récepteur aux immunoglobulines Fc γ RIIA et la chaîne γ des récepteurs Fc γ Rfc ont été abordées dans la section 6.5.2.2. D'autre part, il a été rapporté qu'un traitement par SZ2 un anticorps dirigé contre la GPIb α ou le clivage de la GPIb α par la mocarhagine inhibent l'agrégation des plaquettes en réponse au peptide CRP. Ces observations suggèrent un couplage physique ou fonctionnel entre la GPVI et le complexe GPIb-V-IX. Une association a été montrée par des expériences de co-immunoprécipitation, une interaction insensible aux agents dépolymérisant de l'actine F ou désorganisant les radeaux lipidiques et qui interviendrait via les domaines extracellulaires de GPVI et de GPIb α (Arthur et al. 2005). Les auteurs proposent que ces deux récepteurs agissent en synergie expliquant que ces deux récepteurs empruntent des voies de signalisation similaires.

6.6. Importance du complexe GPIb-V-IX dans l'hémostase et la thrombose

6.6.1. Maladie de Willebrand et Syndrome de Bernard-Soulier

Deux pathologies hémorragiques illustrent l'importance de l'interaction entre le complexe GPIb-V-IX et le FW sous endothélial pour l'hémostase. La maladie de Willebrand qui est le

désordre hémorragique le plus fréquemment rencontré, est la conséquence d'un défaut qualitatif ou quantitatif de FW. Les patients atteints par la forme sévère (type 3), présentent des saignements graves dus à l'absence combinée du FW et du facteur VIII, entraînant un double défaut de l'hémostase primaire et de la coagulation (**Sadler 1998**). Le syndrome de Bernard-Soulier, est du à l'anomalie ou à l'absence du complexe GPIb-V-IX. Cette maladie héréditaire rare se traduit par une augmentation du temps de saignement, des plaquettes géantes et une thrombopénie, qui entraînent l'apparition spontanée d'hémorragies nasales, gingivales et gastro-intestinales (**Lopez et al. 1998**).

6.6.2. Rôle dans la thrombose

L'utilisation d'anticorps, de peptides synthétiques ou le clivage de la GPIb α ont mis en évidence un rôle essentiel de l'axe GPIb-FW pour l'adhésion des plaquettes et la formation de thrombi (**Deckmyn et al. 2005**).

Les premiers arguments *in vivo* pour un rôle du complexe dans la thrombose viennent de l'étude de porcs présentant une maladie de Willebrand de type 3. Ces derniers présentent un défaut d'adhésion et d'activation des plaquettes dans un modèle de lésion d'une artère coronaire (**Reddick et al. 1982**). La même observation a été effectuée plus récemment dans un modèle de thrombose artérielle dans des souris génétiquement manipulées déficientes en FW (**Denis et al. 1998**).

L'étude de modèles murins reproduisant le syndrome de Bernard et Soulier a également permis d'impliquer le complexe GPIb-V-IX dans le développement d'une thrombose. Des souris invalidées pour le gène de la GPIb α et exprimant un transgène humain incapable de lier le FW ont été étudiées dans un modèle de thrombose carotidienne induite par du chlorure de fer. Dans ce système, ces souris montrent une thrombose nettement diminuée par rapport aux souris normales mais aussi aux souris KO pour la GPVI. Ces résultats indiquent que le ciblage de l'axe GPIb-V-IX pourrait avoir un effet antithrombotique supérieur à l'inhibition de la voie GPVI (**Konstantinides et al. 2006**). Des résultats similaires ont été obtenus avec des souris KO pour le gène de la GPIb β . Ces souris présentent dans un système d'adhésion en flux sur collagène une formation de thrombus abolie à 3000 s⁻¹ et fortement inhibée à 1500 s⁻¹. Dans un modèle de thrombose artérielle induite par un laser ou induite au chlorure de fer, ces souris présentent une thrombose fortement diminuée (**Strassel et al, 2006, soumis à ATVB**).

6.6.3. Ciblage pharmacologique de la voie GPIb α /FW

Les médicaments anti-plaquettaires (anti $\alpha_{IIb}\beta_3$, clopidogrel, aspirine) prennent une place croissante dans le traitement et la prévention des thromboses artérielles. Pour l'instant, il n'existe pas de médicament ciblant spécifiquement la voie GPIb-V-IX. La complexité du mode d'interaction entre le FW et la GPIb α et de l'analyse des réponses plaquettaires (chapitre 6.4) ont probablement retardé la mise en place de programmes de criblage pharmacologique. De plus, contrairement aux travaux sur l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, les quelques recherches basées sur les peptides dérivés du FW ou de venins de serpent, n'ont pas permis d'identifier de molécule de petite taille pouvant servir de point de départ pour un programme de synthèse chimique. Finalement, l'effet profondément thrombopéniant après injection à l'animal d'anticorps dirigés contre la GPIb α a probablement constitué un frein au développement de ces médicaments. Un certain nombre d'inhibiteurs dirigés contre l'axe GPIb/FW ont cependant été évalués *in vitro* et dans les modèles animaux (**Bonnefoy et al. 2003**).

6.6.3.1. Les antagonistes de la GPIb α

Des fragments du FW (domaine A1, VCL) ont été évalués dans plusieurs modèles animaux, montrant une efficacité antithrombotique sans que le temps de saignement soit affecté (**Azzam et al. 1996; McGhie et al. 1994; Yao et al. 1994**). Ce fragment de haut poids moléculaire présente une faible stabilité et un coût élevé de production. L'utilisation chez le babouin, de Fab de l'anticorps bloquant 6B4 dirigé contre la GPIb α présente des propriétés antithrombotiques sans affecter le temps de saignement ni induire de thrombopénie (**Cauwenberghs et al. 2000**). La crotaline, une protéase extraite d'un venin de serpent, clive la GPIb α et possède des propriétés anti-thrombotiques dans un modèle de thrombose mésentérique dans la souris mais entraîne une augmentation du temps de saignement (**Chang et al. 1998; Wu et al. 2001a**).

6.6.3.2. Les antagonistes du FW

L'acide aurintricarboxylique montre des propriétés anti-thrombotiques chez le cochon d'inde et augmente le temps de saignement (**Azzam et al. 1996; Ito et al. 1999; Yamamoto et al. 1998**). Cependant cette molécule n'affecte pas que la voie GPIb α /FW et peut entraîner une potentialisation de l'agrégation des plaquettes, notamment au collagène et à l'ionophore A23187 (**Kinlough-Rathbone and Packham 1992**). L'anticorps AJvW-2 dirigé contre le FW et qui bloque la liaison de la GPIb α , a montré des propriétés antithrombotiques sans augmentation du temps de saignement dans différents modèles animaux (**Kageyama et al. 1997; Poletti et al.**

1997; Yamamoto et al. 1998). Enfin, un effet antithrombotique de l'anticorps monoclonal 82D6A3 dirigé contre le site de liaison du FW au collagène a pu être observé dans un modèle de thrombose de Folts chez le babouin sans effet sur le temps de saignement et le compte plaquettaire (**Wu et al. 2002**).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Cartographie fonctionnelle des domaines intracellulaires de la GPIb α et de la GPIb β .

Utilisation de peptides perméants pour l'étude fonctionnelle du domaine intracytoplasmique de la sous-unité GPIb α du complexe GPIb-V-IX.

Introduction

Publication n°1 :

“ Inhibition of adhesive and signalling functions of the platelet GPIb-V-IX complex by a cell penetrating GPIb α peptide.”

Conclusion

Rôles du domaine intracellulaire de la sous-unité GPIb β dans les fonctions d'adhésion et de signalisation du complexe GPIb-V-IX.

Introduction

Publication n°2 :

“Role of the GPIb β intracellular domain for von Willebrand Factor induced-GPIb signalling leading to platelet filopodia emission.”

Conclusion

Identification de la cyclophiline A comme nouveau partenaire du complexe GPIb-V-IX.

Introduction

Publication n°3 :

“Identification of Cyclophilin A as a new intracellular partner of the platelet GPIb-V-IX complex.”

Conclusion

Cartographie fonctionnelle des domaines intracellulaires des sous-unités GPIb α et GPIb β

Utilisation de peptides perméants pour l'étude fonctionnelle du domaine intracytoplasmique de la sous-unité GPIb α du complexe GPIb-V-IX.

Publication n°1 :

“ Inhibition of adhesive and signalling functions of the platelet GPIb-V-IX complex by a cell penetrating GPIb α peptide.”

Tovo David, Philippe Ohlmann, Anita Eckly, Sylvie Moog, Jean-Pierre Cazenave, Christian Gachet, François Lanza.

Accepté dans le Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2006, sous presse.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SICD – Service des thèses électroniques]

Inhibition of adhesive and signaling functions of the platelet GPIb-V-IX complex by a cell penetrating GPIb α peptide

T . DAVID, P . OHLMANN, A. ECKLY, S . MOOG, J . - P . CAZENAVE, C. GACHET et F . LANZA

Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2006, Vol. 4, Pages 2645–2655

Pages 2645 à 2655 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Introduction

Lors d'une brèche vasculaire et en conditions de flux élevé, la liaison du FW au complexe GPIb-V-IX assure l'adhésion des plaquettes aux sous-endothélium exposé. L'interaction GPIb-FW déclenche une signalisation encore mal caractérisée, qui implique une src kinase et la PLC γ_2 . Cette dernière en produisant de l'IP $_3$ conduit à la libération de calcium des stocks internes, menant au remaniement du cytosquelette d'actine nécessaire au changement de forme des cellules. Les plaquettes passent d'une forme discoïde à ronde et émettent des filopodes. Cette signalisation va également contribuer à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ nécessaire à l'adhésion stable et l'agrégation des plaquettes. Plusieurs travaux basés sur l'étude de cellules transfectées exprimant un complexe GPIb-IX muté au niveau de ses domaines intracellulaires ont montré une régulation des propriétés adhésives et de signalisation du complexe par ses parties cytoplasmiques (voir chapitres 2.6.4.5 et 2.6.5.3). Ces observations n'ont pu être directement transposées à la plaquette. Ces cellules sont anucléées et ne présentent qu'une très faible activité transcriptionnelle, les plaquettes s'avèrent donc difficiles à manipuler génétiquement. De plus, la petite taille des plaquettes (~2 μm de diamètre) et leur promptitude à s'activer lorsqu'elles sont manipulées font de la microinjection ou de la perméabilisation par des détergents des options difficilement envisageables.

Notre objectif a été d'étudier les rôles du domaine intracellulaire de la sous unité GPIb α pour les fonctions du complexe dans la plaquette intacte. Pour cela 4 portions de ce domaine correspondant aux sites d'interaction pour deux des partenaires connus, la FLNA et la 14-3-3 ζ , ont été couplées à un motif peptidique leur permettant de traverser la membrane plasmique.

Des approches similaires ont été utilisées précédemment pour étudier les fonctions des domaines intracellulaires de différents récepteurs plaquettaire comme les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_2\beta_1$, les récepteurs PAR1 et PAR4, et également le complexe GPIb-V-IX (**Covic et al. 2002; Dai et al. 2005; Feng et al. 2003; Martin et al. 2003; Stephens et al. 1998; Wang et al. 2003**). Un peptide de la GPIb α comprenant le site de liaison à la FLNA (557-575) associé à un peptide cargo perméant (PEP-1) a montré dans la plaquette intacte une agglutination à la ristocétine et une SIPA significativement diminuées, et une phosphorylation diminuée de différentes protéines de signalisation (**Feng et al. 2003**). Ce travail désigne la région 557-575 comme un nouveau domaine fonctionnel impliqué dans les fonctions d'adhésion et

d'activation du complexe GPIb-V-IX. Dans une seconde étude, le domaine 602-610 de la GPIb α correspondant à un des sites d'interaction pour la 14-3-3 ζ a été couplé à un groupement palmitoylé. Ce peptide inhibe l'agglutination des plaquettes au FW et la liaison de FW aux plaquettes et cellules transfectée par le complexe GPIb-IX (**Dai et al. 2005**). Cette étude indique un rôle de la 14-3-3 ζ dans la régulation des fonctions adhésives du complexe. Dans un dernier travail, un peptide palmitoylé comprenant la portion 151-161 du domaine intracellulaire de la GPIb β a montré une inhibition de l'agglutination des plaquettes au FW, de leur adhésion sur une surface recouverte de FW, où en présence de flux il augmente la vitesse de roulement des plaquettes. Toutefois les effets de ce peptide ne sont pas restreints au FW, puisqu'il inhibe également l'activation en réponse à plusieurs agonistes (faibles doses de thrombine, collagène et analogue du TXA₂) (**Martin et al. 2003**), mettant en doute un effet spécifique sur la voie GPIb-V-IX. Pour ce travail, nous avons opté pour un motif perméant composé de neuf arginines et dérivé du domaine basique de la protéine Tat du virus HIV-1, directement couplé aux peptides GPIb α (**Mann and Frankel 1991; Wender et al. 2000**). Le mécanisme d'action de ce motif perméant reste encore mal déterminé. Il a été proposé que l'entrée des peptides fait intervenir une liaison aux héparans sulfates (glycosaminoglycannes) présents à la surface des cellules (**Suzuki et al. 2002**). Puis l'internalisation pourrait se faire par un processus actif d'endocytose (**Richard et al. 2003**).

Les conséquences de l'entrée de ces peptides dans la plaquette ont été analysées sur les propriétés d'adhésion et d'activation dépendantes du complexe GPIb-V-IX. Des expériences d'agglutination induite par le FW bovin ont été conduites en présence de ces différents peptides. Puis l'effet des peptides a été étudié sur l'adhésion des plaquettes sur une surface recouverte de FW. Ce système, plus proche des conditions trouvées dans un vaisseau, permet d'apprécier à la fois l'interaction au FW et l'activation déclenchée par cette interaction (émission de filopodes). Ce travail a permis d'identifier un domaine fonctionnel potentiel au sein de la GPIb α (557-569) contrôlant à la fois les propriétés adhésives et de signalisation.

Conclusion

Le principal résultat de cette étude est l'identification d'un domaine fonctionnel au sein de la GPIb α (R⁵⁵⁷-L⁵⁶⁹) impliqué dans la régulation des propriétés adhésives et de signalisation du complexe GPIb-V-IX. Des plaquettes traitées par le peptide R9 α 557, qui comprend ce domaine, montrent une adhésion et une émission de filopodes significativement diminuées sur une matrice de FW. De la même façon, des cellules CHO transfectées par le complexe GPIb-IX, incubées avec R9 α 557, ont une adhésion diminuée et une émission de filopodes complètement abolie sur une matrice de FW.

Une majorité d'études sur le rôle des domaines intracellulaires du complexe GPIb-V-IX s'est appuyé sur l'utilisation de cellules transfectées comprenant un récepteur muté. Ces travaux ont permis d'identifier dans la GPIb α des zones contrôlant les propriétés adhésives du complexe (voir section 2.6.4.5) ou des régions permettant l'association à la 14-3-3 ζ , qui est impliquée dans la signalisation tardive du complexe menant à l'activation des intégrines (voir section 2.6.5.3.1). L'aspect novateur de ce travail est d'avoir permis l'identification d'un domaine fonctionnel dans la plaquette intacte.

Le peptide identifié se situe dans la zone et comprend des résidus impliqués dans l'interaction de la GPIb α avec la FLNA (**Williamson et al. 2002**). Ces résultats suggèrent donc un rôle de la FLNA dans l'adhésion et l'activation GPIb-dépendante. Toutefois, un des résidus important pour la liaison de la FLNA (Trp⁵⁷⁰) est absent de ce peptide (**Cranmer et al. 2005; Nakamura et al. 2006**). De plus, le peptide R9 α 569 qui suit directement R9 α 557 et qui contient la Trp⁵⁷⁰ n'a aucun effet sur l'adhésion et l'activation au FW. Enfin, des expériences d'immunoprécipitation de la GPIb α à partir de lysat plaquettaires en présence d'un excès de peptide R9 α 557 montrent une coprécipitation normale de la FLNA. L'ensemble de ces données indiquent que le peptide agit vraisemblablement en interagissant/interférant avec une autre protéine que la FLNA, qui reste à identifier.

Parmi les mécanismes d'action envisageables, le peptide pourrait donc interagir avec une protéine effectrice contrôlant les propriétés d'adhésion et de signalisation, mais une seconde possibilité serait une action directe ou indirecte avec une des autres sous unités du complexe comme la GPIb β ou la GPIX.

L'analyse par cytométrie en flux et par microscopie confocale à fluorescence ont permis d'établir une internalisation efficace des peptides dans la plaquette par l'addition du motif poly-arginine. Cependant, ce travail a également mis à jour une des limitations d'une telle approche car ce type de peptides peut par lui-même modifier l'état d'activation des plaquettes.

En effet, l'ajout du peptide R9 α 557 à une suspension plaquettaire a montré une légère activation des plaquettes, se traduisant par un changement de forme dans et des réponses diminuées à l'ADP ou au collagène, vraisemblablement liées à une désensibilisation à l'ADP. Cette activation par pourrait contribuer à l'inhibition de l'agglutination des plaquettes en présence de FW. Malgré tout, l'effet inhibiteur du peptide R9 α 557 sur l'adhésion et l'activation des plaquettes au FW immobilisé est indépendant de l'ADP produit puisqu'il est observé en présence d'apyrase ou d'antagonistes des récepteurs à l'ADP. Cependant, ce travail indique que les études utilisant des motifs perméants doivent toujours prendre en considération leur potentiel activateur.

En conclusion, ce travail a mis en évidence l'importance du domaine 557-569 pour l'activation dépendante du complexe GPIIb-V-IX. Toutefois le mode d'action exact du peptide R9 α 557 dans la plaquette n'est pas déterminé. Ce travail a écarté un rôle de la FLNA mais il reste à identifier la cible de ce domaine.

Rôle du domaine intracellulaire de la sous-unité GPIIb/IIIa dans les fonctions d'adhésion et de signalisation du complexe GPIIb/IIIa-V-IX.

Publication n°2 :

“Role of the GPIIb/IIIa intracellular domain for von Willebrand Factor induced-GPIIb/IIIa signalling leading to platelet filopodia emission.”

Tovo David, Catherine Strassel, Anita Eckly, Jean-Pierre Cazenave, Christian Gachet and François Lanza

En préparation

Introduction

Le travail précédent a mis en évidence, dans la plaquette intacte, un rôle du domaine intracellulaire de la GPIb α pour la signalisation du complexe GPIb-V-IX menant à l'émission de filopodes. Cette étude s'est appuyée sur une approche de couplage de portions intracellulaires de la GPIb α à un peptide perméant. Une alternative à cette stratégie est l'utilisation de cellules CHO transfectées par un complexe GPIb-IX contenant une mutation ou une délétion au niveau de ses domaines intracellulaires. Les cellules transfectées constituent un outil adapté à l'étude des fonctions d'adhésion et d'activation de ce récepteur. En effet, l'introduction du complexe GPIb-IX assure une adhésion efficace au FW en absence ou présence de flux (Yuan et al. 1999) et permet une signalisation similaire à celle observée dans la plaquette menant à l'émission de filopodes puis à l'étalement qui dépend de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Mangin et al. 2004; Yuan et al. 1999). Enfin, les interactions avec les partenaires intracellulaires connus du complexe (FLNA et 14-3-3 ζ) ont été retrouvées dans ces modèles cellulaires (Cranmer et al. 2005; Gu et al. 1999; Mangin et al. 2004).

Les travaux précédents se sont essentiellement intéressés au rôle de la portion cytoplasmique de la GPIb α pour les fonctions d'adhésion ou pour la signalisation « inside-out » menant à l'activation de l'intégrine. Un rôle de la portion cytoplasmique de la GPIb β contenant la Ser¹⁶⁶ dans la régulation des fonctions adhésives a également été rapporté, mais avec des résultats contradictoires (Bodnar et al. 2002; Perrault et al. 2003). Au début de ce travail, à l'exception de l'association de la GPIb β à la 14-3-3 ζ et à la calmoduline (Andrews et al. 1998; Andrews et al. 2001; Calverley et al. 1998; Dai et al. 2005; Feng et al. 2000), il n'existait pas d'argument en faveur d'un rôle de la région intracellulaire de la GPIb β dans la signalisation déclenchée par le complexe GPIb-V-IX. D'autre part, il n'existe pas d'étude fonctionnelle systématique du domaine intracellulaire de la GPIb β , contrairement aux études plus complètes portant sur la GPIb α .

L'objectif de ce travail a été d'établir une cartographie fonctionnelle des domaines intracellulaires de la GPIb α et de la GPIb β focalisée sur l'activation précoce menant à l'émission de filopodes. Des cellules CHO GPIb-IX transfectées par une GPIb α tronquée soit de tout son domaine intracellulaire (96 résidus $\alpha\Delta$ IC), soit des sites d'interaction pour la FLNA ($\alpha\Delta$ 557-568) ou la 14-3-3 ζ ($\alpha\Delta$ 580-590 et $\alpha\Delta$ 605-610) ont été utilisées. Deuxièmement de nouvelles lignées ont été développées exprimant soit une GPIb β entièrement privée de son domaine intracellulaire de 34 résidus ($\beta\Delta$ IC), soit des délétions de dix acides aminés de la partie proximale ($\beta\Delta$ 150-160), centrale ($\beta\Delta$ 159-170) ou distale ($\beta\Delta$ 172-181). La capacité de

ces clones à adhérer et à s'activer sur une matrice de FW a été évaluée. Une mutagenèse systématique par « alanine scanning » de la région 150-179 identifiée par délétion a ensuite été réalisée pour identifier plus précisément les domaines fonctionnels. Enfin, l'étude a été étendue aux plaquettes de souris exprimant une GPIIb β tronquée de la totalité de sa portion cytoplasmique.

**Role of the GPIIb β intracellular domain for von Willebrand Factor induced-GPIIb signalling
leading to platelet filopodia emission.**

Running head: Functional role of platelet GPIIb β

Tovo David, Catherine Strassel, Anita Eckly, Jean-Pierre Cazenave, Christian Gachet and François Lanza*.

INSERM U311, EFS-Alsace, ULP, Strasbourg, France

* To whom correspondence should be addressed:

François Lanza, INSERM U.311, Etablissement Français du Sang-Alsace,

10 rue Spielmann,

BP 36,

67065 Strasbourg Cedex, France

Tel: +33.388.21.25.25

Fax: +33.388.21.25.21

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

Abstract:

Circulating platelets are initially recruited at the site of vessel injury by interacting with von Willebrand factor immobilized onto collagen fibers. This adhesion is mediated by the GPIb-V-IX complex which transmits a specific intracellular signalling leading to the reorganization of the platelet actin cytoskeleton and extension of filopodia. The early events of this activation and the contribution of the intracellular domains of the GPIb-V-IX complex remain to be identified. GPIb-IX transfected CHO cells expressing mutant forms of the GPIb α and GPIb β were studied for their ability to adhere and change shape on a von Willebrand factor matrix. Deletion of the entire GPIb α intracellular domain and shorter deletions eliminating the filamin A or the 14-3-3 ζ binding sites did not prevent cells from extending filopodia. On the contrary, intracellular deletions of GPIb β in the membrane proximal (Leu¹⁵⁰ to Arg¹⁶⁰) and central segments (Ala¹⁵⁹ to Pro¹⁷⁰) reduced the capacity to extend filopodia without affecting adhesion efficiency or GPIb-IX association with filamin A and 14-3-3 ζ . Single alanine scanning mutagenesis of the Leu¹⁵⁰ to Pro¹⁷⁰ region identified a cluster of residues (Arg¹⁶⁴, Leu¹⁶⁵, Leu¹⁶⁷, Thr¹⁶⁸ and Pro¹⁷⁰) required for efficient filopodia formation. Interestingly, mutation of the PKA-dependent phosphorylation Ser¹⁶⁶ site had no consequence on adhesion or shape change. Importance of the GPIb β subunit was also documented in murine platelets with an intracellular deletion of GPIb β which exhibited a decreased capacity to extend filopodia upon adhesion on von Willebrand factor. These results point to the GPIb β intracellular region as being an important element in GPIb-dependent platelet activation.

Introduction:

The glycoprotein GPIb-V-IX complex is a receptor for von Willebrand factor which plays a crucial role in primary hemostasis by mediating platelet adhesion to the extracellular matrix of injured blood vessels (1,2). In addition, there is now increasing evidence for a role of GPIb-V-IX in generating intracellular signals following its interaction with immobilized von Willebrand factor (3). Identification of a restricted GPIb-V-IX can be obscured by the ability of platelets to amplify their own responses by agonists secreted from their granules (ADP) or generated *de novo* (TxA2). Another difficulty in studying GPIb-V-IX-dependent signalling is the presence of a second platelet receptor for von Willebrand factor, the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, which can trigger outside-in activation (4). Analysis of platelet adhesion under stringent conditions to avoid these costimulatory signals has revealed a GPIb-V-IX specific activation leading to platelet shape change with emission of filopodia (5,6). Under the same stringent conditions, specific GPIb activation has also been demonstrated in response to a dimeric A1 domain of von Willebrand factor, a GPIb-V-IX selective ligand, leading to $\alpha_{IIb}\beta_3$ mobilization (4).

The signalling cascade leading to filopodia extension is incompletely characterized but appears to require activation of a src-kinase, phospholipase C gamma2, and the mobilization of Ca²⁺ from intracellular stores. PI3 kinase (PI3K) (4,6), PKC (4), MAP kinase or cGMP-dependent kinase (7) do not seem to be involved in the early stages of GPIb-V-IX dependent activation. However, GPIb-dependent mobilization of $\alpha_{IIb}\beta_3$ is dependent on PI3K and PKC dependent-activation (4). Among unresolved issues on GPIb-dependent activation, the identity and mode of interaction of proximal effectors are unknown as well as the domains of the receptor involved in triggering the initial signals.

GPIb-IX cell transfectants represent useful tools to dissect these early events as they recapitulate GPIb-signalling functions observed in platelets. Transfection of the normal complex renders these cells competent to adhere to a von Willebrand factor matrix, to extend filopodia (5) and to activate $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin and induce cell spreading (8). CHO cells containing intracellular deletions and mutations have been described in the literature mostly focused on GPIb α . Progressively larger deletions starting at the COOH-terminal, short deletions covering the 535-610 portion and alanine mutagenesis have allowed to map the binding sites for the actin branching protein filamin and the adaptor protein 14-3-3 ζ (9-14). Signalling functions were mostly analyzed for the ability to mobilize $\alpha_{IIb}\beta_3$ adhere under flow conditions and aggregate but not for early signals leading to filopodia formation. Studies on GPIb β have been limited to Ala and Gly substitutions of phosphorylation site at Ser¹⁶⁶ which led to opposing observations of increased or decreased adhesion on immobilized von Willebrand factor and no evaluation of shape change responses (15,16).

In this study, GPIb-IX expressing CHO cells with short deletions and point mutations of the intracellular segments of the GPIb α and GPIb β subunits were evaluated for their capacity to adhere

and shape change in response to von Willebrand factor. The results point to a role of the intracellular portion of the GPIIb β subunit and identify critical residues within its central Arg¹⁶⁴-Pro¹⁷⁰ domain.

Experimental procedures

Reagents. Apyrase was purified from potatoes as previously described (17). Human VWF (hVWF) was purified from plasma cryoprecipitates by gel filtration according to a published procedure (18). Botrocetin and WM23 a monoclonal antibody (moAb) directed against the GPIIb α subunit were kindly provided by Dr SP. Jackson (Melbourne, Australia). Eptifibatide was from GlaxoSmithKline (Middlesex, United Kingdom). Human serum albumin (HSA) was from EFS-Alsace (Strasbourg, France). MAb ALMA.12 against human GPIIb α was produced in our laboratory. Bovine serum albumin (BSA), MOPC-31 a mouse IgG1 κ isotype control, 1,10-Phenanthroline monohydrate and TRITC-phalloidin were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Paraformaldehyde (PFA) was from EMS (Washington, PA, USA). Goat anti mouse antibody (GAM), horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG and goat anti-rabbit (GAM-HRP and GAR-HRP) and FITC conjugated GAM and GAR were provided by Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). MAB1678 a mAb directed against Filamin A was provided by Chemicon (Temecula, CA, USA). ζ (C-16) a rabbit polyclonal antibody directed against the 14-3-3 ζ was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Calpeptin was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). ECL reagents, Hyper-film-ECL and protein G-Sepharose were from Amersham Bioscience (Uppsala, Sweden). Complete protease inhibitor cocktail was provided by Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). Laemmli buffer, Tween 20, Ready gels (4-15%) were purchased from Bio-rad SA (Ivry sur Seine, France). Immunoblotting PVDF membranes were from Millipore (Billerica, MA, USA).

Expression of GPIIb-IX in CHO cells. CHO cell lines stably expressing the wild type GPIIb-IX complex or GPIIb α deleted forms of GPIIb-IX have been described previously (12,15,19). Stable cell lines with deletion or Alanine mutation of the intracellular domain of the GPIIb β were obtained following transfection of the GPIIb β cDNA into GPIIb α IX expressing cells (20). Oligonucleotide directed mutagenesis was performed by PCR amplification of PDXGPIIb β vector (kindly provided by J Lopez, Houston, USA) with Pfu DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA), digestion with Dpn I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) and transformation in TOP10 bacteria (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Plasmids purified with Plasmid Endofree (Qiagen, Valencia, CA, USA) were transfected at a fixed amount (0.5 μ g) with 0.05 μ g of pDR2 (Clontech, San Jose, CA, USA) using FUGENE6 (Roche-diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Positive cells were selected in the presence of Hygromycin (200 μ g/mL) (Boehringer-Mannheim, Germany) two days after transfection.

Mouse platelet preparation. Mouse washed platelets were prepared from ACD-anticoagulated blood by Ficoll separation from PRP and sequential centrifugation as described (17). The cells were resuspended at a density of $3 \times 10^5/\mu\text{L}$ in Tyrode-Hepes buffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO_3 , 0.3 mM NaH_2PO_4 , 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5.5 mM glucose, 5 mM Hepes, pH 7.3) containing 0.35% HSA and apyrase 0.02 U/mL.

Cell adhesion and morphology. Adhesion of CHO GPIb-IX cells on a von Willebrand factor matrix was studied as previously described (5). Briefly, cells ($10^6/\text{mL}$) in PBS were treated with 5 mM EDTA and allowed to adhere to cover slips precoated with hVWF (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 min at 37°C in the presence of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ botrocetin. Non-adherent cells were gently washed away and adherent cells were fixed with 4% PFA for 15 min, washed and stained with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TRITC-phalloidin for 30 min. After 3 washes in PBS and a last wash in water, the adherent cells were covered with 13 μL of Mowiol 4-88 solution (France Biochem, Meudon, France) and the cover slips were mounted on microscope slides. Fluorescence was visualized by UV illumination at 570 nm under a Leica DMDL microscope (Leica Microsystems SA, Wetzlar, Germany) using a Planfluotar oil-immersion lens (40x, numerical aperture 1.00). Image acquisition and analysis were performed with Metamorph software (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA). The number of adherent cells was determined on 8 random fields corresponding to a total surface of $9.7 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ and the number of cells which had extended filopodia was determined in the same fields.

Mouse platelets ($3 \times 10^7/\text{mL}$) were allowed to adhere on a surface coated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VWF in the presence of Eptifibatide for β_3 integrin blockade and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of botrocetin for 30 min at 37°C. Adherent cells were gently washed away with PBS and then samples were processed for Scanning electron microscopy analysis (SEM) as previously described (21). Briefly, adherent platelets were fixed for 45 min with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3, 305 mOsm/Kg) containing 2% sucrose. The fixed cells were washed 3 times in 0.9% saline buffer and dehydrated sequentially in increasing concentrations of ethanol solutions. Samples were air-dried with hexadimethyldisilazane, sputtered with gold and examined under a scanning electron microscope (Fei Sirion, Eindhoven, The Netherlands) (5kV). The number of adherent cells was determined on 5 different fields corresponding to a total surface of $14,375 \mu\text{m}^2$, and on the same fields the percentage of platelets which had changed shape was quantified.

Quantification of the GPIba sites on the surface of transfected CHO cells. The number of GPIba sites was quantified with the QIFIKIT[®] kit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer recommendations. Briefly, cells (2×10^5) in PBS-BSA (0.1%)-sodium azide (0.02%) were incubated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ALMA.12 or non immune MOPC.31 for 20 min at 4°C. Cells were washed, and incubated with a goat anti-mouse antibody (GAM) from the kit at a final dilution of 1/50.

In parallel, calibration beads coated with determined increasing amounts of mouse IgG were labelled with GAM for 20 min at 4°C. Cells and beads were washed again and samples were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer. The number of GPIb α sites was calculated with the Mean Fluorescence Intensity (MFI) and the calibration curve obtained with the calibration beads.

GPIb α cleavage on the surface of CHO cells. CHO cells adjusted at $2 \times 10^7/\mu\text{L}$ were treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ O-sialoglycoprotein endopeptidase (OSGE; Cedarlane Laboratories) at 37°C for 30 min. Reaction was stopped by adding 5 ml Tyrode's buffer. CHO were centrifuged to eliminate cleaved GPIb α and resuspend in Tyrode's buffer.

VWF binding to CHO cells. Cells (2×10^5) resuspended in PBS were incubated with hVWF (0.5, 4 and 8 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of ristocetin (1.5 mg/mL) for 30 min at room temperature. Cells were then washed with 0.1 M sodium acetate/0.5 x PBS and labelled with a rabbit polyclonal antibody directed against human VWF (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) for 10 min at 4°C. A FITC coupled goat anti rabbit antibody was added (10 $\mu\text{g/ml}$) for 10 min at 4°C. Finally, cells were fixed with 1% formaldehyde and 0.1% NaN₃ until the analysis of the samples on a FACSCalibur flow cytometer. To account for differences in GPIb α levels between the cell lines, VWF binding was normalized as a ratio to GPIb α levels. For that, cells were incubated with WM23 (10 $\mu\text{g/ml}$) for 20 min at 4°C and revealed with GAM-FITC (10 $\mu\text{g/ml}$) for 20 min at 4°C.

Immunoprecipitation and immunoblotting of CHO cell lysates. Cells (5×10^6 cells/point for the wild type clone or adjusted to GPIb α expression for the mutants) were washed twice in PBS and then lysed for 1 h at 4°C in ice-cold 10 mM Tris, pH 7.5 buffer containing 1%, Triton X-100 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM Na₃VO₄, 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 2 μM calpeptin, 300 nM 1,10-Phenantrolin monohydrate and 1X protease inhibitor cocktail. Following centrifugation at 14,000 g for 30 min at 4°C, supernatant was cleared once for 2 h at 4°C with 50 μL of protein G-Sepharose beads, irrelevant mouse serum (1 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ of lysate) and GAM IgG (1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ of lysate) and a second time for 1 h at 4°C with 50 μL of protein G-Sepharose beads. Lysates were incubated with MOPC.31 or ALMA.12 (5 μg) for 1 h at 4°C and 50 μL of protein G-Sepharose beads were then added for 1 hour at 4°C. Immunoprecipitated proteins were separated on 4-15% SDS-PAGE gels under reducing conditions and transferred to PVDF membranes. After saturation with 5% (wt/vol) milk blocking solution in PBS containing 0.05% (wt/vol) Tween-20, the membranes were blotted with either WM23 (1 $\mu\text{g/ml}$), MAB1678 (1 $\mu\text{g/ml}$) or ζ (C-16) (400 ng/mL). Membranes were washed and revealed with GAM-HRP or GAR-HRP and ECL western blotting detection kit. Intensities of the GPIb α , 14-3-3 and filamin A bands were quantified by densitometry using a Umax Powerlook 1120 scanner and the ImageQuant TL software (Amersham Bioscience, Upsala, Sweden).

Statistical analyses. The statistical significance of differences between means was evaluated using a one-way Anova test followed by a Tukey's multiple comparison post test and p values of less than 0.05 were considered to be significant. For the filopodia emission assays Fisher's exact tests were performed, p values of less than 0.05 were considered to be significant. The variation of means was calculated as the standard deviation.

RESULTS

Effect of GPIb α cytoplasmic deletions on filopodia formation.

Previous studies have established CHO that cells transfected with the normal GPIb-IX complex reproduced the platelets capacity to adhere to a von Willebrand factor matrix and extend filopodia (5). This shape change is independent of β_3 integrins as it is observed in the presence of EDTA.

The role of the 96 amino acid intracellular segment of GPIb α was evaluated on cells deleted of the entire domain (Δ 516-610, $\alpha\Delta$ IC) or deleted of binding sites for filamin A (Δ 557-568) or 14-3-3 ζ (Δ 580-590 and Δ 605-610) (Figure 1). These cells have been previously reported to express GPIb-IX levels comparable to wild-type transfectants with the exception of Δ 605-610 which displayed a 60% reduced GPIb α surface level. Deletion of the entire cytoplasmic region resulted in a 55% reduced adhesion on VWF but adherent cells had a normal capacity to extend filopodia (Figure 2). Cells lacking containing deletions of the filamin A or 14-3-3 ζ binding sites adhered as efficiently as α WT cells and displayed normal shape changes (Figure 2A). As previously reported, absence of the 14-3-3 ζ binding sites resulted in inefficient spreading in the absence of β_3 blockade, while cells lacking the filamin A domain spread normally (data not shown).

These results indicated that the GPIb α intracellular domain was not essential for GPIb-triggered to filopodia formation despite playing a role in downstream integrin activation via 14-3-3 ζ .

Effect of GPIb β cytoplasmic deletions on filopodia formation.

The role of the 33 amino acid intracellular segment of GPIb β was then evaluated by truncating the entire domain ($\beta\Delta$ IC), or by introducing sequential shorter (10-11 residues) deletions ($\beta\Delta$ 150-160, $\beta\Delta$ 159-170, $\beta\Delta$ 172-181). With the exception of $\beta\Delta$ 172-181, which expressed normal levels of GPIb-IX, the other deletions resulted in reduced expression representing 20% ($\beta\Delta$ IC), 36% ($\beta\Delta$ 150-160) and 62% ($\beta\Delta$ 159-170) of levels in β WT expressing the normal complex (Figure 4A). Despite the lower receptor density the cells adhered at normal or only slightly decreased levels on VWF. However, $\beta\Delta$ IC, $\beta\Delta$ 150-160 β , and Δ 159-170 cells had a decreased capacity to shape change with on average a ~35% decrease in the number of adherent cells able to extend filopodia when compared to β WT

(Figure 3). These results suggested that the intracellular region of the GPIIb/IIIa, between Leu¹⁵⁰ and Pro¹⁷⁰, played a role in signalling leading to production of filopodia.

One possible cause for reduced filopodia production in $\beta\Delta$ IC, $\beta\Delta$ 150-160 and $\beta\Delta$ 159-170 cells is their diminished GPIIb/IIIa surface density with values ranging from 20 to 62% of β WT cells (Figure 4A). To try to appreciate the influence of GPIIb/IIIa levels on shape change, β WT cells were subjected to O-sialo-glyco-endopeptidase treatment which cleaves the NH₂-terminal von Willebrand factor binding domain of GPIIb/IIIa. Under cleavage conditions retaining ~30% GPIIb/IIIa binding sites equivalent to the receptor density in $\beta\Delta$ IC, adhesion was decreased by 25% as compared to untreated, but an equivalent percentage of adherent platelets changed shape (Figure 4B). These results suggested that a lower density of GPIIb/IIIa binding sites is not sufficient by itself to explain the decreased filopodia emission in $\beta\Delta$ IC, $\beta\Delta$ 150-160 and $\beta\Delta$ 159-170 clones.

Reduced filopodia emission in GPIIb/IIIa deleted cells could be due to an intrinsic decreased ability of GPIIb/IIIa to bind von Willebrand factor. When VWF binding was measured by FACS in the presence of ristocetin and normalized for GPIIb/IIIa levels, all the clones with GPIIb/IIIa intracellular deletion bound VWF as efficiently as wild type cells (Figure 5). These data demonstrate that abnormal filopodia production of the GPIIb/IIIa mutants is not due to an intrinsic VWF binding deficiency of the mutant receptors.

Association of filamin A and 14-3-3 ζ with GPIIb-IX following GPIIb/IIIa cytoplasmic deletions.

Three partners have been identified as interacting directly with the intracellular domains of GPIIb/IIIa and GPIIb/IIIa i.e. filamin with GPIIb/IIIa, 14-3-3 ζ with GPIIb/IIIa and GPIIb/IIIa, and calmodulin with GPIIb/IIIa (8,14,22,23). Consequences of GPIIb/IIIa deletion mutagenesis on the association with filamin A and 14-3-3 ζ were evaluated in cell lysates following immunoprecipitation of the complex with mAb ALMA.12. Analysis was not performed for calmodulin as we did not observe its co immunoprecipitation in transfected CHO cells. Efficient co immunoprecipitation of filamin A and 14-3-3 ζ with GPIIb-IX was observed in all the GPIIb/IIIa deleted mutants (Figure 6), including the $\beta\Delta$ IC and $\beta\Delta$ 159-170 which eliminate Ser¹⁶⁶. These results together with deletions of Iba presented earlier do not suggest an involvement of filamin A or 14-3-3 ζ in GPIIb dependent signalling leading to the emission of filopodia.

Analysis of the GPIIb/IIIa 150-170 region by alanine scanning mutagenesis.

Deletion mutagenesis suggested a role of the Leu¹⁵⁰-Pro¹⁷⁰ region of GPIIb/IIIa in filopodia formation. These deletions resulted in most cases in reduced expression and could alter the function by producing conformational alterations. To avoid these drawbacks and to better map the functional domains, we performed progressive single alanine substitutions within this region. Contrary to the

$\beta\Delta 159-170$ deletion mutant, all the alanine mutants expressed levels of GPIb-IX in the same range as wild type (Figure 7B). Additionally, all had normal von Willebrand factor binding capacities (data not shown) and adhered as efficiently as wild type cells (Figure 7C). Normal filopodia formation was observed for the mutants with the exception of a cluster of residues in the Arg¹⁶⁴-Pro¹⁷⁰ domain. Alanine substitution of Arg¹⁶⁴, Leu¹⁶⁵, Leu¹⁶⁷, Thr¹⁶⁸ and Pro¹⁷⁰ resulted in a 55 to 17 % decrease in the number of cells extending filopodia as compared to β WT (Figure 7D). Interestingly, mutation within this cluster of the phosphorylation site at position 166 had no effect on filopodia formation.

Filopodia formation of mouse platelets deleted of the GPIb β intracellular domain

To evaluate the importance of the GPIb β intracellular domain in platelets we studied knock-in mice expressing GPIb β deleted of its intracellular domain (GPIb $\beta\Delta$ IC) (Strassel et al, 2006, ATVB, under review). These mice exhibit a Bernard-Soulier like phenotype with 20% surface expression of the GPIb-V-IX complex. GPIb $\beta\Delta$ IC platelets were able to adhere at levels representing 75% of wild type control on a von Willebrand factor matrix as analyzed by scanning electron microscopy. Adherent platelets displayed a shape change defect with only 42% of them being able to produce filopodia as compared to 97% in wild type animals. For those which extended filopodia, a decreased number of filopodia per platelet was observed (Figure 8).

Discussion

The main finding of this study was the uncovering of a role of the GPIb β subunit of the GPIb-V-IX complex in platelet activation after adhesion to von Willebrand factor. This function is carried by its intracellular domain with an important role of residues in a Arg¹⁶⁴-Pro¹⁷⁰ segment.

The study focused on the GPIb entity of the GPIb-V-IX complex (GPIb α disulfide-linked to GPIb β) by performing deletion and Alanine mutagenesis of its intracellular domains in transfected CHO cells. We specifically selected the early stages of activation following adhesion to von Willebrand factor. This approach extends previous studies of the intracellular domains which analyzed von Willebrand factor binding, adhesion and integrin activation responses (8-10,15,16,24). Here, extension of filopodia following adhesion to von Willebrand factor was taken as an indicator of an early GPIb-dependent activation. An unexpected observation was that this shape change can take place in the absence of the GPIb α intracellular domain. By contrast, the GPIb β intracellular domain was required for a full response. A discrete functional motif was identified between Arg164 and Pro170. This region includes a known phosphorylation site at Ser¹⁶⁶ but interestingly, its mutation to alanine did not affect GPIb-induced activation. Deletion of a second potential functional domain, an arginine-rich motif between residues 150-163 previously identified as a calmodulin-binding region (25), also allowed normal filopodia formation.

GPIb-IX transfected cells are a useful model to study GPIb-von Willebrand factor dependent activation. These cells become competent to adhere to von Willebrand factor independently of other receptors such as beta3 integrins and exhibit the characteristic filopodia shape change observed in platelets. Additionally, the cytoskeletal reorganization is similarly inhibited by antagonists preventing platelet filopodia formation, such as src-kinases and PLC inhibitors, and intracellular Ca²⁺ chelators. This model has in fact been instrumental in establishing the existence of a GPIb-direct signalling (5,6). All the transfectants used in this study displayed normal biosynthesis of GPIb-IX as analyzed by immunoprecipitation and Western blotting, with normal size and glycosylation profiles (data not shown). Contrary to the GPb α subunit, several deletions in the GPIb β intracellular domain decreased expression indicating a role in assembly or trafficking to the membrane. Strikingly, all these mutants displayed efficient adhesion on von Willebrand factor even those with decreased surface expression. This observation contrasts with reports of CHO transfectants expressing the normal complex but lacking efficient adhesion to von Willebrand factor (9,16,24). In our hands, several CHO GPIb-IX clones generated in different backgrounds (CHO DHFR and CHO K1), and obtained from different laboratories similarly displayed efficient adhesion (26,27). Possible causes for these differences could be due to a phenotypic drift in different CHO cell lines which could for example modify post-translational sulfation or phosphorylation of GPIb.

Deletion studies have previously identified a role of GPIb α intracellular domain in resisting to high shear and in integrin activation. Cells lacking the filamin A binding motif (557-579) were less resistant to detachment, and those lacking the 14-3-3 ζ binding sites (580-590 and 605-610) spread less efficiently (8,9,12). A role of these domains in filopodia formation was however not observed in the present study despite the use of the same clones (8,12). We also did not observe defects in static adhesion efficiency despite some reports that deletions of GPIb α , and especially deletion of the COOH-terminal 605-610 region, decreased adhesion properties (9,24).

In a different approach, we reported that introduction of a peptide corresponding to the GPIb α 557-569 sequence inhibited platelet and GPIb-IX cell adhesion and filopodia emission (David et al, 2006, JTH, accepted). These results would appear to contradict the present results on cells lacking the 557-579 motif. A possible way to explain these differences would be to assume a central role of GPIb β in initiating activation, with GPIb α only acting as a regulator through its linkage with GPIb β . The GPIb α 557-569 permeant peptide could by interacting with the GPIb β intracellular domain interfere with its signalling function. On the other hand, deletion of the same motif in the CHO model would not prevent GPIb β -dependent activation.

This study provides the first comprehensive mutagenesis analysis of the GPIb β intracellular domain. Previous studies have mainly focused on the Ser¹⁶⁶ residue, with the exception of a deletion of the 166-181 domain (15,16). Bodnar et al reported that Ser¹⁶⁶ to Ala mutation or 166-181 deletion increased von Willebrand factor-binding and cell adhesion compared to wild type cells which, as

mentioned earlier, display weak adhesion properties (16). These results differ from the present ones. Firstly, CHO-expressing the normal complex adhered efficiently. Secondly, a Ser¹⁶⁶ to Ala mutation had no consequence on GPIb-dependent adhesion and, in addition, did not prevent GPIb-dependent activation. These differences make it difficult to conclude on the exact role of Ser¹⁶⁶ (15). A possible role of GPIb β Ser¹⁶⁶ was however suggested from shear induced platelet aggregation studies which might be more relevant to integrin-dependent responses than to direct GPIb-activation (13).

Deletion and Ala mutagenesis helped identify the GPIb β Arg¹⁶⁴-Pro¹⁷⁰ segment as being important for filopodia formation. A potential role of a second domain, between 150-160, suggested by the deletion results was not confirmed by alanine scanning. The 150-160 region being rich in Ala in the native sequence will require an alternative mutagenesis approach to fully eliminate its role. This region has been previously proposed as a calmodulin-binding site and as a putative transducing element (25). This role could not be evaluated in this study as we did not observe coprecipitation of calmodulin in CHO-GPIb-IX cell lysates. A role of this region was also suggested by the inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet agglutination and adhesion with a Arg¹⁵¹-Ala¹⁶¹ palmytated peptide. However, this peptide also inhibited aggregation to low thrombin concentrations, to collagen, and to a TxA2 analog, raising questions about a GPIb specific effect (28).

Deletion in the COOH-terminal side, downstream of Pro172, did not affect filopodia formation suggesting that it was not involved in signalling, despite the presence of putative phosphorylation sites at Thr¹⁷⁹ and Ser¹⁸¹.

Three adjacent residues, Leu¹⁶⁷, Thr¹⁶⁸ and Pro¹⁷⁰, were uncovered in the Arg¹⁶⁰-Pro¹⁷⁰ region as potentially implicated in signalling. Interestingly, they are conserved in the mouse sequence and could represent a phosphorylation site for a Ser/Thr kinase. To date only one partner has been identified for the 160-170 region, the 14-3-3 ζ adaptor protein (29). As mentioned earlier, this interaction requires phosphorylation of Ser¹⁶⁶ (23) and does not appear to participate in filopodia formation. In fact, none of the Ala mutants which affected filopodia formation prevented GPIb-14-3-3 ζ binding while on the opposite, normal filopodia formation occurred despite loss of GPIb-14-3-3 ζ association in GPIb α mutants.

Residues Arg¹⁶⁴ and Leu¹⁶⁵ in the Arg¹⁶⁰-Pro¹⁷⁰ region also appear important for activation. They are replaced in the mouse sequence by Glu and Phe respectively, two non conservative substitutions, raising questions about their exact implication.

None of the Ala mutations in the Arg¹⁶⁰-Pro¹⁷⁰ domain was able by itself to completely prevent filopodia formation. One possibility is that the Ala scanning approach failed to detect additional sites outside of this domain. Another possibility is that double or triple mutants in the Arg¹⁶⁰-Pro¹⁷⁰ region might be required for a more complete inhibition. It is also possible that GPIIX, which has not been explored here, might also play a role in signalling.

Obviously, this work needs to be validated in the more relevant platelet system. A first indication of the role of GPIIb/IIIa intracellular domain in platelets was provided in mice where it had been deleted by a knockin strategy. One limitation to interpret these results is that these mice have an 80% decreased expression of the complex and a phenotype similar to Bernard-Soulier patients, i.e. platelets with increased size and a decreased number. Nonetheless, these platelets adhered efficiently to a von Willebrand factor matrix but exhibited a profound defect in filopodia extension.

In conclusion, this work has provided evidence in support of a role of the GPIIb/IIIa subunit in initiating GPIIb/IIIa-dependent activation leading to platelet shape change. This could open the way to possible targeting of the GPIIb/IIIa intracellular domain to prevent platelet activation following their adhesion to damaged vessels and control thrombus progression.

Legends to the figures

Figure 1: Schematic representation of the GPIb α and GPIb β cytoplasmic tails deletion mutants. The cDNAs coding for the GPIb α and GPIb β subunits in the pDX expression vector were submitted to PCR mutagenesis targeting their intracellular domains. **A.** The intracellular domain of GPIb α spanning residues 515-610 was entirely deleted by introduction of a stop codon at position 515 ($\alpha\Delta$ IC), or deleted of the 557-568 filamin A binding region (Δ 557-568) or the 580-590 and 605-610 14-3-3 ζ binding domains (Δ 580-590 and Δ 605-610). **B.** The intracellular domain of GPIb β spanning residues 149-181 was entirely deleted by introduction of a stop codon at position 149 ($\beta\Delta$ IC) or contained progressive 10 to 12 residue deletions of the membrane proximal (Δ 150-160), central (Δ 159-170), and C-terminal (Δ 172-181) portions.

Figure 2: Effect of GPIb α cytoplasmic tail deletions on CHO GPIb-IX cell adhesion and filopodia extension on a von Willebrand factor matrix. CHO cells expressing the GPIb β and GPIX subunits were stably transfected with normal GPIb α (α WT) or with GPIb α deletion mutant as described in Fig.1A. Cells in suspension were allowed to adhere for 30 min to cover slips precoated with hVWF in the presence of 5 mM EDTA and 5 μ g/mL botrocetin followed by washing and fixation **A.** Representative micrographs of adherent cells fluorescently labelled by TRITC-phalloidin showing extension of numerous filopodia in adherent cells expressing normal GPIb α (α WT) or GPIb α deletion mutants. Scale bar represents 25 μ m. **B.** Cell adhesion was quantified in 8 random fields and expressed as the number of adherent cells per field. Adhesion was decreased in cells deleted of the entire cytoplasmic domain. Shape change was evaluated in the same fields by counting the number of cells which had extended filopodia. Results are mean values (\pm SEM) from 3 separate experiments.

Figure 3: Effect of GPIb β cytoplasmic tail deletions on CHO GPIb-IX cell adhesion and filopodia extension on a von Willebrand factor matrix. CHO cells expressing the GPIb α and GPIX subunits were stably transfected with normal GPIb β (α WT) or with mutant GPIb β deletion mutant as described in Fig.1B. Adhesion on von Willebrand factor was analyzed as described in Figure 2. **A.** Representative micrographs showing decreased extension of filopodia in adherent cells deleted of the entire intracellular domain ($\beta\Delta$ IC), and expressing the Δ 150-160 and Δ 159-170 mutations. **B.** Cell adhesion was quantified in 8 random fields and expressed as the number of adherent cells per field. Adhesion was normal or slightly decreased in cells with cytoplasmic deletions. Shape change was evaluated in the same fields by counting the number of cells which had extended filopodia. The number of adherent cells able to extend filopodia was significantly decreased in cells expressing the $\beta\Delta$ IC, Δ 150-160 and Δ 159-170 mutations. Results are mean values (\pm SEM) from 3 separate experiments. *** p <0.001

Figure 4: Effect of GPIIb β cytoplasmic tail deletions on GPIIb α expression and influence of GPIIb α density on adhesion and filopodia extension. **A.** The number of GPIIb α sites on the surface of CHO GPIIb-IX cells was quantified by FACS with mAb ALMA.12 using the Qifikit® kit based on the Mean Fluorescence Intensity (MFI) and a calibration curve. 6.9×10^5 sites were measured in β WT cells and comparable numbers were measured for the $\beta\Delta 172-181$. The number of sites was decreased in the $\beta\Delta IC$, $\Delta 150-160$ and $\Delta 159-170$ cells. Results are the mean values (+/- SEM) from 4 separate measurements. **B.** The effects of decreased GPIIb α density on adhesion and shape change was evaluated by cleaving the GPII α N-terminal domain in β WT cells with O-sialo-glyco-endopeptidase (15 μ g/ml). This treatment decreased ALMA.12 binding by 80%. O-sialoglyco-endopeptidase treated cells adhered with a slightly lower efficiency to von Willebrand factor but emitted filopodia in a proportion equal to untreated β WT. Results are the mean values (+/- SEM) from 3 separate measurements.

Figure 5: Effect of GPIIb β cytoplasmic tail deletions on von Willebrand factor binding. VWF binding to CHO cells was measured by FACS in the presence and absence of ristocetin (1.5 mg/mL). VWF binding was normalized as a ratio to the number of GPIIb α evaluated on the same cells with mAb WM23. The level of VWF binding in the deleted mutants was comparable to β WT. Results are the mean values (+/- SEM) from 3 separate measurements.

Figure 6: Effect of GPIIb β cytoplasmic tail deletions on the association of GPIIb-IX to filamin A and 14-3-3 ζ . CHO cells were lysed in 1% Triton X-100 and GPIIb-IX complexes were immunoprecipitated with mAb ALMA.12, separated by reduced 4-15% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Co-immunoprecipitated 14-3-3 ζ was detected using polyclonal antibody C-16 and filamin A by mAb MAB1678 and were revealed by ECL. A non specific band in the 14-3-3 ζ gel was observed at a higher molecular weight across the lanes including the non immune IgG control. Immunoprecipitated GPIIb α was detected by mAb WM23. The coprecipitated filamin A and 14-3-3 ζ bands were quantified with Imagequant TL software (Amersham Bioscience, Upsala, Sweden) in 2 separate experiments and results were expressed as mean arbitrary units (\pm SEM). Filamin A and 14-3-3 ζ were coprecipitated in the deleted mutants at levels comparable to β WT.

Figure 7: Effect of Alanine scanning mutagenesis of the GPIIb β 150-170 region on adhesion and filopodia formation on a von Willebrand factor matrix. **A.** Sequence of the GPIIb β intracellular domain covering residues 150 to 181. Underlined residues were changed individually to Ala by mutagenesis and the cDNA transfected in CHO cells expressing the GPIIb α and GPIIX subunits. **B.** The mutant cell lines were analysed by FACS with mAb ALMA.12 to quantitate GPIIb α surface

expression. Results are expressed as MFI. **C.** Adhesion to a von Willebrand factor matrix was analyzed as described in Figure 2 and the number of adherent cells per field was quantified. Results are mean values \pm SEM from 3 separate experiments. **D.** Shape change was evaluated in the same fields. The number of adherent cells able to extend filopodia was significantly decreased in cells with Alanine substitution of Arg¹⁶⁴, Leu¹⁶⁵, Leu¹⁶⁷, Thr¹⁶⁸ and Pro¹⁷⁰ residues. Results are mean values (\pm SEM) from 3 separate experiments. ***p<0.001

Figure 8: Adhesion and filopodia formation on a von Willebrand factor matrix of mouse platelets with a GPIIb/IIIa intracellular domain deletion. Washed platelets from wild type mice (GPIIb/IIIa WT) or from mice expressing an intracellular deleted form of GPIIb/IIIa (GPIIb/IIIa Δ IC) (Strassel et al, 2006, ATVP, under revision) were prepared from ACD-anticoagulated blood by Ficoll separation from PRP and sequential centrifugation. Washed GPIIb/IIIa WT and GPIIb/IIIa Δ IC platelets (3×10^7 /mL) were allowed to adhere for 30 min to a HvWf-matrix in the presence of 5 μ g/mL botrocetin and 40 μ g/mL Eptifibatide. Adherent cells were fixed and examined by scanning electron microscopy. **A.** Representative GPIIb/IIIa WT and GPIIb/IIIa Δ IC platelet scanning electron microscopy images **B.** The number of adherent platelets was determined on 5 different fields corresponding to a total surface of 14,375 μ m² and on the same fields the percentage of platelets which had changed shape was quantified. A non significant decrease in the number of adherent platelets and a significant defect in filopodia extension were observed in GPIIb/IIIa Δ IC. The results are the mean \pm SEM from 3 separate experiments. *** p<0.001.

Acknowledgments

We thank Juliette Mulvihill for reviewing the English of the manuscript, Marie-Jeanne Baas, Martine Santer, Sylvie Moog and Nicolas Receveur for excellent technical assistance, Shaun Jackson and David Williamson for providing the GPIIb/IIIa mutant clones. Tovo David is supported by a grant from ARMESA (Association de Recherche et de Développement en Médecine et en Santé Publique) and GEHT (Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose). Catherine Strassel was supported by a grant 2004.14 from Etablissement Français du Sang.

References

1. Berndt, M. C., Shen, Y., Dopheide, S. M., Gardiner, E. E., and Andrews, R. K. (2001) *Thromb Haemost* **86**(1), 178-188
2. Ruggeri, Z. M., and Ruggeri, Z. M. (2004) *Hamostaseologie* **24**(1), 1-11
3. Jackson, S. P., Nesbitt, W. S., and Kulkarni, S. (2003) *J Thromb Haemost* **1**(7), 1602-1612

4. Kasirer-Friede, A., Cozzi, M. R., Mazzucato, M., De Marco, L., Ruggeri, Z. M., and Shattil, S. J. (2004) *Blood* **103**(9), 3403-3411
5. Yuan, Y., Kulkarni, S., Ulsemer, P., Cranmer, S. L., Yap, C. L., Nesbitt, W. S., Harper, I., Mistry, N., Dopheide, S. M., Hughan, S. C., Williamson, D., de la Salle, C., Salem, H. H., Lanza, F., and Jackson, S. P. (1999) *J Biol Chem* **274**(51), 36241-36251
6. Mangin, P., Yuan, Y., Goncalves, I., Eckly, A., Freund, M., Cazenave, J. P., Gachet, C., Jackson, S. P., and Lanza, F. (2003) *J Biol Chem* **278**(35), 32880-32891
7. Marshall, S. J., Senis, Y. A., Auger, J. M., Feil, R., Hofmann, F., Salmon, G., Peterson, J. T., Burslem, F., and Watson, S. P. (2004) *Blood* **103**(7), 2601-2609
8. Mangin, P., David, T., Lavaud, V., Cranmer, S. L., Pikovski, I., Jackson, S. P., Berndt, M. C., Cazenave, J. P., Gachet, C., and Lanza, F. (2004) *Blood* **104**(2), 420-427
9. Gu, M., Xi, X., Englund, G. D., Berndt, M. C., and Du, X. (1999) *J Cell Biol* **147**(5), 1085-1096
10. Bialkowska, K., Zaffran, Y., Meyer, S. C., and Fox, J. E. (2003) *J Biol Chem* **278**(35), 33342-33350
11. Meyer, S. C., Zuerbig, S., Cunningham, C. C., Hartwig, J. H., Bissell, T., Gardner, K., and Fox, J. E. (1997) *J Biol Chem* **272**(5), 2914-2919
12. Williamson, D., Pikovski, I., Cranmer, S. L., Mangin, P., Mistry, N., Domagala, T., Chehab, S., Lanza, F., Salem, H. H., and Jackson, S. P. (2002) *J Biol Chem* **277**(3), 2151-2159
13. Feng, S., Christodoulides, N., Resendiz, J. C., Berndt, M. C., and Kroll, M. H. (2000) *Blood* **95**(2), 551-557
14. Cranmer, S. L., Pikovski, I., Mangin, P., Thompson, P. E., Domagala, T., Frazzetto, M., Salem, H. H., and Jackson, S. P. (2005) *Biochem J* **387**(Pt 3), 849-858
15. Perrault, C., Mangin, P., Santer, M., Baas, M. J., Moog, S., Cranmer, S. L., Pikovski, I., Williamson, D., Jackson, S. P., Cazenave, J. P., and Lanza, F. (2003) *Blood* **101**(9), 3477-3484
16. Bodnar, R. J., Xi, X., Li, Z., Berndt, M. C., and Du, X. (2002) *J Biol Chem* **277**(49), 47080-47087
17. Cazenave, J. P., Ohlmann, P., Cassel, D., Eckly, A., Hechler, B., and Gachet, C. (2004) *Methods Mol Biol* **272**, 13-28
18. Toti, F., Gachet, C., Ohlmann, P., Stierle, A., Grunebaum, L., Wiesel, M. L., and Cazenave, J. P. (1992) *Haemostasis* **22**(1), 32-40
19. Cranmer, S. L., Ulsemer, P., Cooke, B. M., Salem, H. H., de la Salle, C., Lanza, F., and Jackson, S. P. (1999) *J Biol Chem* **274**(10), 6097-6106.
20. Strassel, C., David, T., Eckly, A., Baas, M. J., Moog, S., Ravanat, C., Trzeciak, M. C., Vinciguerra, C., Cazenave, J. P., Gachet, C., and Lanza, F. (2006) *J Thromb Haemost* **4**(1), 217-228
21. Ohlmann, P., Eckly, A., Freund, M., Cazenave, J. P., Offermanns, S., and Gachet, C. (2000) *Blood* **96**(6), 2134-2139.
22. Bodnar, R. J., Gu, M., Li, Z., Englund, G. D., and Du, X. (1999) *J Biol Chem* **274**(47), 33474-33479
23. Calverley, D. C., Kavanagh, T. J., and Roth, G. J. (1998) *Blood* **91**(4), 1295-1303
24. Dai, K., Bodnar, R., Berndt, M. C., and Du, X. (2005) *Blood* **106**(6), 1975-1981
25. Andrews, R. K., Munday, A. D., Mitchell, C. A., and Berndt, M. C. (2001) *Blood* **98**(3), 681-687
26. Cranmer, S. L., Ulsemer, P., Cooke, B. M., Salem, H. H., de la Salle, C., Lanza, F., and Jackson, S. P. (1999) *J Biol Chem* **274**(10), 6097-6106
27. Lopez, J. A., Weisman, S., Sanan, D. A., Sih, T., Chambers, M., and Li, C. Q. (1994) *J Biol Chem* **269**(38), 23716-23721

28. Martin, K., Meade, G., Moran, N., Shields, D. C., and Kenny, D. (2003) *J Thromb Haemost* **1**(12), 2643-2652
29. Andrews, R. K., Harris, S. J., McNally, T., and Berndt, M. C. (1998) *Biochemistry* **37**(2), 638-647

Figure 1.

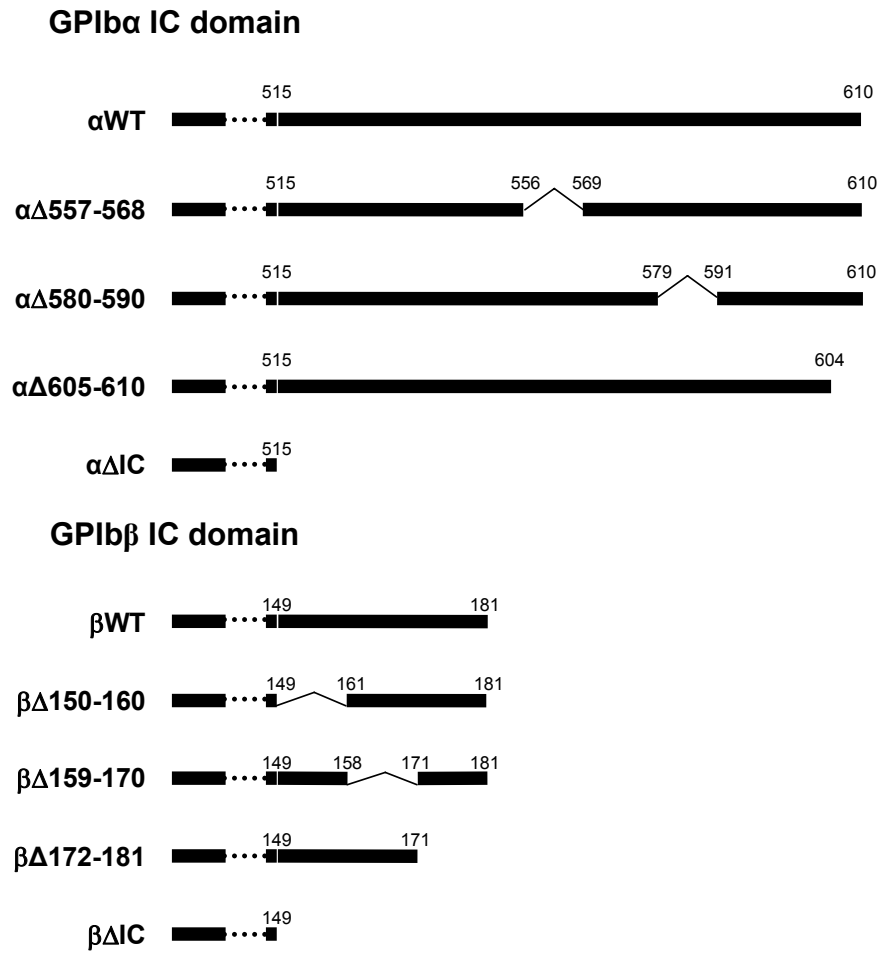


Figure 2.

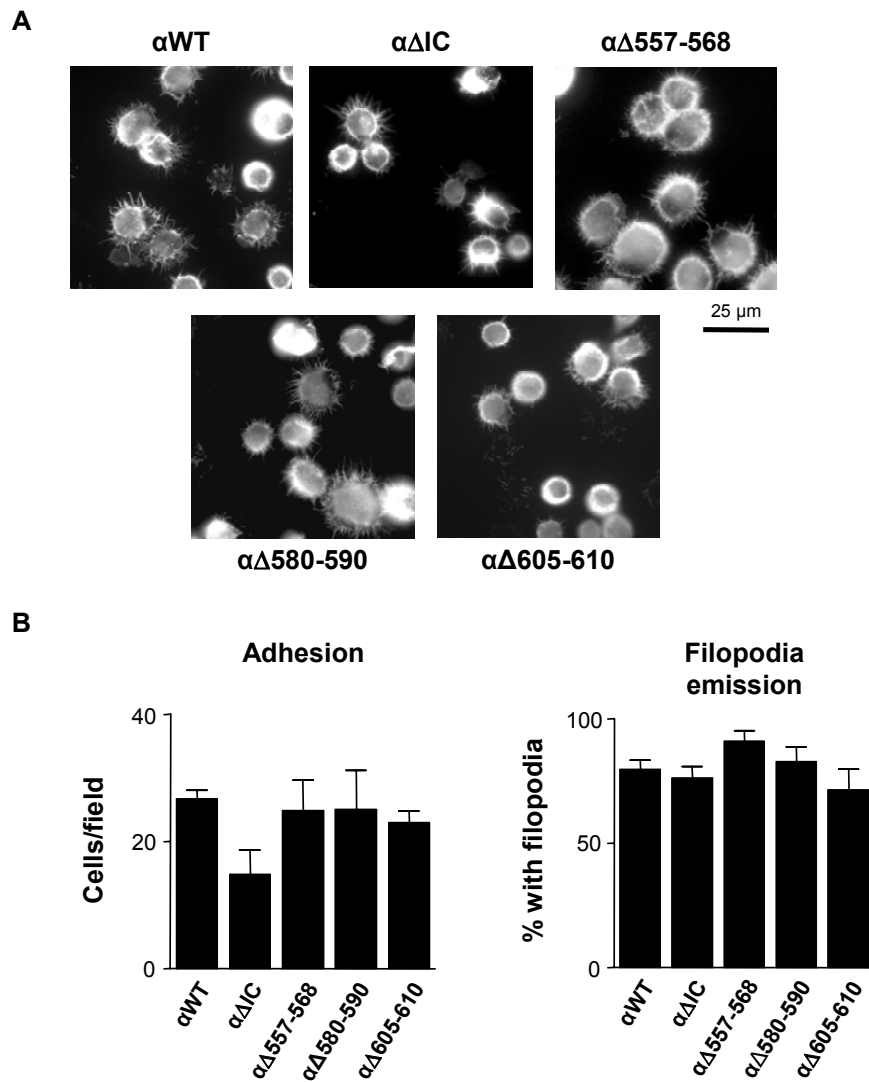


Figure 3.

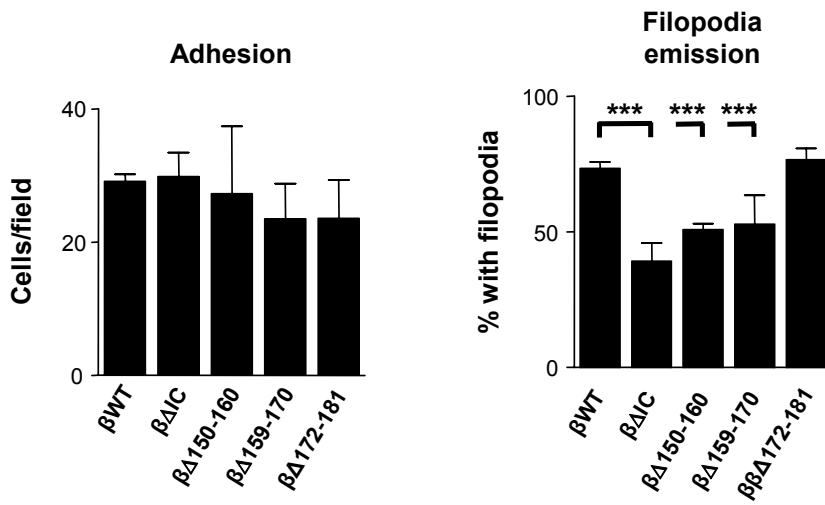
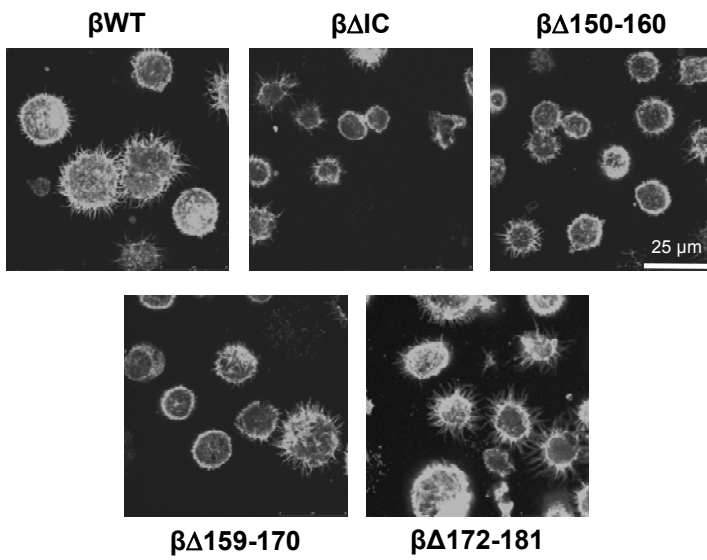


Figure 4.

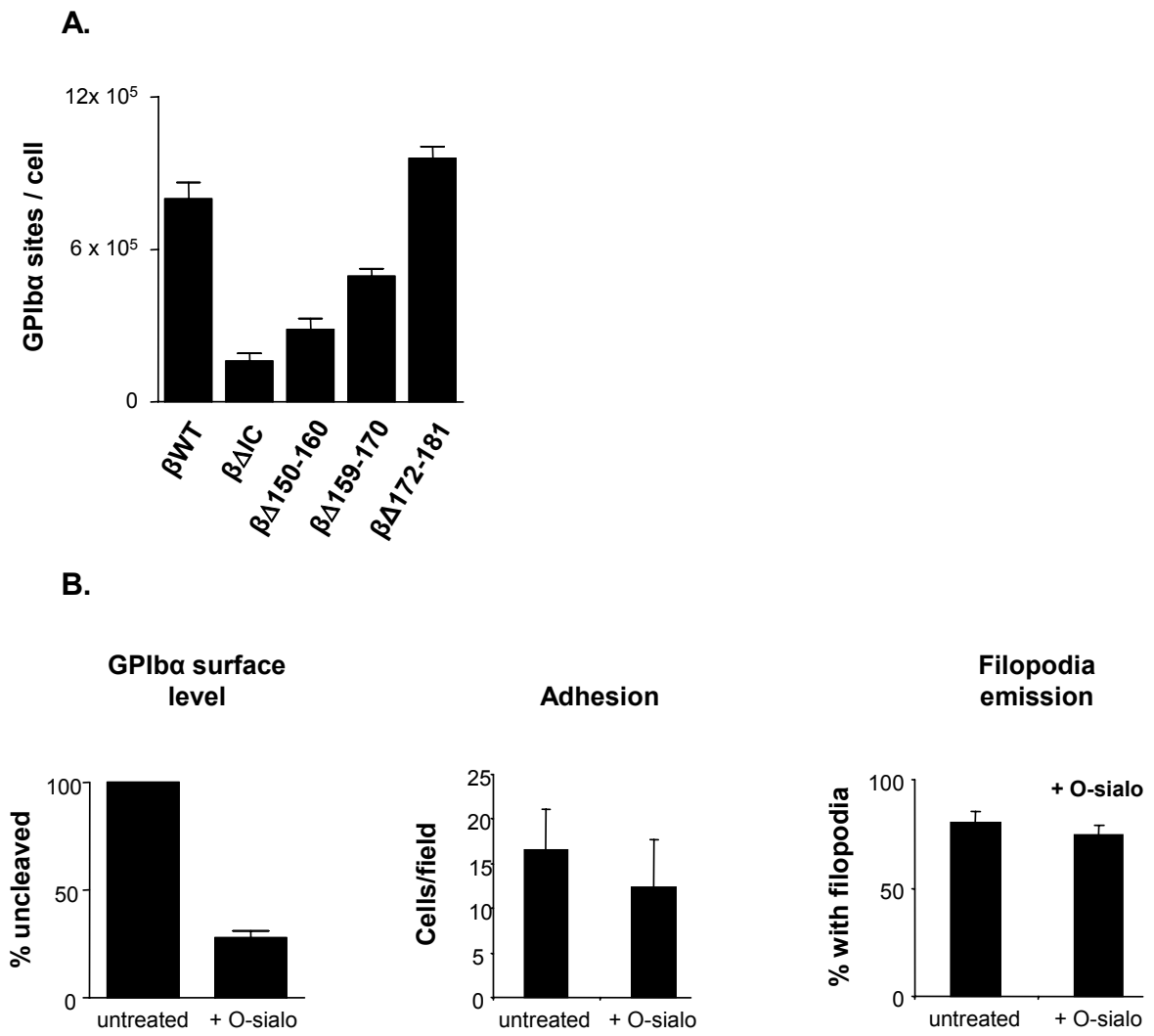


Figure 5.

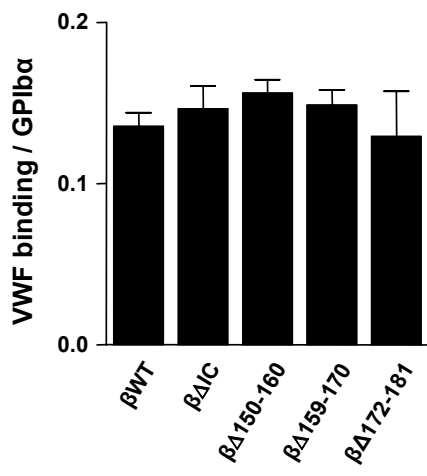


Figure 6.

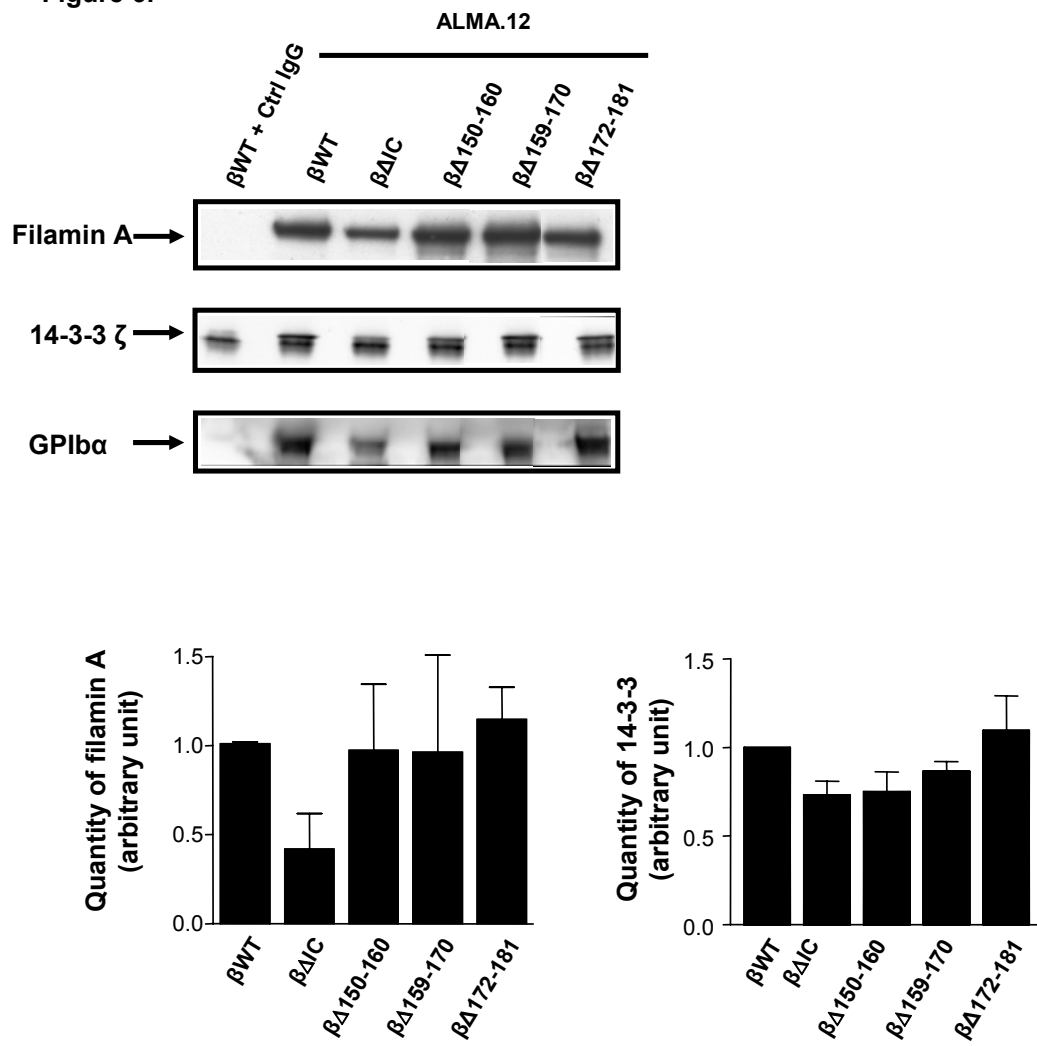


Figure 7.

A

Human GPIIb β intracellular sequence :

¹⁵⁰L-R-R-L-R-A-R-A-R-A-R-A-A-A-R-L-S-L-T-D-P-L-V-A-E-R-A-G-T-D-E-S¹⁸¹

B

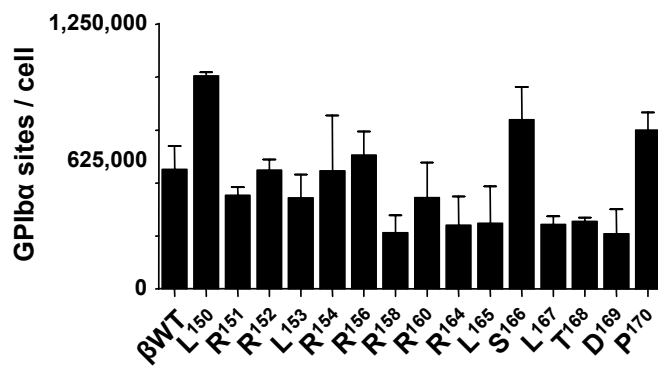
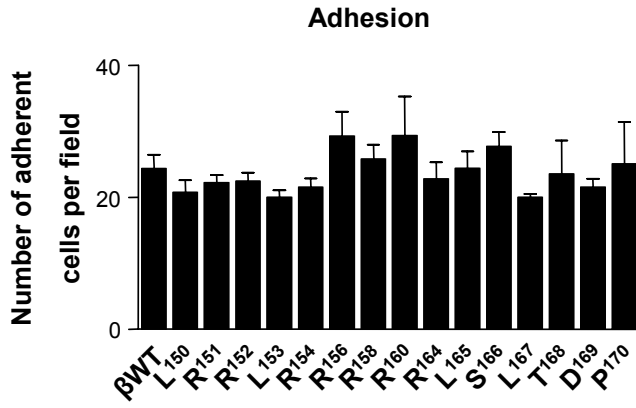


Figure 7.

C



D

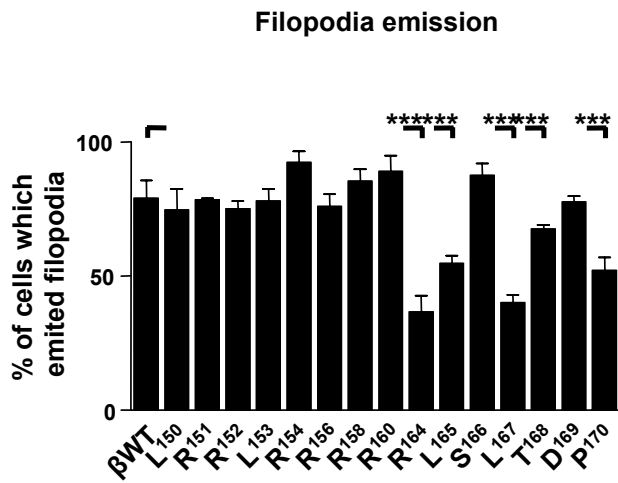
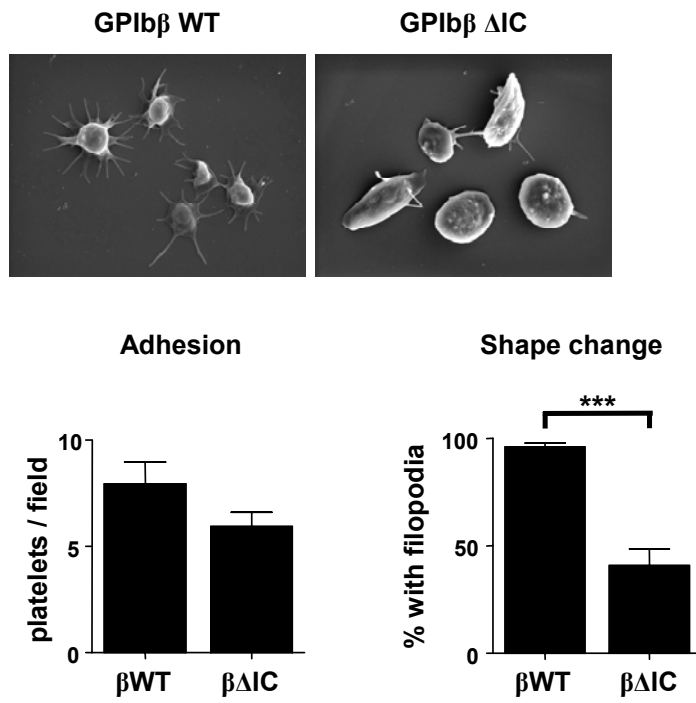


Figure 8.



Conclusion

Le résultat principal de cette étude a été l'identification d'une région fonctionnelle dans le domaine intracellulaire de la GPIIb β , impliquée dans la signalisation du complexe GPIIb-V-IX menant à l'émission de filopodes. Les cellules exprimant une GPIIb β tronquée des zones 150-160 et 159-70 montrent une capacité nettement diminuée à émettre des filopodes sur une matrice de FW. Une mutagénèse systématique de la région 150-170 par « alanine scanning » a de plus permis d'identifier des résidus importants pour cette réponse (Arg¹⁶⁴, Leu¹⁶⁵, Leu¹⁶⁷, Thr¹⁶⁸ et Pro¹⁷⁰). Le rôle fonctionnel de la GPIIb β a été par ailleurs conforté par l'étude de plaquettes de souris exprimant une GPIIb β tronquée du domaine cytoplasmique qui montrent une adhésion normale mais une production de filopodes réduite.

De manière étonnante, la délétion de la totalité du domaine intracellulaire de la GPIIb α ou des sites d'interaction pour la FLNA et la 14-3-3 ζ , n'a pas d'impact sur cette signalisation précoce. Ces données semblent contredire les résultats obtenus avec les peptides perméants de la GPIIb α , qui suggéraient un rôle du domaine 557-569. Un modèle possible pour réconcilier ces deux observations serait de considérer une association fonctionnelle entre la GPIIb α et la GPIIb β où la GPIIb β serait impliquée dans la transmission du signal et la GPIIb α exercerait un contrôle négatif. Le peptide R9 α 557 pourrait en s'associant directement ou indirectement à la GPIIb α prévenir le déclenchement de la signalisation GPIIb β -dépendante. La délétion du domaine GPIIb β et du motif de signalisation (164-170) empêcherait elle directement l'initiation de l'activation. Il n'existe pas pour l'instant d'indication d'une association de ces deux sous unités pour étayer cette hypothèse.

Les délétions de la partie cytoplasmique de la GPIIb β entraînent à des degrés divers une baisse d'expression du complexe à la surface des cellules. L'hypothèse d'une diminution de la signalisation liée à une faible expression du récepteur semble contredite par l'activation normale de cellules où la GPIIb α a été clivée par l'*O*-sialoglycoprotéine endopeptidase. De plus, des expériences de liaison de FW ont pu déterminer que les complexes GPIIb-V-IX mutés au niveau intracellulaire avaient une capacité équivalente à lier le FW. Ces éléments indiquent que les délétions affectent vraisemblablement la cascade d'activation GPIIb-dépendante.

Ce travail constitue la seule étude systématique du domaine intracellulaire de la GPIIb β . Les travaux précédents se sont essentiellement attachés à étudier le rôle de la sérine en position 166, qui est phosphorylée par la PKA (Wardell et al. 1989). Cette phosphorylation contribue à l'association de la 14-3-3 ζ au complexe GPIIb-IX (mais de manière moindre que la

partie intracellulaire de la GPIb α) (**Calverley et al. 1998**) et contrôle positivement ou négativement (selon les laboratoires) les fonctions adhésives du complexe GPIb-V-IX (**Bodnar et al. 2002; Perrault et al. 2003**). Ce travail montre que la mutation en alanine de cette sérine n'a pas d'effet sur la production de filopodes en réponse au FW, ce qui exclut un rôle dans la signalisation précoce du complexe GPIb-V-IX.

Des expériences de co-immunoprécipitation montrent une association normale de la 14-3-3 ζ et de la FLNA au complexe GPIb-IX pour les différents clones exprimant une GPIb β modifiée. Ces résultats éliminent un rôle de ces deux partenaires dans la signalisation. La zone 150-170 contiendrait d'après Andrews *et al.*, un site d'interaction pour la calmoduline (149-167) (**Andrews et al. 2001**). Il est donc envisageable que l'absence de liaison de calmoduline puisse contribuer au défaut de signalisation observé dans les clones $\beta\Delta 150-160$ et $\beta\Delta 159-170$. Malheureusement, cette hypothèse n'a pas pu être évaluée car nous n'avons pas pu observer de coprécipitation entre GPIb-IX et la calmoduline dans les lignées exprimant le complexe GPIb-IX normal.

Bien que la zone 164-170 de la GPIb β , soit clairement impliquée dans l'activation du complexe GPIb-V-IX, elle semble n'avoir qu'un rôle incomplet. En effet, aucune des mutations dans cette région n'empêche complètement l'émission de filopodes sur une matrice de FW. Des doubles ou des triples mutagénèses de ce domaine pourraient avoir des répercussions plus importantes sur la fonction. Une autre possibilité serait que le domaine intracellulaire de la GPIIX puisse également contribuer à cette activation. Enfin, les domaines N- et C-terminaux de la GPIb β pourraient également être impliqués bien que leur délétions ne révèlent pas de conséquence.

En conclusion, ce travail a permis d'identifier dans la partie cytoplasmique de la GPIb β une courte région fonctionnelle (164-170) impliquée dans l'activation dépendant du complexe GPIb-V-IX menant à l'émission de filopodes. Il reste à identifier quel est l'effecteur moléculaire associé à ce domaine permettant la transduction de ce signal

**Identification de la cyclophiline A comme nouveau partenaire
du complexe GPIb-V-IX.**

Publication n° 3 :

**“Identification of Cyclophilin A as a new intracellular partner of the platelet GPIb-V-IX
complex.”**

Tovo David, Virginie Wurtz, Nicolas Receveur, Anita Eckly, Alain Van Dorsselaer, Jean
Pierre Cazenave, Christian Gachet and François Lanza

En préparation.

Introduction

La liaison du FW au complexe GPIb-V-IX déclenche une signalisation encore mal caractérisée qui implique une src kinase, la PLC γ_2 , la libération de calcium intracellulaire et le remaniement du cytosquelette d'actine. Cette signalisation va également contribuer à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Les données existantes et les deux travaux précédents impliquent les domaines intracellulaires de la GPIb α et de la GPIb β dans cette activation. On ignore encore comment ces domaines transmettent l'information et quels sont les effecteurs directs. Le complexe ne porte pas de motif de signalisation connu et ne présente pas d'activité enzymatique suggérant un relais par des protéines interagissant avec les domaines intracellulaires. A ce jour, 3 protéines ont été décrites capables d'interagir directement: la FLNA (**Cranmer et al. 2005; Nakamura et al. 2006; Williamson et al. 2002**), la 14-3-3 ζ (**Bodnar et al. 1999; Feng et al. 2000; Mangin et al. 2004**) et la calmoduline (**Andrews et al. 2001**). Le travail précédent basé sur l'étude de lignées CHO exprimant des formes tronquées incapables de lier la 14-3-3 ζ ou la FLNA a permis d'écarter la contribution de ces deux protéines. L'intervention de la calmoduline dans cette activation est encore indéterminée.

L'objectif de ce travail a été d'identifier de nouvelles protéines cytoplasmiques associées au complexe GPIb-V-IX, qui pourraient être impliquées dans la voie de signalisation dépendante de ce récepteur. Notre approche a été d'immunoprécipiter le complexe GPIb-V-IX à partir de lysats plaquettaires, et d'identifier les protéines associées après séparation sur gel SDS-PAGE en une dimension, digestion tryptique et analyse par spectrométrie de masse de type Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS). Parmi les protéines identifiées, la cyclophiline A (CypA) a été particulièrement étudiée. Cette protéine de 18 kDa fait partie de la famille des immunophilines. Elle est le ligand d'un agent immunosuppresseur, la cyclosporine A (CsA), et porte une activité peptidyl-prolyl-isomérase favorisant le repliement de protéines présentant un motif riche en proline (**Yao et al. 2005**). Ses capacités à réguler l'activité de l'IL-2-inducible-T-cell kinase (ITK) dans le lymphocyte T (**Colgan et al. 2004**) ou de la calcineurine (**Fruman et al. 1992; Liu et al. 1991**), une calcium/calmoduline-dépendante serine/thréonine phosphatase, font de la CypA un candidat comme partenaire de signalisation dans la plaquette.

Après vérification de l'association entre GPIb-IX et CypA et de sa spécificité par des techniques immunochimiques, l'étude du mode d'interaction a été entreprise dans des lignées

CHO-GPIb-IX contenant des mutations des domaines intracellulaires de la GPIb α et de la GPIb β . Une interaction possible via la 14-3-3 ζ a été révélée et confirmée en utilisant des protéines recombinantes. Enfin, le rôle fonctionnel a été évalué dans la plaquette après traitement par la CsA et dans les plaquettes de souris déficientes en CypA.

Identification of cyclophilin A as a new intracellular partner of the platelet GPIb-V-IX complex.

Running head: Cyclophilin A, a new intracellular partner of the platelet GPIb-V-IX complex

Tovo David¹, Virginie Wurtz¹, Nicolas Receveur¹, Anita Eckly¹, Alain Van Dorsselaer², Jean-Pierre Cazenave¹, Christian Gachet¹, François Lanza^{1*}.

¹ Inserm, U311, Strasbourg, F-67065, France; EFS-Alsace, Strasbourg, F-67065, France; Université Louis Pasteur, Strasbourg, F-67070, France

² Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Ecole de Chimie, Polymères et Matériaux (ECPM), Université Louis Pasteur and CNRS, 25, rue Becquerel, 67087 Strasbourg cedex 2, France.

* To whom correspondence should be addressed:

François Lanza, INSERM U.311, Etablissement Français du Sang-Alsace,
10 rue Spielmann,
BP 36,
67065 Strasbourg Cedex, France

Tel: +33.388.21.25.25

Fax: +33.388.21.25.21

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

ABSTRACT

Under high shear rate conditions, the binding of the platelet GPIb-V-IX complex to the von Willebrand Factor (vWF) ensures platelet adhesion at sites of vascular lesion. This interaction initiates a partially characterized signalling leading to platelet shape change and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation. In this study, GPIb immunoprecipitation followed by mass spectrometry analysis of coprecipitated proteins identified cyclophilin A (CypA) as a possible intracellular effector. Western blot analysis of GPIb immunoprecipitates confirmed CypA association in platelets and CHO GPIb-IX transfectants. CypA was not precipitated with integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and GPVI. CHO GPIb-IX cells expressing GPIb α and GPIb β deleted in their intracellular domains established a requirement of these two regions for CypA coprecipitation and pointed to an important role of the 14-3-3 ζ binding sites in GPIb α . Interaction between purified CypA and 14-3-3 ζ was demonstrated in pulldown and Biacore assays. Fluorescent confocal microscopy showed a colocalization at the plasma membrane/cytosolic interface of GPIb-CypA in resting platelets. Cyclosporin A, a CypA inhibitor, did not affect vWF-induced adhesion and shape change responses but enhanced platelet aggregation induced by ADP and collagen. Platelets from CypA knock-out mice displayed normal adhesion but defective filopodia formation on a vWF matrix. Defective spreading was observed on collagen or fibrinogen coated surface. These results suggested that CypA is an intracellular regulator of GPIb-vWF dependent activation but also suggest a more general role in shape change responses following platelets adhesion.

Introduction

Following vascular injury platelets adhere, become activated and form aggregates on the exposed subendothelial matrix, thus allowing cessation of bleeding. An exaggerated activation of platelets participates in the development of pathological thrombotic events, leading to stroke and myocardial infarction. Under high shear rate conditions, platelet adhesion to the subendothelium is highly dependent on the interaction between the platelet GPIb-V-IX complex and von Willebrand Factor (vWF) (**Berndt et al. 2001**).

The GPIb-V-IX complex is formed by the association of four transmembrane glycoproteins, GPIb α disulphide-linked to GPIb β itself non-covalently associated to GPV and GPIX. Besides allowing platelet adhesion, vWF binding to GPIb α triggers an intracellular signal which is still incompletely characterized, but requires as an early effector a src kinase which leads to Phospholipase C γ_2 activation and the release of calcium from internal stores (**Mangin et al. 2003; Suzuki-Inoue et al. 2004; Wu et al. 2001**). As a result, the platelet actin cytoskeleton is remodelled with a characteristic shape change from a disc to a sphere extending filopodia (**Mangin et al. 2003; Yuan et al. 1999**). This signalling also contributes to the activation of the $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin necessary for establishing stable adhesion, spreading on the vWF coated surface and for recruiting additional platelets to form an aggregate (**Kasirer-Friede et al. 2004**).

Several lines of evidence indicate that the intracellular domains of the GPIb-V-IX complex are involved in regulating its adhesive and signalling functions. Intracytoplasmic portions of the GPIb α or GPIb β coupled to cell-penetrating-peptides or to palmytoyl groups induced inhibition of adhesion and shape change of intact platelets mediated by vWF (**David et al. 2006, accepted, JTH**)(**Dai et al. 2005; Feng et al. 2003; Martin et al. 2003**). CHO cells transfected with a GPIb-(V)-IX complex containing intracellular mutations of GPIb α or GPIb β intracellular domains also demonstrated defects in cell adhesion and/or spreading on a vWF coated surface (**Bodnar et al. 1999; Mangin et al. 2004; Perrault et al. 2003; Williamson et al. 2002**).

Since the intracellular domains of the GPIb-V-IX complex are devoid of known signalling motifs or enzymatic activity, it is likely that the intracellular functions of the receptor require interaction with adaptator proteins. Several proteins have been described to associate with the cytoplasmic part of the complex. Filamin A (FlnA), an actin binding

protein, interacts with the GPIb α subunit in a region comprising residues 557 to 579 (Cranmer et al. 2005; Nakamura et al. 2006; Williamson et al. 2002). FlnA is thought to maintain resting platelets in a discoid shape (Lopez et al. 1998) and to anchor the receptor to the membrane actin cytoskeleton, thus allowing resistance to platelet detachment under high shear conditions (Williamson et al. 2002). A second partner is the adaptor protein 14-3-3 ζ which has three phosphoserine-containing binding sites on the GPIb α and GPIb β subunits (Bodnar et al. 1999; Bodnar et al. 2002; Du et al. 1996; Feng et al. 2000; Mangin et al. 2004). 14-3-3 ζ has been implicated in regulating the adhesive functions mediated by the GPIb-V-IX complex (Dai et al. 2005) and in the activation leading to the $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin mobilization (Bialkowska et al. 2003; Bodnar et al. 1999; Mangin et al. 2004). A third protein, calmodulin, has been found to associate with the GPIb β and GPV subunits, but its contribution to the GPIb-V-IX complex function is still unknown (Andrews et al. 2001). Additional intracellular proteins such as the p85 subunit of PI 3-kinase, α -actinin and SHIP-2 have been proposed to interact with the complex but likely through indirect mechanisms of association to direct partners such as 14.3.3 ζ /PI3K or via the actin cytoskeleton (Dyson et al. 2003; Feng et al. 2002; Munday et al. 2000)

None of the direct partners of the complex (FlnA, 14.3.3 ζ , calmodulin) appears to satisfy the requirements taking part in the initial activation leading to platelet shape change and ultimately to $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin mobilization. Therefore, the objective of this study was to explore for novel intracellular partners of the GPIb-V-IX complex in order to identify relevant intracellular effectors. Several proteins were identified associated with the GPIb-V-IX following immunoprecipitation of platelet lysates, single dimension SDS-PAGE, in gel separation and trypsin digestion, and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. Among these candidates, cyclophilinA (CypA) was studied further as it has been implicated in cell activation in T-cells. CypA is a 18 kDa ubiquitous protein which belongs to the immunophilins family, recognizes prolin rich motifs, has a prolyl-isomerase activity and is the target of immunosuppressive agent Cyclosporin A (CsA) (Yao et al. 2005). CypA expression in platelets and its specific association with the GPIb-V-IX receptor were confirmed by immunoblotting. Association likely occurs through an indirect interaction with the 14-3-3 ζ protein. CypA was observed in the cytosol and the membrane where it colocalized with the GPIb-V-IX complex in resting platelets and CHO GPIb-IX transfected cells. Platelets from CypA knock-out mice displayed a decreased shape change when adhering to vWF, but also on fibrinogen and collagen, suggesting a more general role of CypA in intracellular signalling in response to platelet adhesion.

Material and methods

Reagents. Apyrase was purified from potatoes as previously described (Cazenave et al. 2004). Human vWF (hvWF) was purified from plasma cryoprecipitates by gel filtration according to a published procedure (Toti et al. 1992). Botrocetin and bovine vWF were kindly provided by Dr SP. Jackson (Melbourne, Australia). WM23 a monoclonal antibody (mAb) directed against the GPIb α subunit was a generous gift from Dr MC. Berndt. Eptifibatide was from GlaxoSmithKline (Middlesex, United Kingdom). mAb 3J24 directed against human GPVI was kindly provided by Dr M. Jandrot-Perrus (Paris, France). Anti-GPVI human serum was obtained from patient plasma (gift of Prof M. Okuma, Kyoto, Japan). Human serum albumin (HSA) was from EFS-Alsace (Strasbourg, France). mAbs ALMA.12 (against human GPIb α), ALMA.16 (against human GPIX), ALMA.17 (against human $\alpha_{11b}\beta_3$), SDF.3 (against human β_3) and RAM.1 (against GPIb β) were produced in our laboratory. Bovine serum albumin (BSA), MOPC-31 a mouse IgG1 κ isotype control, 1,10-Phenanthroline monohydrate, saponin, human purified fibrinogen and ADP were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Paraformaldehyde (PFA) was from EMS (Washington). Goat anti mouse antibody (GAM), goat anti rat antibody (GARRat), horseradish peroxidase-conjugated GAM and goat anti-rabbit (GAM-HRP and GAR-HRP), biotin-conjugated goat anti-human IgG and FITC conjugated GAM and GAR were provided by Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). A polyclonal antibody directed against CypA was from ABR Affinity Bioreagents (Golden, CO). ζ (C-16) a rabbit polyclonal antibody directed against 14-3-3 ζ was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Calpeptin, *N*-ethylmaleimide (NEM) and Cytochalasin D were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). ECL reagents, Hyper-film-ECL, DNase I and protein G-Sepharose were from Amersham Bioscience (Uppsala, Sweden). Complete protease inhibitor cocktail was provided by Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). Laemmli buffer, Tween 20, Ready gels (4-15%) were purchased from Bio-rad SA (Ivry sur Seine, France). Immunoblotting PVDF membranes were from Millipore (Billerica, MA). Equine tendon collagen (a mixture of types I and III) were obtained from Nycomed (Münster, Germany), and human fibrinogen was obtained from Kabi (Stockholm, Sweden). Cyclosporin A was purchased from LC laboratories (Woburn, MA) and Abciximab from Lilly Corporate Center (Indianapolis, IN).

Platelet preparation. Washed human platelets were prepared from acid citrate dextrose (ACD) anticoagulated blood obtained from aspirin-free healthy volunteers by sequential centrifugation as previously described (**Cazenave et al. 2004**). Platelets were kept at 37°C in Tyrode's HEPES buffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 5 mM HEPES, pH 7.3) containing 0.35% HSA and apyrase throughout all experiments. Washed mouse platelets were prepared according to a previously described method (**Moog et al. 2001**). Mouse blood was taken from the abdominal aorta of anesthetized animal and collected on ACD.

Cell lines. CHO cell lines stably expressing the wild type GPIb-IX complex or GPIb α deleted forms of GPIb-IX have been described previously (**Cranmer et al. 1999; Perrault et al. 2003; Williamson et al. 2002**). Stable cell lines with deletion or Alanine mutation of the intracellular domain of the GPIb β were obtained following transfection of the GPIb β cDNA into GPIb α IX expressing cells (**Strassel et al. 2006**). Oligonucleotide directed mutagenesis was performed by PCR amplification of PDXGPIb β vector (kindly provided by J Lopez, Houston, USA) with Pfu DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA), digestion with Dpn I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) and transformation in TOP10 bacteria (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Plasmids purified with Plasmid Endofree (Qiagen, Valencia, CA, USA) were transfected at a fixed amount (0.5 μ g) with 0.05 μ g of pDR2 (Clontech, San Jose, CA, USA) using FUGENE6 (Roche-diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Positive cells were selected in the presence of Hygromycin (200 μ g/mL) (Boehringer-Mannheim, Germany) two days after transfection.

Immunoprecipitation and immunoblotting of platelet and CHO cell lysates. Platelets (1.5 x 10⁸ platelets/point) or cells (5 x 10⁶ cells/point) were washed twice in PBS and then lysed for 1 hour in ice-cold cell lysis buffer containing 10 mM Tris, pH 7.5, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM Na₃VO₄, 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 2 μ M calpeptin, 10 mM 1,10-Phenanthroline monohydrate and 1X protease inhibitor cocktail. In some experiments platelets were pretreated with DNase I (3 mg/ml) in the presence of 1 mM Ca²⁺, cytochalasin D (10 μ M) or NEM (10 mM) for 10 min at 37°C. Following centrifugation at 14,000 g for 30 min at 4°C, the supernatant was cleared once for 2 hours at 4°C by incubating with a mixture of protein G-Sepharose beads (50 μ l slurry), non immune mouse serum (1 μ l/100 μ l of lysate)

and GAM IgG (1 µg/100 µl of lysate) and a second time for 1 hour at 4°C with 50 µl of protein G-Sepharose beads. Lysates (250 µg of protein) were incubated with MOPC.31, Rat IgG1, ALMA.12, ALMA.16, ALMA.17, or RAM.1 (5 µg) for 1 hour at 4°C and 50 µl of protein G-Sepharose beads were then added for 1 hour at 4°C. Immunoprecipitated proteins were separated on a 4-15% SDS-PAGE gel (under 10 mM DTT reducing conditions) and transferred to PVDF membranes. For GPVI immunoprecipitation, 500 µg of platelet proteins were used with 10 µg of 3J24 and immunoprecipitated proteins were solubilised in laemmli buffer under non reducing conditions. After saturation with 5% (wt/vol) milk blocking solution in PBS containing 0.05% (wt/vol) Tween-20, the membranes were blotted with either WM23 (1 µg/ml), SDF3 (1 µg/ml) or anti-CypA (1/1000). Membranes were washed and revealed with GAM-HRP or GAR-HRP and ECL western blotting detection kit. For anti GPVI western blots, membranes were incubated with an human anti-GPVI serum (1/100), then washed and primary antibodies recognized by biotin-coupled goat anti human IgG (1/20,000) were revealed by HRP-labelled streptavidin (1/20,000) and ECL western blotting detection kit. Intensities of the GPIb α and CypA bands were quantified by densitometry using an Umax Powerlook 1120 scanner and the ImageQuant TL software (Amersham Bioscience)

GST fusion protein expression and pull down assay. Full-length human CypA (GenBank P62937), 14-3-3 ζ (NCBI NM003406) or the first extracellular loop of PAR1 receptor (R²⁴-S⁹⁹) fused to glutathione-S-transferase (GST) were cloned in *pGEX-3T* BamHI and XhoI sites (Pharmacia) and transformed into BL21 DE3 *Escherichia coli*. Fusion proteins were produced by incubation under agitation for 4 hours at 30°C following induction with 0.2 mmol/l isopropyl b-D-thiogalactopyranoside. Proteins were purified after bacterial lysis using freezing/thawing in Bacterial buffer (PIERCE), centrifugation at 11000 rpm for 30 min at 4°C and chromatography on glutathione Sepharose 4B beads (Amersham Pharmacia Biotech). The untagged protein was released by incubating the beads with Prescission Protease overnight at 4°C. Pull-down of CypA or 14-3-3 ζ (2.5 nmol) with GST, CypA-GST, 14-3-3 ζ -GST or PAR1-GST (0.5 nmol) were performed by incubating for 1 hour at 4°C in cell lysis buffer. Protein complexes were captured with 40 µl of glutathione Sepharose 4B beads, washed 5 times for one hour with lysis buffer and analyzed by western blots with ζ (C-16) (400 ng/ml) or anti CypA (1/1000).

Surface Plasmon Resonance experiments. Assays were performed on a Biacore 2000 instrument equilibrated at 25°C with HBS-EP at a flow rate of 20 µl/min. The anti-GST

antibody was covalently immobilized, using the Amine Coupling Kit (Biacore International AB, Uppsala, Sweden), on the carboxymethylated surface of flow cells of a CM5 sensor chip. Two negative controls (GST and PAR.1-GST) and 14.3.3-GST and CypA-GST were captured respectively on flow cell 1 to 4 at different concentrations (5 µg/ml for negative controls and 50 µg/ml for interest proteins). CypA or 14.3.3 was then injected on flow channels for 3 min. The dissociation of the complexes was followed for 200 s. Between binding cycles, the coated surfaces were regenerated by two injections of 10 mM HCl. The association and dissociation profiles were analysed with a nonlinear least-squares algorithm implemented in the Biaevaluation 3.0 software (Biacore International AB).

Mouse strains. CypA^{-/-} (Colgan et al. 2004) and CypA^{+/+} mouse colonies were established at the animal facilities of the Etablissement Français du Sang-Alsace by breeding the CypA heterozygotes provided by the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA).

Cell adhesion assays. Adhesion of platelets or CHO GPIb-IX cells on a von Willebrand factor matrix was studied as previously described (Yuan et al. 1999). Briefly, platelets (3 x 10⁷/ml) in Tyrode's albumin buffer were treated with 40 µg/ml Abciximab and allowed to adhere to cover slips coated with hvWF (10 µg/ml) for 15 min in the presence of 5 µg/ml botrocetin. For platelet spreading studies, adhesion time was increased to 30 min in the absence of Abciximab. CHO GPIb-IX cells (10⁶ cells/ml in PBS) were allowed to adhere on vWF for 30 min in the presence of 5 mM EDTA for integrin blockade and for cell spreading, adhesion was performed for 60 min in the presence of Ca²⁺ (1 mM) and Mg²⁺ (1mM). Non-adherent cells were gently washed away and adherent cells were fixed with 4% PFA for 15 min. To visualize unstimulated platelets and CHO cells, cells were fixed in suspension and captured on 0.01% poly-L-lysine coated coverslips for 30 min at room temperature

Confocal microscopy. Cell adhesion was performed as described above and fixed cells were washed in PBS and incubated twice with 100 mM PBS-glycine pH7 for 10 min at room temperature. After 3 additional washes, cells were permeabilized for 20 min at room temperature in PBS-0.05% saponin-0.2% BSA and incubated with anti-CypA (1/100) for 20 min. The cells were then washed 3 times with PBS, incubated with FITC coupled GAR. After 3 additional washes cells were incubated with 1 µg/ml of Cy3 coupled RAM.1, washed 3 times then subjected to fluorescence confocal microscopy using a Leica TCS SP5 laser

scanning microscope (Leica Microsystems SA, Wetzlar, Germany) equipped with a Planapo oil-immersion lens (63x, numerical aperture 1.4). FITC emission was excited with the 488 nm Ar laser line and signals were filtered with a band-pass 490-535 nm filter, while Cy3 emission was excited with the 543 nm He/Ne laser line and signals were filtered with a band pass 588-675 nm filter. Images were acquired and analysed with LAS AF software (Leica Microsystems SA)

Platelet aggregation. Platelet aggregation was studied in a dual-channel Payton aggregometer (Payton Associates, Scarborough, Ontario, Canada). A 450- μ l aliquot of platelet suspension (3×10^8 /ml), pretreated with CsA (1 or 5 μ g/ml) or with an equal volume of ethanol for 10 min at 37°C, was stirred at 1,100 rpm and activated by the addition of different agonists in the presence of human fibrinogen (0.8 mg/ml) in a final volume of 500 μ l. The extent of aggregation was estimated from the curve by measuring the maximal curve height above baseline. Platelet agglutination was studied in the presence of bovine vWF (1.25 μ g/ml) and with 40 μ g/ml Abciximab.

Analysis of platelet adhesion and shape change by cytofluorescence and scanning electron microscopy. Human platelet adhesion assays on vWF were carried out as described above. The fixed adherent platelets were stained with 2 μ g/ml TRITC-phalloidin for 30 min. After 3 washes in PBS and a last wash in water, the adherent cells were covered with 13 μ l of Mowiol 4-88 solution (France Biochem, Meudon, France) and the cover slips were mounted on microscope slides. Fluorescence was visualized by UV illumination at 570 nm under a Leica DMDL microscope (Leica Microsystems SA) using a Planapo oil-immersion lens (63x, numerical aperture 1.32). Image acquisition and analysis were performed with Metamorph software (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA). The number of adherent platelets was determined in 5 random fields corresponding to a total surface of $11 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ and the number of filopodia was counted on each tethered platelet. Shape change was scored as 1 to 8 according to the number of filopodia per platelet, as 10 for more than 8 filopodia and as 11 for spread platelets.

Washed mouse platelets (3×10^7 / ml) were allowed to adhere for 30 min at 37°C on a surface coated with 20 μ g/ml vWF in the presence of 40 μ g/ml Eptifibatide and 10 μ g/ml botrocetin, on collagen (2.5 mg/ml) or on purified mouse fibrinogen (200 μ g/ml). For fibrinogen, prior stimulation of platelets with 10 μ M ADP for 2 min at 37°C was performed. Adherent cells

were gently washed away with PBS and then samples were processed for Scanning electron microscopy analysis (SEM) (Ohlmann et al. 2000). Platelets were fixed for 45 min with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3, 305 mOsm/Kg) containing 2% sucrose. Fixed cells were washed, dehydrated in ethanol solutions, air-dried with hexadimethyldisilazane, sputtered with gold and examined under a scanning electron microscope (Fei Sirion, Eindhoven, The Netherlands) (5kV). The number of adherent cells was determined on 5 different fields corresponding to a total surface of 14,375 μm^2 , and on the same fields filopodia were counted on each tethered platelet. Shape change was scored similar as described above.

Statistical analyses. The statistical significance of differences between means was evaluated using a one-way Anova test followed by a Tukey's multiple comparison post test and p values of less than 0.05 were considered to be significant. The variation of means was calculated as the standard deviation.

Results

CypA specifically associates with the GPIb-V-IX complex

Analysis of platelet proteins co-immunoprecipitated by mAb ALMA.12 by in gel trypsin digestion followed by mass spectrometry identified 6 potential partners among which known partners as FlnA and 14.3.3 ζ but not calmodulin, PI3K, α -actinin, GPVI or SHIP-2 (see supplementary material). Among the novel candidates we focused our attention on cyclophilin A on the basis of a known role in signalling in other cells, such as T-cells, neutrophils or smooth muscle cells (Colgan et al. 2004; Jin et al. 2000; Konttinen et al. 2000). To confirm the results of mass spectrometry, Western blot analysis was performed on platelet lysates with a CypA polyclonal antibody following immunoprecipitation with several mAbs against the GPIb-V-IX complex. As depicted in Figure 1A, CypA was co-immunoprecipitated with the complex with ALMA.12, SZ2, WM23 against GPIb α , ALMA.16 (GPIX) and RAM.1 (GPIb β). When mAb against GPV was used no precipitation of CypA was observed. Lysis in Triton X-100 is known to dissociate GPV from the rest of the complex, suggesting that CypA interaction could occur through GPIb α , GPIb β or GPIX. Co-immunoprecipitation appeared to be specific for GPIb-IX as it was not observed with irrelevant Ig, with mAb ALMA.17 against integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ and with a mAb against the GPVI collagen receptor (figure 1B).

To evaluate the possibility of an interaction mediated by the actin cytoskeleton, platelets were treated with the F actin depolymerising agent cytochalasin D with DNase I or with NEM to disrupt the interaction with filamin A (**Berndt et al. 1985**). CypA coprecipitation was not affected by treatments with cytochalasin D or DNase I, but was abolished by NEM. In control experiments, cytochalasin D and DNase I did not perturb the 14-3-3 ζ or filamin A interaction with the complex (data not shown). Results with cytochalasin D and DNase I are consistent with linkage of CypA independently of the actin cytoskeleton, while the effects observed of NEM are difficult to interpret as this treatment did not, in our hands; disrupt filamin A interaction with GPIb-IX.

Role of the GPIb α and GPIb β intracellular domains for CypA interaction.

To identify the intracellular domains of GPIb-IX required for CypA interaction, CHO GPIb-IX cells were employed, containing deletions in the GPIb α and GPIb β intracellular segments. CypA co-immunoprecipitation was quantified in the different mutants by densitometry of the blots and corrected for the amount of GPIb α to account for differences in immunoprecipitation efficiencies (Figure 2). Deletion of the entire intracellular domain of GPIb α or truncations in its C-terminal portion (Δ 580-590 and Δ 591-610) completely inhibited CypA association, while deletion of the 557-568 region decreased it by 60%. On the other hand, removal of the entire GPIb β cytoplasmic domain or deletion of its membrane proximal region (Δ 150-160) led to about 61% reduction of CypA coprecipitation. More C-terminal deletions (Δ 159-170 and Δ 172-181) had minor consequences. These data suggested a requirement for the GPIb α and to a lower extent GPIb β intracytoplasmic domains in CypA association. They also pointed to a possible involvement of 14.3.3 ζ as the 580-590 and 605-610 regions are known to interact with 14-3-3 ζ (**Bodnar et al. 1999; Du et al. 1996; Mangin et al. 2004**)

Evaluation of the binding of CypA to 14-3-3 ζ .

A possible interaction between 14-3-3 ζ and CypA was evaluated in pull-down experiments with CypA and 14-3-3 ζ expressed as recombinant proteins, with or without a GST tag (Figure 3A). CypA was precipitated by 14-3-3 ζ -GST but not by PAR1-GST or GST used as negative controls. In the inverse experiment, 14-3-3 ζ was pulled-down by CypA-GST but not by PAR1-GST or GST. In a second approach, the same proteins were assayed for interaction by using Biacore. Similarly, a CypA-GST coated chip was able to capture 14-3-3 ζ and inversely CypA bound to a 14-3-3 ζ -GST chip (Figure 3B). CypA and 14-3-3 ζ are

therefore able to interact, providing a possible link for GPIb-V-IX–CypA co-immunoprecipitation.

Visualisation of CypA and GPIb in platelets and GPIb-IX transfected CHO cells by confocal microscopy.

To examine whether CypA and the GPIb-V-IX colocalized in intact cells, platelets and GPIb-IX transfected CHO cells were examined by double labelling immunofluorescence confocal microscopy. In resting platelets captured on poly Lysine, CypA labelled in green was observed with a diffuse distribution in the cytoplasm and also at the plasma membrane. When the signal was merged with that of GPIb, labelled in red, a discrete yellow rim was visualized just below the plasma membrane (Figure 4A) consistent with a membrane CypA pool in close proximity with GPIb-V-IX. A similar observation was made in CHO GPIb-IX cells where CypA and GPIb labelling clearly colocalized in the membrane region (Figure 4B). When platelets were plated on vWF in the presence of botrocetin and a α IIB β 3 blocker, they extended filopodia. Under these conditions, GPIb was found along the membrane in the cellular body and also in the filopodia extensions. CypA retained a cytoplasmic and membrane labelling but did not relocalize along the filopodia, as shown by a red labelling of these structures in merged images (Figure 4A). A similar observation was made in CHO cells following vWF adhesion in the presence of EDTA (Figure 4B). Platelets and cell were about to spread in the absence of a α IIB β 3 blocker. CypA labelling was weak and dispersed within the cytosol and was not visible along the membrane regions. GPIb showed a diffuse and homogenous staining with some protein localized at the leading edge.

Effect of Cyclosporin A on platelet adhesion on vWF and platelet aggregation

To evaluate a role of CypA in vWF-dependent adhesion and activation, platelets were treated with cyclosporine A (CsA). CsA associates to CypA and blocks its peptidyl-prolyl-isomerase activity. In addition, a CsA-CypA complex abolishes the activity of calcineurin which is required for T lymphocyte activation (Fruman et al. 1992; Liu et al. 1991). CsA treated platelets adhered normally on a vWF matrix and displayed efficient filopodia extension and platelet spreading (Figure 5A). On the other hand, a modest augmentation (+19%) of vWF induced platelet agglutination was observed in CsA treated platelets (1 μ g/ml). In response to other agonists, CsA increased by ~40% platelet aggregation induced by ADP and by collagen (Figure 5B). These results indicated that CsA-inhibited functions of

CypA are not involved in adhesive and signalling in response to vWF. CypA could however control other pathways, since CsA increased the responses to ADP and collagen.

Platelet functions of CypA-deficient platelets.

To more directly evaluate the role of CypA in platelet adhesion and activation responses, we studied CypA^{-/-} mice. These mice have no overt developmental defect but are produced at a lower ratio than expected when crossing heterozygotes (~16%). They do not display spontaneous bleeding or thrombotic episodes. Bleeding times, performed with 4 animals were not significantly different from their wild type littermate controls (data not shown). The number and size of circulating platelets are normal (data not shown).

Washed platelet from CypA deficient mice were analyzed for adhesion on vWF, fibrinogen and collagen coated surfaces. Normal adhesion was observed on vWF but a defective ability to extend filopodia was observed with a ~50% decrease in the score when compared to CypA positive cells (Figure 6A). Defective activation was not restricted to GPIb-vWF dependent responses as abnormal spreading was observed in CypA^{-/-} platelets adhering to fibrinogen and to collagen matrices (Figure 6B and C). Influence on spreading cannot be assessed in mice platelets in response to human vWF.

Discussion

This study reports the identification of a new intracellular partner of the GPIb-V-IX complex. An association with cyclophilin A (CypA) has been revealed by GPIb immunoprecipitation of platelet lysates, followed by mass spectrometry and western blotting analyses of the coprecipitated material. The specificity of this interaction was indicated by a lack of CypA coprecipitation with two other platelet receptors, GPVI and the α IIb β 3 integrin, and by coprecipitation with GPIb in heterologous cells transfected with the GPIb-IX complex. Colocalization of GPIb and CypA at the plasma membrane in confocal microscopy studies indicated that this association also occurs in the intact cell. The interaction between GPIb and CypA could be indirect and take place via 14-3-3 ζ as it was lost in GPIb-IX cells lacking the 14-3-3 ζ binding sites on GPIb α . Functional studies in CypA deficient mice suggested that CypA is involved in GPIb-dependent activation leading to shape change in response to von Willebrand factor. Additional roles of CypA outside of GPIb are also suggested by an increased platelet aggregation in response to several agonists in the presence of cyclosporine

A and by a decreased platelet shape change in response to collagen and fibrinogen in the CypA KO mice.

CypA is a 18 kDa ubiquitous cytosolic protein which belongs to the immunophilins family, recognizes proline rich motifs, has a prolyl-isomerase activity and is the target of immunosuppressive agent cyclosporin A (CsA) (**Yao et al. 2005**). The function of CypA has been extensively studied in T lymphocytes. CypA was discovered through its strong interaction with CsA, the immunosuppressant which revolutionized organ transplantation (**Handschumacher et al. 1984**). CypA PPIase's activity appears irrelevant for the immunosuppressant effect (**Bierer et al. 1990**). Rather, the CypA- CsA complex binds and inhibits calcineurin, a calcium dependent serine-threonine phosphatase required for cytokine induction in response to TCR stimulation (**Fruman et al. 1992; Liu et al. 1991**). CypA appears to regulate TCR signalling by interacting with Itk, a tyrosine kinase required for Th2 function (**Colgan et al. 2004**).

The presence of CypA in platelets has been reported previously in a systematic mass spectrometry analysis of the platelet secretome (**Coppinger et al. 2004**). Cyp A was identified in platelet releasates following thrombin activation and was identified in vascular atherosclerotic lesions. A granular pool of CypA was visualized by immunofluorescence microscopy in the same study. In the present work we could not visualize CypA in platelet granules by confocal analysis. Additional immunolabelling studies with other CypA antibodies and with specific markers of the granular pool such as P-selectin or CD63 could help resolve this difference. Our work mainly revealed a cytosolic distribution of CypA and also identified a fraction located at the plasma membrane in close proximity with GPIb. A similar intracellular distribution was found in CHO cells transfected with GPIb-IX. In T cells CypA mainly distributes within the cytosol and the nucleus. CypA has been reported to interact with integral membrane proteins, such as the widely expressed CD147, also known as EMMPRIN, but this occurred through an extracellular pool of CypA released upon inflammation (**Yurchenko et al. 2002**).

The only indication to date of a role of CypA in platelets is indirect and came from studies examining the effect of CsA on platelet aggregation and secretion responses (**Fernandes et al. 1993; Fox et al. 2002; Naik et al. 1993; Suehiro et al. 2002**). These studies were prompted by the increased incidence of thrombotic events in grafted patients under CsA treatment (**Moien-Afshari et al. 2003; Vanrenterghem et al. 1985**). Increased platelet reactivity in response to ADP and to high shear were observed following incubation

with CsA. They were accompanied by increased calcium mobilization and protein phosphorylation of pleckstrin and myosin light chain. A similar activation was observed with immunosuppressants having different modes of action, such as Tacrolimus (**Fernandes et al. 1993; Suehiro et al. 2002**).

The association of CypA with the GPIb-V-IX complex was observed in unstimulated platelets and did not appear to occur through an interaction with the actin cytoskeleton. Our results did not however support a direct interaction between CypA and the GPIb-V-IX complex, contrary to what has been observed with partners such as filaminA, 14-3-3 ζ , and calmodulin. A first indication came from studies of CHO GPIb-IX cells expressing deleted forms of GPIb α and GPIb β . Strikingly, CypA coprecipitation was abolished in two clones with GPIb α deletions lacking 14-3-3 ζ association. Previous studies having established a direct interaction between 14-3-3 ζ and GPIb α (**Andrews et al. 1998; Du et al. 1996; Mangin et al. 2004**), these results suggest either a competition between CypA and 14-3-3 ζ for the same sites on GPIb α or that CypA requires 14-3-3 ζ for its association with GPIb. The later mechanism appears plausible based on the interaction of recombinant forms of CypA and 14-3-3 ζ observed in pull-down and Biacore assays.

A putative mode of interaction between these two proteins is still difficult to envision. Consensus Ser-containing motifs required for 14-3-3 ζ interaction were not identified in the CypA sequence and, inversely, a recently identified Gly-Pro-X-Leu-Pro motif found in known CypA interactants (**Piotukh et al. 2005**) was absent on 14-3-3 ζ . The association of CypA through 14-3-3 ζ could indicate a role of this protein in the activation of α IIB β 3 integrin. Indeed, mutations in CHO GPIb-IX cells and platelets which prevent 14-3-3 ζ binding, and as shown here CypA binding, have resulted in altered activation of α IIB β 3 integrin, although with opposing results depending on the studies (**Bialkowska et al. 2003; Gu et al. 1999; Mangin et al. 2004**).

A functional role of CypA in GPIb-dependent responses was only revealed in platelets from CypA knockout mice. Treatment with the CypA inhibitor, CsA, resulted as reported previously in increased platelet responses to several agonists, indicating a general but still unknown intracellular effect but CsA did not affect von Willebrand factor-induced platelet agglutination. Studies of CypA knockout platelets in adhesion assays on von Willebrand factor revealed a potential role for this partner in GPIb-dependent activation. Previous studies have shown that filopodia emission of platelets following adhesion on this matrix is an early and specific manifestation of GPIb signalling (**Yuan et al. 1999**). A clear defect in filopodia

formation was observed in CypA knock out mice suggesting an effector function of CypA possibly at an early stage in GPIb-signalling.

Confocal microscopy analysis of normal platelets adhering to von Willebrand factor indicated a dissociation of CypA from the GPIb-V-IX complex in filopodia structures. This suggested the existence of an uncoupling mechanism of the GPIb/14-3-3 ζ /CypA association during adhesion. A different localization of 14-3-3 ζ and GPIb during filopodia formation still needs to be evaluated but dissociation of the two proteins has been documented in sheared platelets (**Feng et al. 2000**). Also, a dissociation has been reported for PI3K during von Willebrand factor induced activation. PI3K, similarly to CypA, was found to interact with GPIb through an association with 14-3-3 ζ (**Munday et al. 2000**).

The role of CypA appears to be more general and to affect other adhesive responses in addition to GPIb-von Willebrand factor signalling. Platelets from CypA knockout mice had a lower capacity to spread on fibrinogen and collagen. Spreading on these matrices results from PLC γ 2 and PI3K-dependent activation leading to integrin engagement (**Watson et al. 2005**). An interesting possibility is that the absence of CypA would affect 14-3-3 ζ availability for its functions in integrin-induced cytoskeletal reorganizations (**Bialkowska et al. 2003**). CypA deficiency does not affect shape change of platelets in response to soluble agonists as measured in the aggregometer, suggesting some specificity towards adhesive responses.

As mentioned earlier, CypA associates with calcineurin to control T lymphocyte function. To our knowledge, calcineurin has not been identified in platelets. However, calcium- and integrin-binding protein (CIB), which bears homology to the regulatory subunit of calcineurin, is present in platelets (**Naik et al. 1997**). Interestingly, CIB appears to regulate focal adhesion kinase activity during platelet spreading on immobilized fibrinogen (**Naik and Naik 2003**). Another property of CypA documented in T lymphocytes is inhibition of ITK, a member of the Tec kinase family (**Colgan et al. 2004**). Members of this family are also found in platelets (Tec, Btk) where they contribute to the activation in response to collagen and to the “outside in “ signalling downstream of integrin α IIb β 3 (**Atkinson et al. 2003; Quek et al. 1998**). CypA could similarly modulate these platelet kinases and affect responses downstream of GPIb, GPVI and α IIb β 3.

In conclusion, this study has identified CypA as a new intracellular partner of the GPIb-V-IX complex. The role of this protein in platelet responses is starting to emerge from initial studies of CypA deficient mice. CypA appears to facilitate signalling in response to von Willebrand factor, but also to other adhesive ligands such as collagen and fibrinogen. The

exact place and importance of CypA in the GPIb-von Willebrand factor dependent signalling pathway and the molecular dissection of its interaction with a GPIb signalosome are interesting scopes for future research.

Legend to the figures

Figure 1: Specific coimmunoprecipitation of Cyclophilin A with the GPIb-IX complex.

A. Platelets lysed in 1% Triton X-100 were immunoprecipitated with monoclonal antibodies ALMA.12 (anti GPIb α), SZ2 (anti GPIb α), WM23 (anti GPIb α), ALMA.16 (anti GPIX) and RAM.1 (anti GPIb β). GPIb α and CypA were revealed by Western blotting with WM23 and anti cyclophilin A antibodies, respectively. The whole lysate and immunoprecipitation with non immune MOPC and rat IgG1 are also shown in lanes 1, 2 and 7. The gel is representative of 3 separate experiments.

B. Platelet lysates were immunoprecipitated with ALMA.12, ALMA.17 (anti $\alpha_{IIb}\beta_3$) and 3J24 (anti GPVI). GPIb α , CypA, $\alpha_{IIb}\beta_3$ and GPVI were revealed by Western blotting with WM23, anti cyclophilin A, SZ22 antibodies and an anti-GPVI human serum, respectively. The gel is representative of 2 separate experiments.

C. Prior to solubilisation, platelets were left untreated or treated with NEM (10 mM), cytochalasin D (5 μ M) or DNase I (3 mg/ml) with or without the presence of calcium. The GPIb-V-IX complex was immunoprecipitated with ALMA.12 (lane A) GPIb α and CypA were revealed by Western blotting as described in panel A (L: platelet lysate; M: MOPC). The gel is representative of 3 separate experiments.

Figure 2: Effect of GPIb α and GPIb β cytoplasmic tail deletions on CypA association to GPIb-IX.

CHO GPIb-IX cells containing deletions of the GPIb α (left panel) or GPIb β (right panel) intracellular domain were lysed in 1% Triton X-100 and GPIb-IX complexes were immunoprecipitated with mAb ALMA.12, separated by reduced 4-15% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. α WT and β WT are control cells expressing the normal complex. GPIb α and the co-immunoprecipitated CypA were detected using WM23 and a polyclonal anti cyclophilin A antibody. The coprecipitated CypA band was quantified by densitometry using an Umax Powerlook 1120 scanner and the Imagequant TL software (Amersham Bioscience, Upsala, Sweden). Amount of coprecipitated CypA was corrected for

the amount of GPIIb α to account for differences in immunoprecipitation efficiencies. Results are representative of 3 separate experiments and were expressed as the mean values (\pm SEM) in arbitrary units. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Figure 3: CypA binds the 14-3-3 ζ protein.

CypA and 14-3-3 ζ were expressed as recombinant proteins with or without a GST tag.

A. Pull down assay. CypA was incubated with 14-3-3 ζ -GST or PAR1-GST and GST used as a negative control in lysis buffer. The inverse pull-down experiment was performed where 14-3-3 ζ was incubated with CypA-GST or PAR1-GST and GST. Coprecipitated CypA and 14-3-3 ζ were revealed by Western blotting with anti cyclophilin A antibody and ζ (C-16) a rabbit polyclonal antibody against 14-3-3 ζ , respectively. The gel is representative of 2 separate experiments.

B. Biacore assay. An anti-GST antibody was covalently immobilized a sensor chip. Two negative controls (GST and PAR.1-GST) and 14.3.3-GST and CypA-GST were captured respectively at different concentrations (5 μ g/ml for negative controls and 50 μ g/ml for interest proteins). CypA or 14.3.3 was then injected on flow channels for 3 min. The dissociation of the complexes was followed for 200 s. Between binding cycles, the coated surfaces were regenerated by two injections of 10 mM HCl. The association and dissociation profiles were analysed with a nonlinear least-squares algorithm implemented in the Biaevaluation 3.0 software. Results are representative of 2 to 4 separate experiments.

Figure 4: Localization of GPIIb and CypA in platelets or GPIIb-IX transfected CHO cells under resting conditions or following adhesion on a vWF matrix.

For resting conditions, platelets (A) or CHO GPIIb-IX cells were fixed in suspension and captured on a poly-lysine coated coverslip. For vWF adhesion, cells were allowed to adhere on the matrix in the presence of botrocetin with (Abciximab, EDTA) or without integrin blockade. Cells were fixed and double labelled with CypA (in green) and GPIIb β (in red) antibodies. The right panel represents merged images of red and green fluorescence. Samples were subjected to fluorescent confocal microscopy analysis. Bars correspond to a 10 μ m distance.

Figure 5: Effect of cyclosporin A on platelet adhesion and aggregation responses.

A. Washed platelets were preincubated with vehicle or cyclosporine A (1 $\mu\text{g/ml}$) for 30 min at 37°C. Cells were then allowed to adhere to cover slips coated with human vWF in the presence of botrocetin with or without Abciximab (40 $\mu\text{g/ml}$). Platelets were fixed, labelled with TRITC-phalloïdin and examined by fluorescence microscopy. The number of adherent platelets was counted on 5 random fields and expressed as the number of adherent platelets per field. On the same fields, filopodia emission and spreading were scored as described in Material and methods. Values are the mean \pm SEM from 2 separate experiments.

B. Washed platelets were preincubated with vehicle or cyclosporine A (1 $\mu\text{g/ml}$ or 5 $\mu\text{g/ml}$) for 30 min. Platelet agglutination was triggered in the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ bovine vWF and Abciximab (40 $\mu\text{g/ml}$). Platelet aggregation was induced by addition of 5 μM ADP or 2.5 $\mu\text{g/ml}$ collagen in the presence of 0.8 mg/ml of fibrinogen and Values are expressed as a mean ratio of the responses of CsA versus vehicle value of maximal percentage of aggregation \pm SEM from 3 separate experiments.

Figure 6: Platelet adhesion and activation of CypA-deficient platelets on vWF, fibrinogen and collagen coated surfaces.

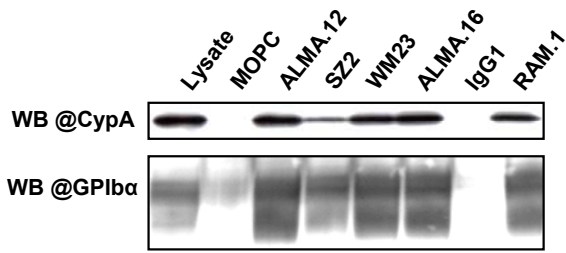
CypA $-/-$ and $+/+$ platelets were allowed to adhere on a vWF coated surface (20 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of botrocetin (10 $\mu\text{g/ml}$) and 40 $\mu\text{g/ml}$ Eptifibatide (**A**), on a collagen coated surface (2.5 mg/ml) (**B**), or after a prior stimulation with ADP (10 μM) on a fibrinogen coated surface (200 $\mu\text{g/ml}$) (**C**). Adherent cells were fixed and processed for scanning electron microscopy analysis. The number of adherent platelets was counted on 5 random fields and expressed as the number of adherent platelets per field. On the same fields, shape change was scored as described in Material and methods. For platelet adhesion on collagen, the number of spread platelets per field was evaluated. Values are the results from 1 experiment.

Acknowledgment

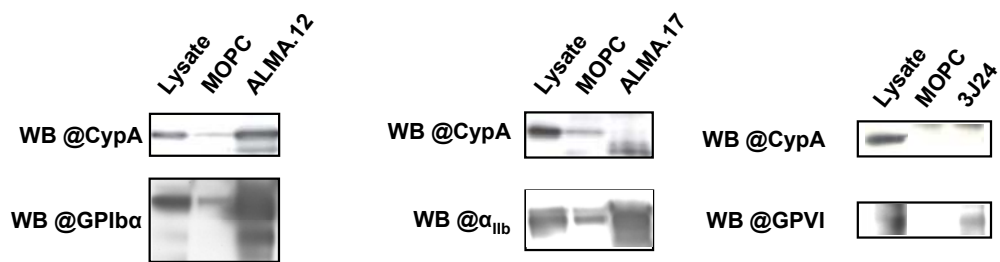
We thank Marie-Jeanne Baas, Martine Santer, Jean-Yves Rinckel and Nicolas Receveur for excellent technical assistance, Shaun Jackson and David Williamson for providing the GPIIb α mutant clones. Tovo David is supported by a grant from ARMESA (Association de Recherche et de Développement en Médecine et en Santé Publique) and GEHT (Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose).

Figure 1.

A.



B.



C.

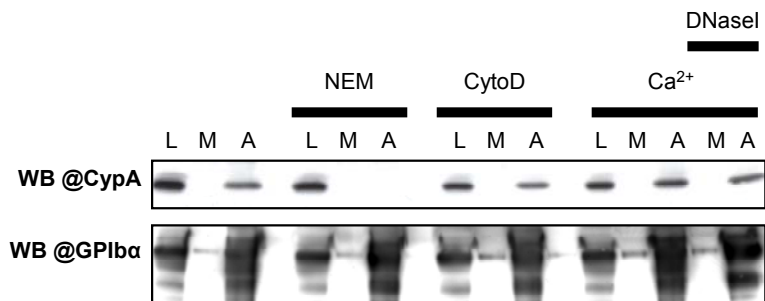


Figure 2.

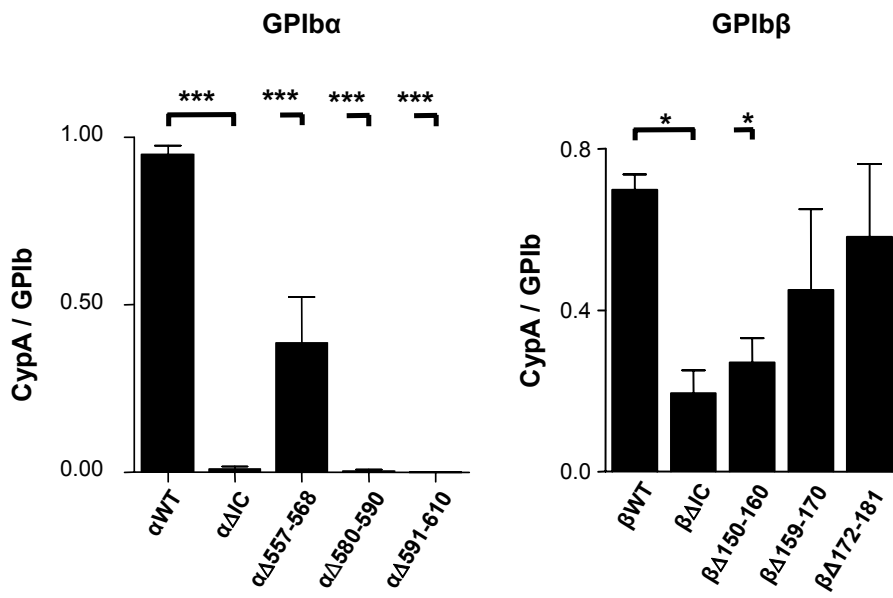
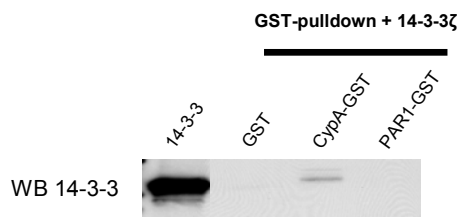
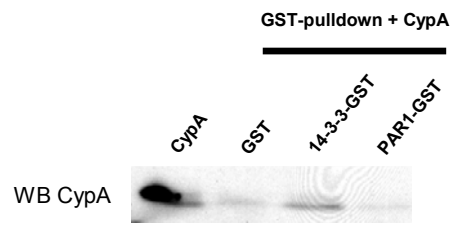


Figure 3.

A.



B.

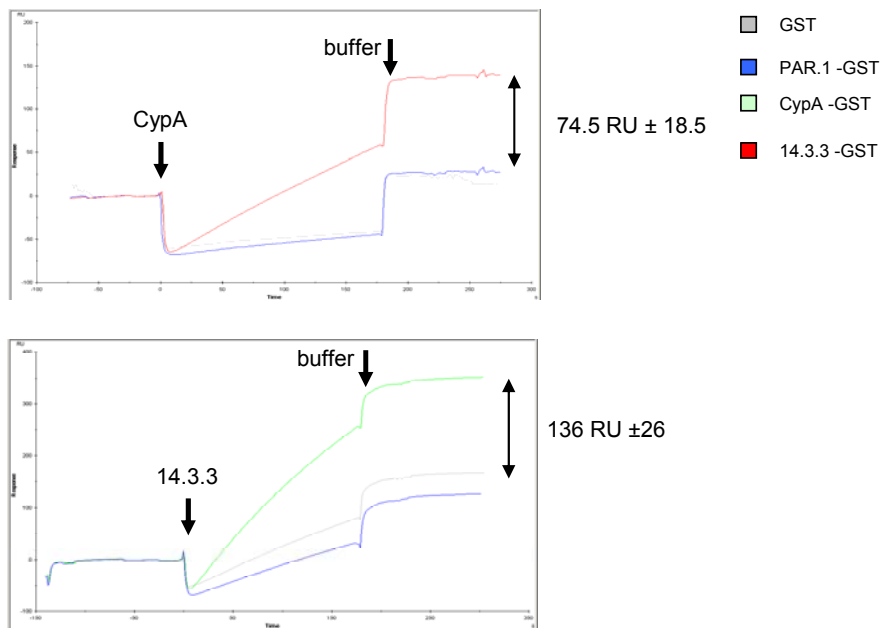


Figure 4.

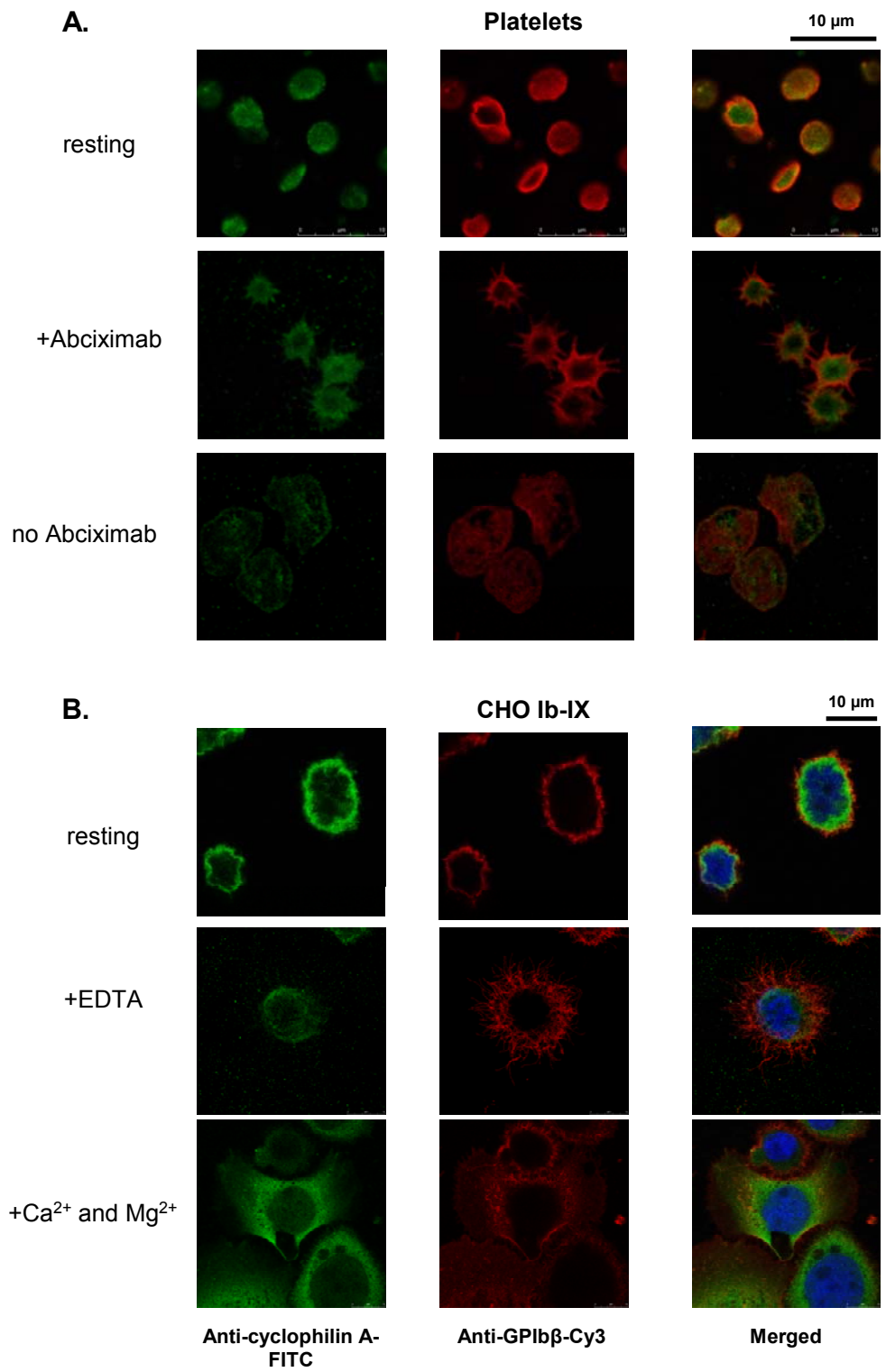


Figure 5.

A.

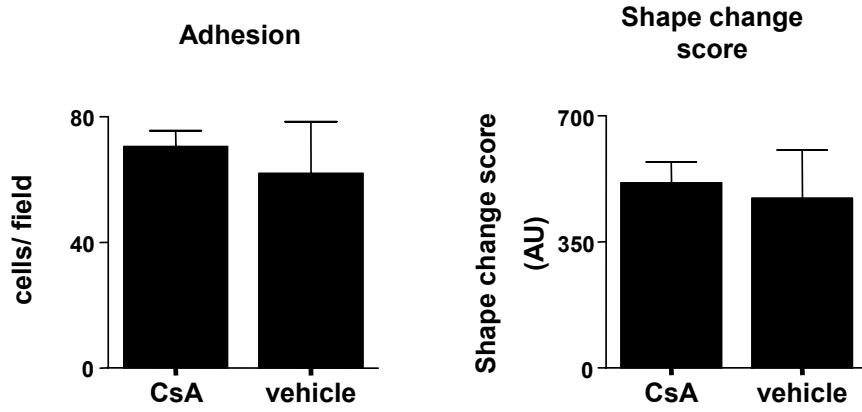
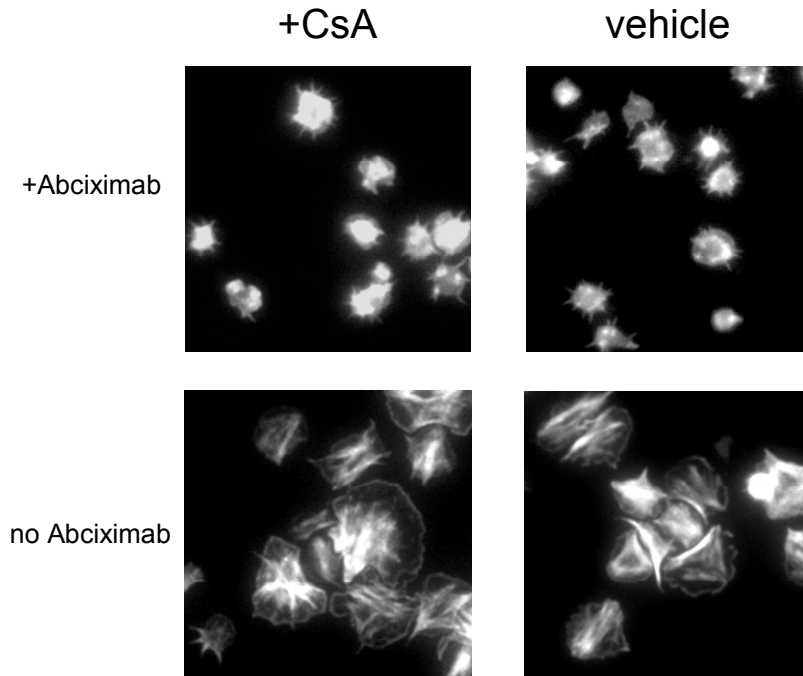


Figure 5.

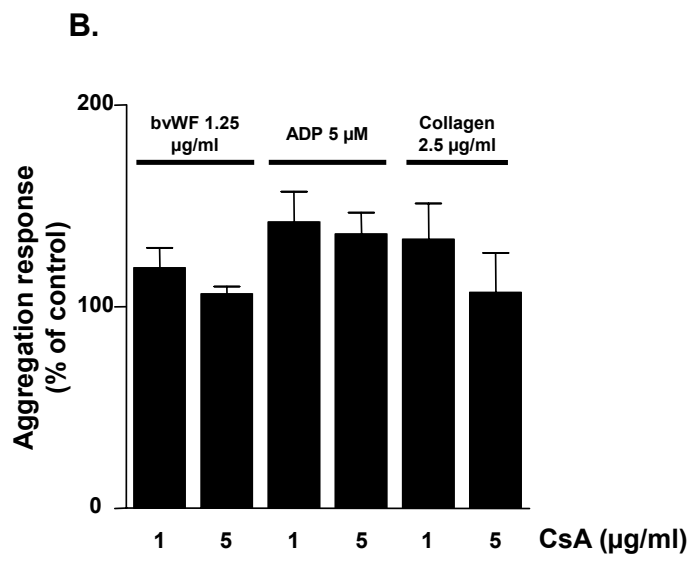


Figure 6.

A.

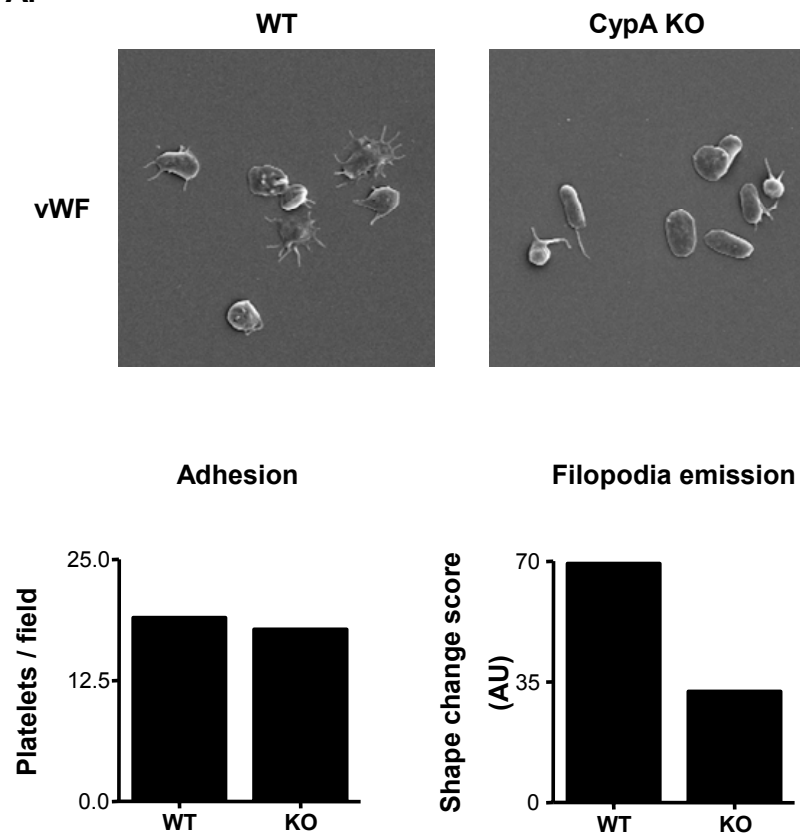


Figure 6.

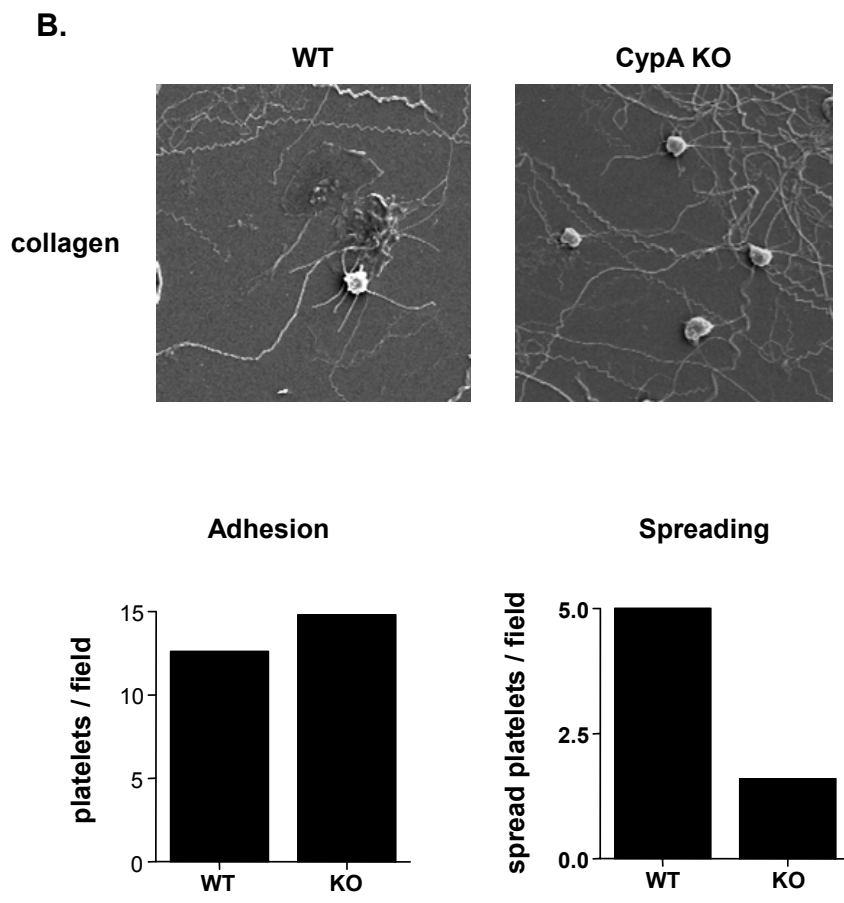
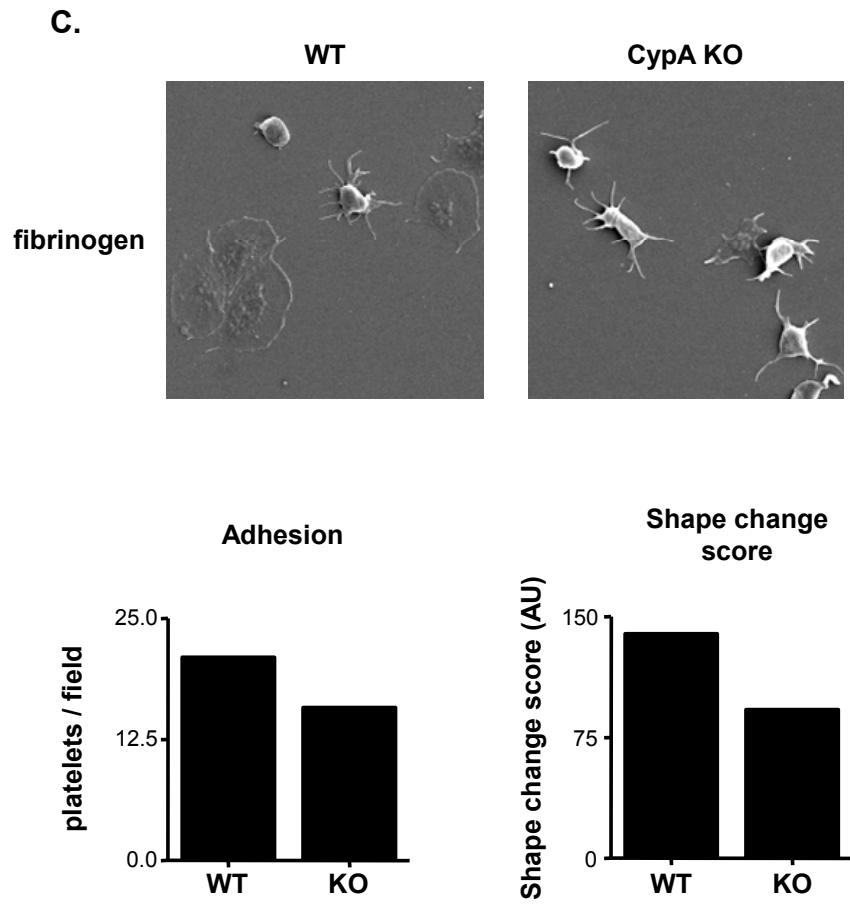


Figure 6.



References

- Andrews, R. K., S. J. Harris, T. McNally et M. C. Berndt. "Binding of purified 14-3-3 zeta signaling protein to discrete amino acid sequences within the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex." *Biochemistry* (1998) 37(2): 638-47.
- Andrews, R. K., A. D. Munday, C. A. Mitchell et M. C. Berndt. "Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex." *Blood* (2001) 98(3): 681-7.
- Atkinson, B. T., W. Ellmeier et S. P. Watson. "Tec regulates platelet activation by GPVI in the absence of Btk." *Blood* (2003) 102(10): 3592-9.
- Berndt, M. C., C. Gregory, A. Kabral, H. Zola, D. Fournier et P. A. Castaldi. "Purification and preliminary characterization of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane." *Eur J Biochem* (1985) 151(3): 637-49.
- Berndt, M. C., Y. Shen, S. M. Dopheide, E. E. Gardiner et R. K. Andrews. "The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex." *Thromb Haemost* (2001) 86(1): 178-88.
- Bialkowska, K., Y. Zaffran, S. C. Meyer et J. E. Fox. "14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta." *J Biol Chem* (2003) 278(35): 33342-50.
- Bierer, B. E., P. K. Somers, T. J. Wandless, S. J. Burakoff et S. L. Schreiber. "Probing immunosuppressant action with a nonnatural immunophilin ligand." *Science* (1990) 250(4980): 556-9.
- Bodnar, R. J., M. Gu, Z. Li, G. D. Englund et X. Du. "The cytoplasmic domain of the platelet glycoprotein Ibalpha is phosphorylated at serine 609." *J Biol Chem* (1999) 274(47): 33474-9.
- Bodnar, R. J., X. Xi, Z. Li, M. C. Berndt et X. Du. "Regulation of glycoprotein Ib-IX-von Willebrand factor interaction by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation at Ser 166 of glycoprotein Ib(beta)." *J Biol Chem* (2002) 277(49): 47080-7.
- Candiano, G., M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi et P. G. Righetti. "Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis." *Electrophoresis* (2004) 25(9): 1327-33.
- Cazenave, J. P., P. Ohlmann, D. Cassel, A. Eckly, B. Hechler et C. Gachet. "Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood." *Methods Mol Biol* (2004) 272: 13-28.
- Colgan, J., M. Asmal, M. Neagu, B. Yu, J. Schneidkraut, Y. Lee, E. Sokolskaja, A. Andreotti et J. Luban. "Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk." *Immunity* (2004) 21(2): 189-201.
- Coppinger, J. A., G. Cagney, S. Toomey, T. Kislinger, O. Belton, J. P. McRedmond, D. J. Cahill, A. Emili, D. J. Fitzgerald et P. B. Maguire. "Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions." *Blood* (2004) 103(6): 2096-104.
- Cranmer, S. L., I. Pikovski, P. Mangin, P. E. Thompson, T. Domagala, M. Frazzetto, H. H. Salem et S. P. Jackson. "Identification of a unique filamin A binding region within the cytoplasmic domain of glycoprotein Ibalpha." *Biochem J* (2005) 387(Pt 3): 849-58.
- Cranmer, S. L., P. Ulsemer, B. M. Cooke, H. H. Salem, C. de la Salle, F. Lanza et S. P. Jackson. "Glycoprotein (GP) Ib-IX-transfected cells roll on a von Willebrand factor matrix under flow. Importance of the GPIb/actin-binding protein (ABP-280) interaction in maintaining adhesion under high shear." *J Biol Chem* (1999) 274(10): 6097-106.

- Dai, K., R. Bodnar, M. C. Berndt et X. Du. "A critical role for 14-3-3zeta protein in regulating the VWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications." *Blood* (2005) 106(6): 1975-81.
- Du, X., J. E. Fox et S. Pei. "Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib alpha." *J Biol Chem* (1996) 271(13): 7362-7.
- Dyson, J. M., A. D. Munday, A. M. Kong, R. D. Huysmans, M. Matzaris, M. J. Layton, H. H. Nandurkar, M. C. Berndt et C. A. Mitchell. "SHIP-2 forms a tetrameric complex with filamin, actin, and GPIb-IX-V: localization of SHIP-2 to the activated platelet actin cytoskeleton." *Blood* (2003) 102(3): 940-8.
- Feng, S., N. Christodoulides, J. C. Resendiz, M. C. Berndt et M. H. Kroll. "Cytoplasmic domains of GpIbalpha and GpIbbeta regulate 14-3-3zeta binding to GpIb/IX/V." *Blood* (2000) 95(2): 551-7.
- Feng, S., J. C. Resendiz, N. Christodoulides, X. Lu, D. Arboleda, M. C. Berndt et M. H. Kroll. "Pathological shear stress stimulates the tyrosine phosphorylation of alpha-actinin associated with the glycoprotein Ib-IX complex." *Biochemistry* (2002) 41(4): 1100-8.
- Feng, S., J. C. Resendiz, X. Lu et M. H. Kroll. "Filamin A binding to the cytoplasmic tail of glycoprotein Ibalpha regulates von Willebrand factor-induced platelet activation." *Blood* (2003) 102(6): 2122-9.
- Fernandes, J. B., U. P. Naik, M. S. Markell et E. Kornecki. "Comparative investigation of the effects of the immunosuppressants cyclosporine A, cyclosporine G, and FK-506 on platelet activation." *Cell Mol Biol Res* (1993) 39(3): 265-74.
- Fox, S. C., H. M. Judge, B. R. Allen et S. Heptinstall. "Platelet aggregation and intracellular calcium mobilisation responses are enhanced by cyclosporin A but not by pimecrolimus (SDZ ASM 981)." *Platelets* (2002) 13(4): 213-8.
- Fruman, D. A., C. B. Klee, B. E. Bierer et S. J. Burakoff. "Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992) 89(9): 3686-90.
- Gu, M., X. Xi, G. D. Englund, M. C. Berndt et X. Du. "Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3) using a reconstituted mammalian cell expression model." *J Cell Biol* (1999) 147(5): 1085-96.
- Handschumacher, R. E., M. W. Harding, J. Rice, R. J. Drugge et D. W. Speicher. "Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A." *Science* (1984) 226(4674): 544-7.
- Jin, Z. G., M. G. Melaragno, D. F. Liao, C. Yan, J. Haendeler, Y. A. Suh, J. D. Lambeth et B. C. Berk. "Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress." *Circ Res* (2000) 87(9): 789-96.
- Kasirer-Friede, A., M. R. Cozzi, M. Mazzucato, L. De Marco, Z. M. Ruggeri et S. J. Shattil. "Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors." *Blood* (2004) 103(9): 3403-11.
- Kontinen, Y. T., T. F. Li, J. Mandelin, M. Liljestrom, T. Sorsa, S. Santavirta et I. Virtanen. "Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium." *Arthritis Rheum* (2000) 43(2): 275-80.
- Liu, J., J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman et S. L. Schreiber. "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes." *Cell* (1991) 66(4): 807-15.
- Lopez, J. A., R. K. Andrews, V. Afshar-Kharghan et M. C. Berndt. "Bernard-Soulier syndrome." *Blood* (1998) 91(12): 4397-418.

- Mangin, P., T. David, V. Lavaud, S. L. Cranmer, I. Pikovski, S. P. Jackson, M. C. Berndt, J. P. Cazenave, C. Gachet et F. Lanza. "Identification of a novel 14-3-3zeta binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ibalpha." *Blood* (2004) 104(2): 420-7.
- Mangin, P., Y. Yuan, I. Goncalves, A. Eckly, M. Freund, J. P. Cazenave, C. Gachet, S. P. Jackson et F. Lanza. "Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA." *J Biol Chem* (2003) 278(35): 32880-91.
- Martin, K., G. Meade, N. Moran, D. C. Shields et D. Kenny. "A palmitylated peptide derived from the glycoprotein Ib beta cytoplasmic tail inhibits platelet activation." *J Thromb Haemost* (2003) 1(12): 2643-52.
- Moien-Afshari, F., B. M. McManus et I. Laher. "Immunosuppression and transplant vascular disease: benefits and adverse effects." *Pharmacol Ther* (2003) 100(2): 141-56.
- Moog, S., P. Mangin, N. Lenain, C. Strassel, C. Ravanat, S. Schuhler, M. Freund, M. Santer, M. Kahn, B. Nieswandt, C. Gachet, J. P. Cazenave et F. Lanza. "Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation." *Blood* (2001) 98(4): 1038-46.
- Munday, A. D., M. C. Berndt et C. A. Mitchell. "Phosphoinositide 3-kinase forms a complex with platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and 14-3-3zeta." *Blood* (2000) 96(2): 577-84.
- Naik, M. U. et U. P. Naik. "Calcium-and integrin-binding protein regulates focal adhesion kinase activity during platelet spreading on immobilized fibrinogen." *Blood* (2003) 102(10): 3629-36.
- Naik, U. P., M. Markell, Y. H. Ehrlich et E. Kornecki. "Cyclosporine A enhances agonist-induced aggregation of human platelets by stimulating protein phosphorylation." *Cell Mol Biol Res* (1993) 39(3): 257-64.
- Naik, U. P., P. M. Patel et L. V. Parise. "Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin alphaIIb cytoplasmic domain." *J Biol Chem* (1997) 272(8): 4651-4.
- Nakamura, F., R. Pudas, O. Heikkinen, P. Permi, I. Kilpelainen, A. D. Munday, J. H. Hartwig, T. P. Stossel et J. Ylanne. "The structure of the GPIb-filamin A complex." *Blood* (2006) 107(5): 1925-32.
- Ohlmann, P., A. Eckly, M. Freund, J. P. Cazenave, S. Offermanns et C. Gachet. "ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of Galphaq." *Blood* (2000) 96(6): 2134-9.
- Perrault, C., P. Mangin, M. Santer, M. J. Baas, S. Moog, S. L. Cranmer, I. Pikovski, D. Williamson, S. P. Jackson, J. P. Cazenave et F. Lanza. "Role of the intracellular domains of GPIb in controlling the adhesive properties of the platelet GPIb/V/IX complex." *Blood* (2003) 101(9): 3477-84.
- Piotukh, K., W. Gu, M. Kofler, D. Labudde, V. Helms et C. Freund. "Cyclophilin A binds to linear peptide motifs containing a consensus that is present in many human proteins." *J Biol Chem* (2005) 280(25): 23668-74.
- Quek, L. S., J. Bolen et S. P. Watson. "A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen." *Curr Biol* (1998) 8(20): 1137-40.
- Strassel, C., T. David, A. Eckly, M. J. Baas, S. Moog, C. Ravanat, M. C. Trzeciak, C. Vinciguerra, J. P. Cazenave, C. Gachet et F. Lanza. "Synthesis of GPIb beta with novel transmembrane and cytoplasmic sequences in a Bernard-Soulier patient resulting in GPIb-defective signaling in CHO cells." *J Thromb Haemost* (2006) 4(1): 217-28.

- Suehiro, A., A. Sawada, Y. Hasegawa, H. Takatsuka, S. Higasa et E. Kakishita. "Enhancement by cyclosporine A and tacrolimus of serotonin-induced formation of small platelet aggregation." *Bone Marrow Transplant* (2002) 29(2): 107-111.
- Suzuki-Inoue, K., J. I. Wilde, R. K. Andrews, J. M. Auger, R. P. Siraganian, F. Sekiya, S. G. Rhee et S. P. Watson. "Glycoproteins VI and Ib-IX-V stimulate tyrosine phosphorylation of tyrosine kinase Syk and phospholipase Cgamma2 at distinct sites." *Biochem J* (2004) 378(Pt 3): 1023-9.
- Toti, F., C. Gachet, P. Ohlmann, A. Stierle, L. Grunebaum, M. L. Wiesel et J. P. Cazenave. "Electrophoretic studies on molecular defects of von Willebrand factor and platelet glycoprotein IIb-IIIa with antibodies produced in egg yolk from laying hens." *Haemostasis* (1992) 22(1): 32-40.
- Vanrenterghem, Y., L. Roels, T. Lerut, J. Gruwez, P. Michielsens, P. Gresele, H. Deckmyn, M. Colucci, J. Arnout et J. Vermynen. "Thromboembolic complications and haemostatic changes in cyclosporin-treated cadaveric kidney allograft recipients." *Lancet* (1985) 1(8436): 999-1002.
- Watson, S. P., J. M. Auger, O. J. McCarty et A. C. Pearce. "GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets." *J Thromb Haemost* (2005) 3(8): 1752-62.
- Williamson, D., I. Pikovski, S. L. Cranmer, P. Mangin, N. Mistry, T. Domagala, S. Chehab, F. Lanza, H. H. Salem et S. P. Jackson. "Interaction between platelet glycoprotein Ibalpha and filamin-1 is essential for glycoprotein Ib/IX receptor anchorage at high shear." *J Biol Chem* (2002) 277(3): 2151-9.
- Wu, Y., K. Suzuki-Inoue, K. Satoh, N. Asazuma, Y. Yatomi, M. C. Berndt et Y. Ozaki. "Role of Fc receptor gamma-chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling." *Blood* (2001) 97(12): 3836-45.
- Yao, Q., M. Li, H. Yang, H. Chai, W. Fisher et C. Chen. "Roles of cyclophilins in cancers and other organ systems." *World J Surg* (2005) 29(3): 276-80.
- Yuan, Y., S. Kulkarni, P. Ulsemer, S. L. Cranmer, C. L. Yap, W. S. Nesbitt, I. Harper, N. Mistry, S. M. Dopheide, S. C. Hughan, D. Williamson, C. de la Salle, H. H. Salem, F. Lanza et S. P. Jackson. "The von Willebrand factor-glycoprotein Ib/V/IX interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells." *J Biol Chem* (1999) 274(51): 36241-51.
- Yurchenko, V., G. Zybarth, M. O'Connor, W. W. Dai, G. Franchin, T. Hao, H. Guo, H. C. Hung, B. Toole, P. Gallay, B. Sherry et M. Bukrinsky. "Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147." *J Biol Chem* (2002) 277(25): 22959-65.

Supplementary material

Immunoprecipitation and protein separation by SDS PAGE. Starting from 750 µg of platelet proteins, the GPIb-V-IX complex was immunoprecipitated with mAb ALMA.12 or irrelevant IgG MOPC (15 µg per sample). Precipitated proteins were separated on a 4-15% SDS-PAGE gel under reduction conditions with 10 mM DTT. The gels were stained according to the Silver Blue protocol (Candiano et al. 2004) (Figure A).

In-situ digestion. Each SDS-PAGE 1D gel lane from the gel was cut in 2,mm slices representing distinct molecular mass ranges. The gel slices were washed twice with 50 µl of

25 mM NH_4HCO_3 and 50 μl of acetonitrile. Cysteine bonds were reduced by 50 μl of 10 mM DTT at 57°C and alkylated by 50 μl of 55 mM iodoacetamide. After dehydration with acetonitrile, the proteins were cleaved in gel with 40 μl of 12.5 ng/ μl of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 25 mM NH_4HCO_3 at room temperature for 14 hours. The resulting tryptic peptides were extracted with 60 % acetonitrile in 5 % formic acid. The peptide extracts were used for LC-MS/MS.

LC-MS/MS. Samples containing the tryptic peptides were injected into a CapLC (Waters, Milford, MA, USA) system equipped with an autosampler, gradient pump, and auxiliary pump. 6.4 μl was injected via "microliter pickup" mode and desalted on-line through a 300 $\mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$ C18 trapping cartridge (LC Packings, San Francisco, CA, USA). The samples were desalted at high flow (30 $\mu\text{l}/\text{min}$) for 3 min. The peptides were separated on a 75 $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm} \times 3 \mu\text{m}$ C18 100 Å PepMapTM column (LC Packings, CA, USA) prior to introduction into the mass spectrometer. A typical reversed phase gradient was used from low to high organic over 35 min. Mobile phase A was water 0.1% formic acid and B was 95 % acetonitrile/5 % water/0.1 % formic acid. The system utilized a split flow resulting in a column flow rate of approximately 200 nL/min.

Mass data acquisitions were piloted by MassLynx software (Micromass) using automatic switching between MS and MS/MS modes. The internal parameters of QTOF II were set as follows. The electrospray capillary voltage was set to 3.5 kV, the cone voltage set to 30 V, and the source temperature set to 80°C. The MS survey scan was m/z 300-1500 with a scan time of 1 sec and an inter scan time of 0.1 sec. When the intensity of a peak rose above a threshold of 10 counts, tandem mass spectra were acquired. Normalized collision energies for peptide fragmentation were set using the charge-state recognition files for +2 and +3 peptide ions. The scan range for MS/MS acquisition was from m/z 50 to 1500 with a scan time of 1 sec and an inter scan time of 0.1sec. Fragmentation was performed using argon as the collision gas and with a collision energy profile optimized for various mass ranges of precursor ions. Mass data collected during a LC-MS/MS analysis were processed and converted into a .PKL file to be submitted to the search software MASCOT (Matrix Science, London, UK). Searches were done with a tolerance on mass measurement of 0.25 Da in MS mode and 0.25Da in MS/MS mode. MS/MS searches were conducted using the NCBI (National Center for Biotechnology) database. Results obtained for MOPC immunoprecipitation are presented in Table IA and for ALMA.12 immunoprecipitation in Table IB. These results are representative from 4 separate experiments.

Figure A.

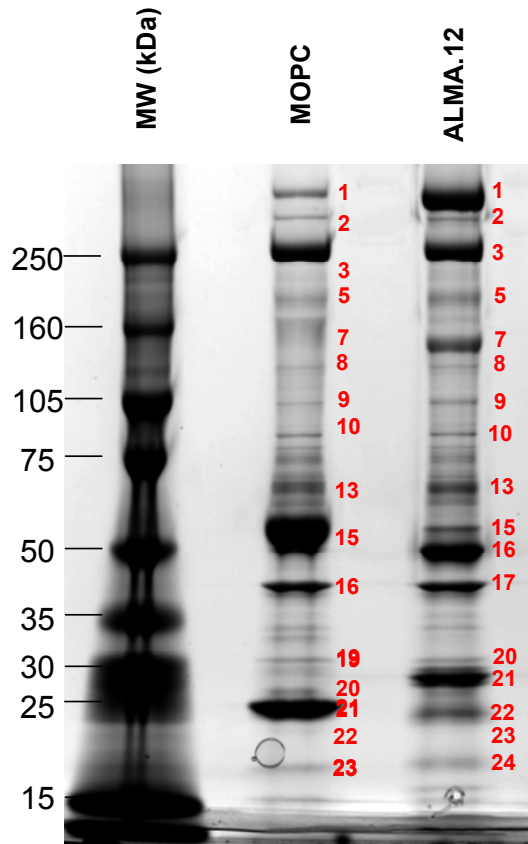


Table IA. Proteins from MOPC immunoprecipitation identified by nanoLC-MS/MS after 1D electrophoresis.

1D fraction	Protein	Accession	MW	Sequence coverage	Number of peptides
1	Filamin A	P21333	283289	29%	60
	Filamin C	Q14315	290778	2%	5
2	Talin 1	Q9Y490	269550	14%	26
	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	P35579	226392	16%	28
	Filamin A	P21333	283289	3%	15
3	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	P35579	226392	39%	95
5	Thrombospondin 1	P07996	133321	6%	20
	Multimerin 1	Q13201	139183	5%	11
	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	P35579	227276	3%	9
7	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	P07359	69425	8%	4
	Ig gamma-1 chain C - MOUSE	P01868	36252	28%	9
8	Vinculin	P18206	124161	12%	11
	Ig gamma-1 chain C - MOUSE	P01868	36252	33%	11
	Integrin alpha-IIb precursor	P08514	114460	14%	12
9	Ig gamma-1 chain C - MOUSE	P01868	36252	28%	9
	Alpha-actinin 1	P12814	103563	15%	14
10	Gelsolin	P06396	86043	31%	18
13	Serum albumin precursor -MOUSE-	P07724	70700	2%	1
	Fibrinogen alpha chain	P02671	94914	7%	3
15	Fibrinogen alpha chain	P02671	94914	7%	7
	Serum albumin precursor -MOUSE-	P07724	70700	24%	13
	Tubulin beta-1 chain	Q9H4B7	50865	24%	10
	Ig gamma-1 chain C - MOUSE	P01868	36252	14%	10
	Fibrinogen beta chain	P02675	56577	4%	2
16	Actin, cytoplasmic 2	P02571	42108	64%	37
19	Tropomyosin alpha 4 chain	P07226	28619	28%	5
20	14-3-3 protein zeta/delta	P63103	27899	35%	8
	Ig kappa chain C region	P01837	11942	12%	4
21	Ig kappa chain C region	P01837	11942	88%	10
22	Ig kappa chain C region	P01837	11942	33%	3
23	Myosin light polypeptide 6	P60660-00-	16959	30%	5

Table IB. Proteins from ALMA.12 immunoprecipitation identified by nanoLC-MS/MS after 1D electrophoresis.

1D fraction	Protein	Accession	MW	Sequence coverage	Number of peptides
1	Filamin A	P21333	283289	46%	90
	Filamin C	Q14315	290778	4%	13
	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	P35579	226392	1%	2
2	Filamin A	P21333	283289	21%	46
	Talin 1	Q9Y490	269550	12%	25
	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	P35579	226392	10%	20
3	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	P35579	226392	40%	93
	Filamin A	P21333	283289	5%	12
5	Thrombospondin 1	P07996	133321	17%	20
	Filamin A	P21333	283289	17%	9
	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	P07359	69425	8%	5
	Multimerin 1	Q13201	139183	5%	6
	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	P35579	227276	5%	7
7	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	P07359	69425	25%	22
	Ig gamma-1 chain C - MOUSE	P01868	36252	19%	5
8	Vinculin	P18206	124161	10%	10
	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	P07359	69425	11%	5
	Integrin alpha-IIb	P08514	114460	5%	5
9	Filamin A (Cter + Nter)	P21333	283289	12%	20
	Alpha-actinin 1	P12814	103563	11%	9
10	Filamin A (Cter + Nter)	P21333	283289	9%	18
	Gelsolin	P06396	86043	18%	9
	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	P35579	227276	4%	6
	Talin 1 (Cterm)	Q9Y490	271717	2%	6
13	Serum albumin -MOUSE-	P07724	70700	37%	25
	Fibrinogen alpha chain	P02671	94914	25%	9
15	Fibrinogen beta chain	P02675	56577	24%	10
	Ig gamma-1 chain C - MOUSE	P01868	36252	23%	6
	Tubulin alpha-4 chain	P05215	50634	15%	4
16	Ig gamma-1 chain C - MOUSE	P01868	36252	35%	11
	Tubulin alpha-4 chain	P05215	50634	8%	3
	Tubulin alpha-6 chain	Q9BQE3	50548	6%	3
	Fibrinogen gamma chain	P02679	52106	15%	1
17	Actin, cytoplasmic 2	P02571	42108	55%	27
20	Tropomyosin alpha 4 chain	P07226	28619	21%	5
	Tropomyosin alpha 3 chain	P06753	29243	20%	4
21	14-3-3 protein zeta/delta	P63103	27899	49%	12
	Ig kappa chain C region	P01837	11942	70%	10
	14-3-3 protein epsilon	P62258	29326	30%	8
	14-3-3 protein eta	Q04917	28070	21%	5
	14-3-3 protein gamma	P35214	28154	24%	6
22	Ig kappa chain C region	P01837	11942	70%	7
	14-3-3 protein zeta/delta	P63103	27899	29%	6
	Platelet glycoprotein Ib beta chain	P13224	22274	18%	4
	Multimerin 1 (Cterm)	Q13201	139183	2%	3
23	Myosin regulatory light chain 2	P19105	19707	51%	6
	Platelet glycoprotein IX	P14770	19547	35%	7
	Ras-related protein Rap-1b	P61224	21040	20%	3
24	Myosin light polypeptide 6	P60660	16959	46%	7
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	18098	38%	8
	Platelet glycoprotein Ib alpha chain (Cterm)	P07359	69425	3%	2

Conclusion

Cette étude a permis d'identifier un nouveau partenaire intracellulaire du complexe GPIb-V-IX. L'utilisation d'agents dépolymérisants de l'actine F a écarté une coprécipitation non spécifique par une association au cytosquelette d'actine. L'étude de cellules CHO exprimant un complexe GPIb-IX avec une GPIb α ou une GPIb β délétée au niveau de son domaine intracellulaire a permis d'établir la nécessité de la GPIb α et la contribution de la GPIb β dans cette association. Des expériences de « pull-down » et de résonance plasmonique de surface avec des protéines recombinantes suggèrent une association indirecte entre la CypA et la GPIb via la 14-3-3 ζ . Des expériences de double marquage en microscopie confocale à fluorescence montrent une colocalisation du complexe GPIb-V-IX et de la CypA au niveau membranaire dans les plaquettes et les CHO GPIb-IX et une relocalisation distincte lors de l'émission de filopodes. Le traitement des plaquettes par un inhibiteur de la CypA, la CsA, n'a pas d'effet sur l'adhésion et l'activation des plaquettes au FW. Par contre, la CsA augmente l'agrégation des plaquettes en réponse à l'ADP et au collagène. Enfin, l'étude de l'adhésion de plaquettes de souris KO pour la CypA sur des matrices de FW montre un rôle de la CypA dans l'émission de filopodes. Un défaut similaire en réponse au collagène et au fibrinogène suggère une fonction plus générale dans le changement de forme en réponse à l'adhésion plaquettaire.

Le mode d'association entre CypA et 14-3-3 ζ suggéré par les expériences de « pull-down » et de résonance plasmonique de surface reste à préciser. Les séquences consensus d'association à la 14-3-3 ζ , initialement identifiées dans c-Raf, ne sont pas retrouvées dans la CypA. Inversement, le motif de liaison des partenaires de la CypA (Gly-Pro-X-Leu-Pro), publié récemment (**Piotukh et al. 2005**), n'a pu être retrouvé dans la séquence de la 14-3-3 ζ . Ces deux protéines s'associent donc selon un mode, qui est à déterminer. Cette association pourrait suggère un rôle de la CypA dans l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. En effet les CHO transfectées par un complexe incapable de lier la 14-3-3 ζ présentent un étalement, et donc une activation des intégrines, diminué sur une surface recouverte de FW (**Gu et al. 1999; Mangin et al. 2004**).

Les expériences de microscopie confocale lors de l'adhésion des plaquettes au FW montrent qu'alors que le complexe se relocalise le long des filopodes, la CypA est exclue de ces structures. Ces résultats suggèrent un possible mécanisme de découplage de la CypA du complexe GPIb-V-IX, équivalent à celui proposé pour la 14-3-3 ζ en réponse aux forces de

cisaillement élevées (**Feng et al. 2000**) ou pour la PI3Kinase lors de l'activation au FW (**Munday et al. 2000**).

Le rôle fonctionnel de la CypA a tout d'abord été étudié à l'aide de la CsA. Un traitement par la CsA n'a pas d'effet sur l'adhésion et l'activation des plaquettes au FW mais augmente l'agrégation en réponse à l'ADP et au collagène. Ces derniers résultats sont en accord avec les données de la littérature qui décrivent une réponse à l'ADP augmentée en présence de CsA ou d'autres agents immunosupresseurs (**Fernandes et al. 1993; Fox et al. 2002**). Ces observations semblent exclure un rôle de la CypA pour l'activation au FW et proposent un contrôle négatif de l'activation plaquettaire.

L'obtention des souris KO pour la CypA permet d'étudier de manière plus adéquate le rôle de la CypA pour les fonctions plaquettaires mais le nombre encore limité de souris n'a pas encore permis une étude approfondie. Une étude rapide ne suggère pas d'altération importante des fonctions hémostatiques. L'étude de l'adhésion plaquettaire a montré un changement de forme diminué sur le FW mais aussi sur une surface recouverte de collagène ou de fibrinogène. Ces résultats indiquent un rôle facilitateur de la CypA pour l'activation des plaquettes en réponse à l'adhésion sur différents types de matrices.

Les résultats divergents observés après traitement à la CsA et dans les souris CypA -/- pour la réponse au FW pourraient s'expliquer par le fait que la CsA ne cible qu'une partie des fonctions de la CypA.

Dans le lymphocyte T, le complexe formé par la CsA et la CypA inhibe l'activité de la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase (**Fruman et al. 1992; Liu et al. 1991**). A notre connaissance, cette enzyme n'a pas été identifiée dans la plaquette. Une protéine potentiellement ciblée par CsA est la calcium binding protein (CIB) qui présente une homologie avec la sous unité régulatrice de la calcineurine. CIB associée au domaine intracellulaire de la sous unité α_{IIb} de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Naik et al. 1997**) serait importante pour l'activation de l'intégrine (**Naik and Naik 2003; Tsuboi 2002**).

Parmi les fonctions de CypA non modifiées par la CsA figure la régulation de l'activité des Tec kinases. Dans le lymphocyte T, la CypA inhibe l'activité d'ITK une enzyme de cette famille (**Colgan et al. 2004**). Ces enzymes sont également présentes dans les plaquettes (Tec et Btk) où elles participent à l'activation en réponse au collagène et à la signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Watson et al. 2005**). En s'associant au signalosome formé par LAT et SLP-76, elles vont contribuer à l'activation de PLC γ_2 (**Atkinson et al. 2003; Quek et al. 1998**). CypA pourrait de manière similaire contribuer à l'activation plaquettaire

en contrôlant les Tec kinases aboutissant dans les souris CypA $-/-$ à un défaut de changement de forme en réponse au FW et au collagène des signaux qui convergent vers PLC γ 2.

En conclusion, ce travail a identifié la cyclophiline A comme une nouvelle protéine cytoplasmique indirectement associée au complexe GPIb-V-IX. Le rôle de cette protéine pour l'activation plaquettaire n'est pas clairement défini. L'effet de la CsA indique un contrôle négatif de CypA sur la réponse aux agonistes, tandis que les premières données sur les souris CypA $-/-$ indiquent un rôle facilitateur de CypA en réponse aux protéines adhésives

DISCUSSION GENERALE

En cas de brèche vasculaire, les plaquettes vont adhérer au sous endothélium vasculaire exposé grâce à leurs récepteurs d'adhésion, puis elles vont s'activer sur cette surface pour agréger et former un clou plaquettaire mettant fin au saignement. En présence de forces de cisaillement élevées, l'interaction entre le FW et le complexe GPIb-V-IX assure exclusivement le recrutement des plaquettes au niveau de la lésion vasculaire (**Berndt et al. 2001**). En plus de son rôle dans l'adhésion des plaquettes sur la surface thrombogène, l'interaction GPIb-FW déclenche un processus de signalisation intracellulaire. Une activation GPIb-spécifique est observable lors de l'adhésion de plaquettes sur une surface recouverte de FW. Dans des conditions indépendantes des boucles d'amplification de l'activation (sécrétion d'ADP ou production de TXA₂) et de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, les plaquettes passent d'une forme discoïde à ronde et émettent des filopodes (**McCarty et al. 2006; Yuan et al. 1999**). Dans un second temps, et de manière intégrine dépendante les cellules produisent un large lamellipode circulaire et s'aplatissent sur la surface (**Yap et al. 2002**).

Ce changement de forme des plaquettes sur une surface de FW est le résultat d'une signalisation encore mal caractérisée qui implique une src kinase, dont on ignore l'identité, et la PLC γ_2 (**Mangin et al. 2003; Suzuki-Inoue et al. 2004; Wu et al. 2001b**). La production d'IP₃ par la PLC γ_2 activée mène à la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires, ce dernier est nécessaire au remodelage du cytosquelette d'actine, qui est le support de la forme de la plaquette. Cette signalisation va également contribuer à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ nécessaire à l'adhésion stable, l'étalement et l'agrégation des plaquettes (**Kasirer-Friede et al. 2004**).

La question posée dans ce travail de thèse concernait le mode transmission de la signalisation par le complexe GPIb-V-IX après son interaction avec le FW. Le complexe GPIb-V-IX n'est pas couplé à une protéine G hétérotrimérique, il est dépourvu de motif de signalisation connu et aucune activité enzymatique ne lui a été attribuée. Il semblait évident d'envisager une transmission du signal par l'intermédiaire des domaines intracellulaires du complexe GPIb-V-IX vers des effecteurs cytoplasmiques. Une première indication en faveur de cette hypothèse était l'identification de trois protéines (FLNA, 14-3-3 ζ et calmoduline) associées aux régions cytoplasmiques du complexe GPIb-V-IX (**Andrews et al. 2001; Cranmer et al. 2005; Du et al. 1996; Mangin et al. 2004; Nakamura et al. 2006; Williamson et al. 2002**). Ces 3 protéines pouvaient potentiellement être impliquées dans la signalisation du complexe GPIb-V-IX.

Un premier objectif a été d'identifier les zones fonctionnelles dans les domaines intracellulaires du complexe impliquées dans la signalisation menant à l'émission de filopodes. Parmi les 4 sous unités du complexe, nous nous sommes particulièrement focalisés sur la GPIb α et la GPIb β . Ce choix était motivé par : *i*) les données de la littérature qui avait identifié sur la GPIb α et de la GPIb β des sites d'interaction pour les trois partenaires du complexe cités plus haut ; *ii*) le fait que l'absence de GPV dans des lignées transfectées ou dans souris KO n'empêche pas l'adhésion ni la signalisation sur une surface de FW (**Moog et al. 2001**); *iii*) la présence d'un très court domaine intracellulaire de seulement 6 résidus sur la GPIX qui réduit les possibilités d'association.

Un deuxième axe de recherche a été l'identification de nouveaux partenaires intracellulaires du complexe GPIb-V-IX. L'objectif était d'identifier des protéines potentiellement impliquées dans la cascade d'activation déclenchée par la liaison de FW et menant à l'émission de filopodes. La nécessité de cette approche était motivée par les premiers résultats obtenus dans les lignées CHO qui suggéraient l'absence d'un rôle de la FLNA et de la 14-3-3 ζ dans la signalisation précoce du complexe GPIb-V-IX menant à l'émission de filopodes (**Gu et al. 1999; Mistry et al. 2000**).

Cartographie fonctionnelles des domaines intracellulaires du complexe GPIb-V-IX

La majorité des travaux publiés portant sur les domaines intracellulaires se sont focalisés sur la sous-unité GPIb α . Ces études ont permis d'établir un rôle de cette sous-unité dans le contrôle de l'adhésion au FW et dans une signalisation menant à l'engagement de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Bialkowska et al. 2003; Dai et al. 2005; Gu et al. 1999; Mangin et al. 2004; Williamson et al. 2002**). Pour ce qui concerne la GPIb β , un rôle dans le contrôle de fonctions adhésives du complexe a été attribué à la sérine 166 intracellulaire (**Bodnar et al. 2002; Perrault et al. 2003**). A l'exception de ses interactions avec la 14-3-3 ζ et avec la calmoduline (**Andrews et al. 1998; Andrews et al. 2001; Calverley et al. 1998; Feng et al. 2000**), il n'existait pas d'indication en faveur d'une implication de la GPIb β dans la signalisation du complexe.

Une technique nouvellement mise au point de couplage de motifs perméants (**Wender et al. 2000**) a permis l'identification dans la plaquette intacte, d'un motif fonctionnel de la GPIb α , (557-569) impliqué dans l'activation. Des plaquettes traitées avec le peptide R9 α 557 présentent une émission de filopodes significativement diminuée sur une surface de FW. L'effet de ce peptide a été confirmé dans le modèle cellulaire CHO GPIb-IX fournissant un

argument supplémentaire en faveur d'un effet spécifique sur la voie d'activation GPIb-dépendante.

L'étude de cellules transfectées par un complexe GPIb-IX délété ou muté au niveau intracellulaire ont constitué une approche complémentaire pour étudier le rôle des domaines intracellulaires. De manière surprenante la délétion du domaine intracellulaire de la GPIb α n'empêche pas l'adhésion ni l'activation des cellules sur la surface de FW. Ces résultats semblent en contradiction avec ceux obtenus avec le peptide perméant de la GPIb α . Un moyen de concilier ces observations opposées serait de considérer un rôle central de la sous-unité GPIb β dans la fonction de signalisation du complexe, qui est suggérée par les résultats de mutagenèse portant sur cette sous-unité.

Effectivement, l'étude systématique par mutagenèse du domaine intracellulaire de la GPIb β a mis en évidence un domaine fonctionnel (150-170) impliqué dans l'activation GPIb-dépendante menant à l'émission de filopodes. Une stratégie de mutagenèse par « alanine scanning » a permis de délimiter plus précisément ce domaine au niveau de la région R¹⁶⁴-P¹⁷⁰. Des plaquettes de souris exprimant une GPIb β tronquée de sa partie cytoplasmique ont permis de confirmer l'importance du domaine intracellulaire de la GPIb β pour la signalisation du complexe GPIb-V-IX.

L'hypothèse d'un rôle central de la GPIb β dans la signalisation permet d'expliquer l'absence d'effet des délétions de la sous-unité GPIb α . Pour expliquer l'effet du peptide perméant R9 α 557 on peut imaginer que ce peptide puisse interagir (directement ou indirectement) avec la GPIb β et inhiber sa fonction. Dans cette hypothèse la région 557-569 pourrait dans le contexte du récepteur natif prévenir l'activation dans la cellule au repos. Il n'existe pas de données en faveur d'une association directe entre les sous-unités GPIb α et GPIb β . L'hypothèse d'une association a été avancée par Dai et *al* faisant intervenir la 14-3-3 ζ , mais n'a pas encore été formellement démontrée (Dai et al. 2005). Une approche pour évaluer l'interaction des domaines intracellulaires de la GPIb α et de la GPIb β serait de produire ces protéines sous forme recombinante et d'effectuer des analyses de type pull-down ou Biacore. *In fine*, des études par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la cristallographie permettraient de préciser le mode d'interaction à l'image de l'étude récente de l'interaction entre la GPIb α et la filamine A (Nakamura et al. 2006). Une difficulté que nous rencontrons dans cette optique est le très faible rendement de production du domaine intracellulaire de la GPIb α lorsqu'il est exprimé dans un système bactérien.

Une deuxième vérification du modèle proposé serait de reproduire dans la lignée CHO GPIb-IX les mutations introduites dans le peptide perméant R9 α 557A₃. En effet, ce peptide

calqué sur le peptide R9 α 557 a perdu sa capacité d'inhibition et pourrait dans le récepteur se comporter comme un modulateur des fonctions de signalisation.

La mutagenèse du domaine intracellulaire de la GPIIb β a donc permis l'identification d'une zone fonctionnelle sur la portion intracellulaire de la GPIIb β (164-170). Toutefois, cette cartographie fonctionnelle n'est pas complète. La séquence native de cette sous unité contient cinq alanines dans la région L¹⁵⁰-P¹⁷⁰ dont la contribution n'a pas été évaluée dans l'approche par « Alanine scanning ». Leur rôle devra être évalué par d'autres mutations par exemple en glycine. Enfin, on ne peut complètement exclure une contribution des régions N et C-terminales du domaine cytoplasmique de la GPIIb β . Une mutagenèse plus systématique par groupe de deux ou 3 résidus serait à même de mieux préserver la conformation du domaine que les délétions et pourrait identifier d'autres domaines fonctionnels.

La délétion de la région 150-170 de la GPIIb β entraîne une diminution de l'émission de filopodes mais ne l'abolit pas complètement. Ces résultats suggèrent la possible contribution d'autres sous-unités. Des questions restent posées quant au rôle de la GPIIb α qui nécessiteront une mutagenèse plus ciblée. Le rôle de la GPV semble exclu sur la base des études des souris KO. Reste le rôle de la GPIX qui, bien que possédant un domaine intracellulaire très court, ne peut être exclu et pourra être évalué dans les lignées CHO GPIIb-IX.

Un inconvénient, cependant, du modèle CHO est qu'il est très éloigné de la lignée plaquettaire. Un grand nombre de réactifs et d'anticorps ne sont pas utilisables dans cette lignée et la biologie de la cellule CHO est mal connue (contenu en intégrine endogènes, voies de signalisation,...). Au laboratoire nous avons également utilisé la lignée érythroleucémique K562 qui est d'origine humaine et provient d'une lignée tumorale d'origine hématopoïétique. Ces cellules transfectées par le complexe GPIIb-V-IX reproduisent également les fonctions d'adhésion et de signalisation (**Cranmer et al. 1999; Yuan et al. 1999**). Une difficulté de ce modèle vient de la difficulté à transfecter de manière reproductible le complexe GPIIb-IX par des techniques classiques, l'utilisation de vecteurs viraux pourrait résoudre ce problème.

Malgré l'utilité des systèmes cellulaires hétérologues de type CHO, il sera nécessaire de pouvoir transposer les données dans le modèle plaquettaire. Une approche actuellement engagée afin de manipuler le complexe GPIIb-V-IX dans la plaquette fera appel à la transduction virale de mégacaryocytes. Les rôles des résidus de la zone 164-170 seront étudiés par transduction virale à partir de souris invalidées pour le gène de la GPIIb β . Pour cela, des progéniteurs hématopoïétiques seront isolés à partir de moelle ou de foies fœtaux d'embryon GPIIb β $-/-$. Ces cellules seront transduites par des particules lentivirales contenant un gène codant pour la GPIIb β humaine contenant les mutations d'intérêt. Puis les cellules

transduites seront réimplantées dans des souris GPIIb β ^{-/-} létalement irradiées. Les plaquettes de ces souris transduites pourront être ensuite étudiées pour leur capacité à adhérer et s'activer sur une surface de FW. De plus, ces souris permettront d'évaluer l'importance des domaines intracellulaire de la GPIIb β dans l'hémostase et dans des modèles de thrombose évoqués plus loin.

Identification de nouveaux partenaires intracellulaires du complexe GPIIb-V-IX

Une approche basée sur l'immunoprécipitation du complexe GPIIb-V-IX associée à une analyse des protéines coprécipitées par spectrométrie de masse de type Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) a permis d'identifier la cyclophiline A (CypA) comme un nouveau partenaire. L'utilisation de CHO exprimant un complexe GPIIb-IX muté, des expériences de pull-down et de résonance plasmonique de surface ont établi que la CypA s'associait probablement de manière indirecte au complexe via la 14-3-3 ζ . Le traitement de plaquettes avec la cyclosporine (CsA) et l'étude des plaquettes de souris CypA^{-/-} ont permis d'entamer l'étude du rôle de la CypA dans les fonctions d'adhésion et de signalisation du complexe GPIIb-V-IX.

Dans d'autres cellules la CypA a été impliquée dans la régulation de diverses voies de signalisation. Dans le lymphocyte T, par exemple, elle contrôle l'activité de la tyrosine kinase ITK de la famille des Tec kinases (**Colgan et al. 2004**), cette enzyme étant impliquée dans l'activation du lymphocyte. Ces propriétés font de la CypA un bon candidat pour la signalisation GPIIb-dépendante. Dans la plaquette, deux Tec kinases (Btk et Tec) ont été décrites comme importantes pour les voies de signalisation qui convergent vers la PLC γ_2 , comme la signalisation GPVI (**Atkinson et al. 2003; Quek et al. 1998**). La présence d'Itk dans la plaquette sera déterminée. L'importance des autres Tec kinases pour l'activation GPIIb-dépendante pourra être étudiée en étudiant l'adhésion et l'activation des plaquettes de souris KO pour Tec, Btk et le double KO (**Atkinson et al. 2003**). Un défaut d'activation de la PLC γ_2 dans les plaquettes de KO CypA pourrait expliquer le changement de forme inhibé en réponse au FW et au collagène, mais également en réponse au fibrinogène.

Une autre protéine régulée dans le lymphocyte T par la CypA est la calcineurine. La CypA en association avec la cyclosporine A contrôle l'activité de cette phosphatase. L'expression de cette phosphatase dans la plaquette sera vérifiée. La protéine Calcium Integrin Binding protein (CIB), qui possède une homologie avec la calcineurine, pourrait être une cible potentielle de la CypA dans la plaquette. CIB est associée au domaine intracellulaire

de la sous-unité α_{IIb} (Naik et al. 1997) et intervient dans l'activation et la signalisation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Naik and Naik 2003; Tsuboi 2002).

L'association de la CypA à la 14-3-3 ζ suggère son implication dans le processus d'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, qui demande à être évaluée. Les premières données dans les souris CypA^{-/-} montrent une inhibition nette de l'émission de filopodes indiquant un rôle dans des étapes précoces de signalisation. Les résultats obtenus avec la CsA indiquent quant à eux un rôle plus général de la CypA dans des mécanismes d'activation plaquettaire en réponse aux agonistes solubles. L'étude du rôle de la CypA pourra en plus des études dans la souris CypA^{-/-} être réalisée dans les cellules CHO GPIb-IX permettant une manipulation plus fine par mutagenèse. Une stratégie d'extinction génétique par siRNAs permettra d'évaluer le rôle de cette protéine pour les fonctions du récepteur dans les lignées transfectées par le complexe et dans les lignées mégacaryocytaires (DAMI, Meg01).

L'étude de nouveaux partenaires intracellulaires ne sera pas limitée à la CypA mais portera également sur trois autres protéines identifiées par l'analyse par spectrométrie en masse. Des approches similaires à celles employées pour la CypA seront utilisées pour évaluer leur importance pour le complexe GPIb-V-IX.

L'identification de partenaires spécifiquement associés à la sous-unité GPIb β a également été engagée sur la base de données de mutagenèse dans le modèle CHO. Une stratégie de « pull-down » avec des peptides synthétiques ou avec des protéines recombinantes est en cours. Le domaine 164-170 de la GPIb β contient la sérine 166 phosphorylable par la PKA (Wardell et al. 1989). Les protéines potentiellement liées à ce domaine phosphorylé seront identifiées en utilisant un peptide de la GPIb β phosphorylé. Les protéines précipitées séparées en gel SDS PAGE seront analysées par LC/MS/MS.

Compréhension du mécanisme du changement de forme lors de l'activation plaquettaire.

Lors de leur activation les plaquettes subissent divers changements de forme comme la contraction du corps cellulaire, l'émission de filopodes et sur une surface la production d'un lamellipode. L'ensemble de ces événements repose sur la réorganisation des cytosquelettes de microtubules et d'actine. Pour la plaquette, la compréhension de ces différents mécanismes est encore loin d'être aboutie. L'activation des plaquettes au FW constitue un modèle de choix pour étudier les mécanismes de formation de filopodes ou de lamellipodes, puisqu'en

fonctions des conditions expérimentales on peut orienter la plaquette vers la formation de l'une ou l'autre de ces extensions membranaires.

Les protéines qui composent et organisent les différentes structures formées ne sont pas toutes identifiées. Une étude systématique des protéines composant les filopodes ou les lamellipodes fait aujourd'hui défaut dans la plaquette. L'organisation des filaments d'actine dans les filopodes et les lamellipodes pourra être étudiée en microscopie électronique sur des plaquettes mises à adhérer sur une surface de FW. Sur ces mêmes échantillons la présence de protéines d'orientation (Filamine, α -actinine, fimbrine, fascine), de protéines de nucléation et de coiffe (gelsoline, adducine, capZ, et Arp2/3) et enfin de protéines d'élongation (VASP/MENA, formines) pourra être évaluée par immunomarquage.

Les signaux menant à la formation de l'une ou l'autre structure sont encore très mal connus. La nécessité de signaux calciques, de la production de PI(3,4)P₂ et le clivage des filaments d'actine par la gelsoline pour amorcer le processus de réarrangement du cytosquelette d'actine est clairement établie (**Falet et al. 2002b; Hartwig et al. 1995**). La voie d'activation incluant les RhoGTPases, les protéines de la famille WASP et le complexe de nucléation Arp2/3 a longtemps été considérée comme une voie principale permettant la polymérisation d'actine F. Récemment les rôles de ces différentes protéines ont été réévalués et des signalisations indépendantes de WASP ou du complexe Arp2/3, impliquant VASP et les formines ou VASP et les protéines de capping, ont été proposées dans d'autres modèles cellulaires (**Faix and Rottner 2006; Mejillano et al. 2004; Schirenbeck et al. 2006; Schirenbeck et al. 2005**). Les cellules CHO GPIb-IX représentent un moyen pour étudier ces processus de réarrangement du cytosquelette d'actine. La simple introduction du complexe GPIb-IX dans cette lignée la rend capable de former des lamellipodes et des filopodes sur une matrice de FW, indiquant que ces cellules disposent de la machinerie intracellulaire nécessaire à ces remaniements (**Yuan et al. 1999**). La transfection de formes dominantes négatives ou des approches d'extinction génique par siRNA dans les cellules CHO GPIb-IX permettront d'étudier les rôles des différents effecteurs évoqués plus haut.

Dans la cellule les forces contractiles sont générées par l'interaction de la myosine, une protéine « moteur », avec les filaments d'actine. La myosine dispose d'une chaîne légère de ~20 kDa et d'une chaîne lourde de ~200 kDa qui contient une activité ATPasique et le site de liaison à l'actine. La plaquette exprime essentiellement la myosine non musculaire de type IIA. Plusieurs arguments suggèrent que la myosine intervient dans des mécanismes de menant au changement de forme. Au cours de l'activation plaquettaire la chaîne légère de la myosine est phosphorylée par la MLCK activant ainsi l'activité motrice de la protéine (**Daniel et al.**

1984). L'état de phosphorylation de la myosine est contrôlé par des voies de signalisations faisant intervenir soit le calcium et la calmoduline ou la GTPase RhoA et la RhoKinase. La myosine est également décrite comme un des composants des adhérences focales et des fibres de stress qui se forment après activation des intégrines. Enfin, la présence dans les extrémités des filopodes de myosines non conventionnelles comme la myosine X suggère un rôle de ces protéines dans la formation de ces extensions (**Berg and Cheney 2002**). L'étude du rôle de la myosine dans les fonctions plaquettaires a été entamée au laboratoire par la production de souris invalidées pour l'exon 1 du gène *MYH9* codant pour la chaîne lourde de la myosine IIA non musculaire. Des résultats préliminaires suggèrent un rôle clef de la myosine dans le contrôle de la forme de la plaquette. D'une part les plaquettes au repos de ces souris ont une ultrastructure anormale avec une forme ovoïde, des invaginations de membrane dans la cellule et une distribution des granules anormale. D'autre part, ces plaquettes ont un changement de forme complètement inhibé en réponse à des faibles doses d'agonistes (**Leon et al, manuscrit en préparation**).

Importance de la signalisation précoce du complexe GPIb-V-IX pour l'hémostase et la thrombose.

Le rôle de la signalisation déclenchée par le complexe GPIb-V-IX dans l'hémostase et la thrombose reste à démontrer. Dans le modèle habituellement avancé, le rôle du complexe GPIb-V-IX est limité à la capture et au ralentissement des plaquettes au niveau de lésion. Les plaquettes en contact avec le sous endothélium vont ensuite pouvoir engager une activation via notamment les récepteurs au collagène et aux agonistes solubles générés (ADP, TXA₂, thrombine) générés localement. La signalisation transmise par le complexe est de faible intensité (faibles signaux calciques transitoires et de faible amplitude) et pourrait être considérée comme mineure au regard d'agonistes puissants comme l'ADP ou la thrombine. Cependant, son rôle ne peut être exclu. Premièrement, elle survient à une étape clef et à un stade précoce dans la séquence d'évènements conduisant à la croissance du thrombus. Par ailleurs, l'argument d'une faible signalisation n'exclut pas un rôle *in vivo*. D'autres récepteurs plaquettaires considérés comme mineurs ou entraînant des signalisations de faible intensité, comme le récepteur α_2 adrénergique, le récepteur à la sérotonine ou le récepteur P2X₁ ont montré leur importance fonctionnelle dans un modèle de souris KO (**Hechler et al. 2003; Pozgajova et al. 2006; Walther et al. 2003**).

Une étape indispensable pour établir le rôle de cette signalisation dans l'hémostase sera de pouvoir dissocier les fonctions d'adhésion et de signalisation du complexe GPIb-V-IX. Les résultats obtenus dans ce travail permettent d'envisager ce découplage puisqu'une inactivation de la signalisation du complexe GPIb-V-IX a été obtenue en ciblant le domaine intracellulaire de la GPIb β sans modifier l'adhésion au FW. Une première approche pour transférer ces données dans la plaquette a été entreprise en produisant une lignée de souris knockin exprimant une GPIb β délétée de son domaine intracellulaire. Malheureusement, les plaquettes de ces souris ont un taux d'expression du complexe GPIb-V-IX abaissé, reproduisent le phénotype d'un patient Bernard-Soulier avec un temps de saignement allongé, une numération plaquettaire réduite, et des plaquettes de grandes tailles. Ces caractéristiques empêchent de faire la distinction nette entre un effet dû à la signalisation diminuée et les taux abaissés de GPIb. Malgré tout on observe une certaine adhésion au FW mais une signalisation diminuée. De manière intéressante, on note une protection dans un modèle de thrombose induite au laser affectant peu l'hémostase (**Strassel et al, 2006, soumis à ATVB**).

Une stratégie basée sur la réintroduction de la GPIb β humaine contenant les mutations $\Delta 150-170$ dans les souris KO GPIb β par transduction virale mentionnée plus haut, devrait permettre d'obtenir un modèle où les fonctions d'adhésion et de signalisation seront plus nettement dissociées.

Le rôle du changement de forme déclenché par la signalisation du complexe GPIb-V-IX est une question encore en suspens. L'émission de filopodes pourrait contribuer au ralentissement des plaquettes lors de la capture sur le FW. La P-selectine est exposée à la surface des cellules endothéliales activées et va engager une interaction avec son contre-récepteur PSGL-1 présent à la surface des leucocytes. Cette association va permettre le ralentissement et le roulement des leucocytes au niveau du site d'inflammation (**Springer 1995**). Elle va également induire l'activation de l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ des leucocytes, nécessaire pour établir des adhésions plus stables. Une séquence similaire d'événements est envisageable pour la plaquette. En présence de forces de cisaillement élevées, le complexe GPIb-V-IX permet le ralentissement des plaquettes au niveau du sous endothélium exposé et il initie une activation nécessaire à l'engagement des intégrines plaquettaires nécessaires à l'adhésion stable des plaquettes et leur agrégation. La production de filopodes pourrait participer au processus de ralentissement en établissant des points de contact transitoires qui vont assurer le ralentissement progressif de la cellule. Cette hypothèse pourra être testée dans des expériences de perfusion sur une surface de FW avec des cellules CHO GPIb-IX. Les répercussions d'un

défaut d'émission de filopodes sur la vitesse de roulement des cellules à la surface de la matrice seront mesurées. Pour ces expériences d'adhésion en flux, les cellules CHO GPIb-IX présentent le défaut majeur de ne pas supporter des forces de cisaillement élevées, empêchant ainsi de se placer dans les conditions d'étude optimum des fonctions du complexe GPIb-V-IX. L'obtention de plaquettes exprimant des formes mutées du domaine intracellulaire de la GPIb β permettront d'évaluer les conséquences du changement de forme sur les propriétés cohésives en conditions de flux artérielles.

ANNEXES

Cartographie fonctionnelle des domaines intracellulaires de la GPIb α et de la GPIb β .

Annexe 1 : Publication n°4 :

“ Identification of a novel 14-3-3 ζ binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Iba.” – 2003

Annexe 2 : Publication n°5

“Synthesis of GPIb β with novel transmembrane and cytoplasmic sequences in a Bernard-Soulier patient resulting in GPIb-defective signalling in CHO cells”- 2006

Annexe 1 : Publication n°4 :

“ Identification of a novel 14-3-3 ζ binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Iba.” – 2003

P. Mangin, T. David, V. Lavaud, SL. Cranmer, I. Pikovski, SP. Jackson, MC. Berndt, JP. Cazenave, C. Gachet, F. Lanza.

Blood, 2004 Jul 15 ; 104(2) :420-7

L'interaction entre le complexe plaquettaire GPIb-V-IX et le complexe GPIb-V-IX déclenche une signalisation menant au changement de forme des plaquettes (passage d'une forme discoïde à ronde et émission de filopodes). Une seconde signalisation se manifeste par une signalisation calcique plus forte et se traduit par l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, cette dernière étant responsable de l'adhésion irréversible et à l'étalement des plaquettes sur une surface recouverte de FW. Le mécanisme exact impliqué dans l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ n'est pas connu, mais un partenaire probable est la protéine adaptatrice 14-3-3 ζ . Des cellules transfectées par des complexes GPIb-IX incapables d'interagir avec la 14-3-3 ζ montrent un processus d'étalement sur le FW modifié, impliquant la 14-3-3 ζ dans l'activation des intégrines (**Bialkowska et al. 2003; Gu et al. 1999**). Un site d'interaction à la 14-3-3 ζ , contenant une sérine phosphorylée, a été identifié dans la partie C-terminale de la GPIb α (606-610) (**Du et al. 1996**). La sérine en position 609 est phosphorylée dans les plaquettes au repos et semble particulièrement importante pour la liaison de la 14-3-3 ζ (**Bodnar et al. 1999**). Les domaines intracellulaires de la GPIb β et de la GPV possèdent également des sites de liaison pour la 14-3-3 ζ (**Andrews et al. 1998**).

L'objectif de ce travail a été d'étudier finement l'interaction entre la GPIb α et la 14-3-3 ζ grâce à des cellules CHO transfectées par des complexes GPIb-IX dont la GPIb α contient des délétions successives d'environ 11 acides aminés de son domaine intracellulaire. Des expériences de co-immunoprécipitation du complexe GPIb-IX à partir de lysats de ces cellules ont montré une perte d'interaction pour la 14-3-3 ζ pour une délétion comprise entre les acides aminés 580 et 590 du domaine intracellulaire de la GPIb α . Ce domaine contient deux sérine (Ser⁵⁸⁷ et Ser⁵⁹⁰) qui sont phosphorylées dans la plaquette non stimulée et déphosphorylée après adhésion des cellules sur une surface de FW. Des CHO GPIb-IX exprimant une mutation Ser⁵⁹⁰→Ala ou une double mutation Ser⁵⁸⁷→Ala, Ser⁵⁹⁰→Ala montrent une perte d'association à la 14-3-3 ζ et une diminution de l'étalement des cellules sur une surface de FW. Ces résultats

montrent l'importance de la région 580-590, et notamment le résidu Ser⁵⁹⁰ phosphorylé, pour l'association à 14-3-3ζ et confortent l'hypothèse d'un rôle de la 14-3-3ζ dans une signalisation qui mène à l'activation des intégrines.

Identification of a novel 14-3-3 ζ binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ib α

Pierre Mangin, Tovo David, Vincent Lavaud, Susan L. Cranmer, Inna Pikovski, Shaun P. Jackson, Michael C. Berndt, Jean-Pierre Cazenave, Christian Gachet, and François Lanza

The glycoprotein Ib-V-IX (GPIb-V-IX) complex interacts with subendothelial von Willebrand factor (VWF) to ensure recruitment of platelets at sites of vascular injury, a process that culminates in integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent stable adhesion and spreading. Interaction of the 14-3-3 ζ adaptor protein with the C-terminal 606-610 phosphoserine motif of the GPIb α subunit has been implicated in the control of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation and cell spreading. In this study, we have examined potentially novel 14-3-3 ζ binding sites by expressing mutant forms of GPIb α in Chinese-ham-

ster-ovary (CHO) cells. Analysis of a series of neighboring 11-12 residue deletions identified a critical role for the 580-LVAGRRPSALS-590 sequence in promoting GPIb α -14-3-3 ζ interaction. Development of a phosphospecific antibody demonstrated high levels of phosphorylation of the Ser587 and Ser590 residues in resting platelets (which became dephosphorylated during platelet spreading on VWF), and peptides containing these phosphorylated residues effectively displaced 14-3-3 ζ from GPIb α . Analysis of single and double alanine substitutions

of Ser587 and Ser590 demonstrated a major role for these residues in promoting GPIb α -14-3-3 ζ binding. Moreover, these cell lines exhibited a defect in cell spreading on immobilized VWF. These studies demonstrate the existence of a second major 14-3-3 ζ binding site within the cytoplasmic tail of GPIb α that has an important functional role in regulating integrin-dependent cell spreading. (Blood. 2004;104:420-427)

© 2004 by The American Society of Hematology

Introduction

The 14-3-3 protein family consists of ubiquitous homodimeric or heterodimeric intracellular adaptor proteins that take part in the signaling pathways of numerous biologic responses.¹ There have been 5 isoforms identified in human platelets, the ϵ and η isoforms being weakly expressed relative to the more abundant γ , ζ , and β isoforms.² The crystal structure of 14-3-3 ζ revealed the association of 2 monomers, each composed of a bundle of 9 antiparallel helices, to form a large negatively charged groove that could be implicated in interactions with other proteins.³ The 14-3-3 proteins bind to specific phosphoserine-containing motifs,⁴ and their dimeric nature allows them to act as intramolecular and intermolecular phosphorylation-dependent bridges.⁵ The functions of the different isoforms in platelets are, however, still poorly understood.

In a seminal study, it was reported that 14-3-3 ζ interacted with the platelet von Willebrand factor (VWF) receptor, the glycoprotein Ib-V-IX (GPIb-V-IX) complex.⁶ A binding site for 14-3-3 ζ was found at the C-terminus of GPIb α within a serine-rich 606-SGHSL-610 sequence bearing similarities to phosphoserine containing 14-3-3 ζ binding motifs.^{1,7} Further work showed that the serine at position 609 was predominantly phosphorylated in resting platelets and that phosphorylation was required for 14-3-3 ζ binding.⁸ Glutathione S-transferase (GST)-14-3-3 ζ pull-down and immuno-

precipitation studies of GPIb-IX-transfected cells pointed to the existence of a separate binding or regulatory site in the GPIb α 570-590 domain.⁹ Experiments using synthetic GPIb β and GPV intracellular peptides suggested that these subunits could also interact with 14-3-3 ζ .¹⁰ Phosphorylation of the GPIb β serine at position 166 by a protein kinase A (PKA)-dependent mechanism has been proposed to play a role in regulating 14-3-3 ζ interactions.^{9,11}

Recent studies have demonstrated that the GPIb-14-3-3 ζ interaction is dynamically regulated, such that shear-induced activation of platelets leads to dissociation of 14-3-3 ζ from GPIb.¹¹ While the precise mechanisms regulating this have not been defined, changes in the phosphorylation status of Ser609 may play an important role. A functional correlation between 14-3-3 ζ release from GPIb and integrin activation has been suggested from studies in Chinese-hamster-ovary (CHO) cells transfected with the GPIb-IX complex following deletion of the Glu591-Leu610 GPIb α C-terminal domain.^{8,9} This deletion prevented 14-3-3 ζ -GPIb interactions, leading to defective integrin dependent spreading.¹² However, 2 further studies, examining integrin activation using CHO cells transfected with the same constructs, have demonstrated either normal or increased cell spreading.^{13,14}

To establish a precise functional map of the 14-3-3 ζ binding regions in the GPIb α cytoplasmic tail, CHO cells were transfected

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U.311, Etablissement Français du Sang-Alsace, Strasbourg, France; the Australian Centre for Blood Diseases, Department of Medicine, Monash University, Box Hill Hospital, Melbourne, Australia; and the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Clayton, Australia.

Submitted August 21, 2003; accepted March 16, 2004. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, March 30, 2004; DOI 10.1182/blood-2003-08-2881.

Supported in part by a grant from the Australia National Health & Medical Research Council and National Heart Foundation to S.L.C., and S.P.J., P.M., and T.D. were supported by the "Association de Recherche et de

Développement en Médecine et Santé Publique" (ARMESA). M.C.B. was supported by National Institutes of Health (NIH) grant RO1 50744-02.

Reprints: François Lanza, INSERM U.311, Etablissement Français du Sang-Alsace, 10 rue Spielmann, BP 36, 67065 Strasbourg Cedex, France; e-mail: francois.lanza@efs-alsace.fr.

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

© 2004 by The American Society of Hematology

with constructs of the GPIb-IX complex containing short 11-12 residue deletions and single mutations of the GPIb α intracellular domain. The effects of these mutations on GPIb-14-3-3 ζ association and cell spreading on VWF were examined. In addition to the known 605-610 region, a new binding site was identified between residues 580 and 590 that resembled other 14-3-3 ζ ligands and required Ser residues at positions 587 and 590. Phosphorylation of the diSer587/590 motif was demonstrated in resting platelets using a specific antibody, while its dephosphorylation and that of Ser609 were observed during platelet adhesion and activation on a VWF matrix. Following phosphatase treatment, dephosphorylation led to 14-3-3 ζ release from GPIb-IX. Furthermore, lack of 14-3-3 ζ association with GPIb α in cells expressing the GPIb α 580-590 deletion mutant, Ser587/590 to Ala substitution, or deletion of the 605-610 sequence resulted in a reduced ability of the VWF-GPIb α interaction to activate endogenous integrins and induce cell spreading.

Materials and methods

Materials

Human VWF (HVWF) was purified according to a published procedure.¹⁵ Botrocetin and monoclonal antibodies (mAbs) ALMA.12 against GPIb α and RAM.1 against GPIb β were developed in our laboratories. The polyclonal antibody C-16 against 14-3-3 ζ was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), while the polyclonal antibody K3584 against the GPIb-IX complex was a gift from Dr B. Steiner (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). There were 4 peptides representing different phosphorylation states of the 580-590 sequence of human GPIb α (LVAGRRPSALS, LVAGRRPpSALS, LVAGRRPSALpS, and LVAGRRPpSALpS) synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium), who also raised rabbit polyclonal antiserum pSGPIb1 against peptide LVAGRRPpSALpS. GPIb α peptides YSGHpSL and YSGHSL containing an N-terminal cysteine were synthesized by Chiron Mimotopes (Melbourne, Australia). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG [GAR-HRP]) was from Jackson Laboratories (West Grove, PA). Prostaglandin I₂ (PGI₂), bovine serum albumin (BSA), fatty-acid-free human serum albumin (HSA), TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate)-phalloidin, dithiothreitol (DTT), and protein G-Sepharose CL4B were from Sigma Chemicals (St Louis, MO). Apyrase was purified from potatoes as previously described.¹⁶ Cover glasses and coverslips were purchased from VWR (Strasbourg, France) and enhanced chemiluminescence (ECL) reagents and Hyper-film-ECL, from Amersham (Bucks, United Kingdom). ReoPro was from Lilly Corporate Center (Indianapolis, IN), complete protease inhibitor cocktail and calpain inhibitor 1 were from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany), and 1-paraformaldehyde (PFA) was from Electron Microscopy Sciences (Washington, PA). Laemmli buffer, Tween 20, Ready gels (4%-15%), and immunoblotting polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes were purchased from Bio-Rad (Ivry sur Seine, France) and NHS-Biotin, Sulfo-NHS-Biotin, and Restore Western blot stripping buffer, from Pierce (Rockford, IL).

Antibody production

The anti-phospho-GPIb α (pSer609) antibody was raised by immunizing New Zealand White rabbits with the phosphorylated CYSGHpSL peptide conjugated to keyhole limpet hemocyanin. The anti-peptide antibody was affinity purified with the immunizing peptide conjugated to BSA and coupled on a 1:1 column of Affi-Gel 10/15. The antibody was then absorbed with the nonphosphorylated CYSGHSL peptide conjugated to BSA, also coupled on a 1:1 column of Affi-Gel 10/15. The specificity of the anti-pS609 antibody was verified by dot immunoblots against the CYSGH(pS)L and CYSGHSL peptides conjugated to albumin (1:10 wt/wt), versus antibody that bound to both columns, anti-Ib α +/-P, the reactivity of which was phosphorylation nonspecific.

Cell lines

CHO cell lines stably expressing the wild-type GPIb-IX complex or GPIb α deleted forms of GPIb-IX have been described previously.¹⁷⁻¹⁹ Stable cell lines with Ser to Ala mutations at positions 587, 590, and a double 587/590 mutation were obtained following transfection of the GPIb α cDNA into GPIb β IX expressing cells as previously described.¹⁸ Oligonucleotide-directed mutagenesis was performed by polymerase chain reaction amplification of PDXGPIb α vector with Pfu DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA), digestion with *DpnI* (Roche Molecular Biochemicals), and transformation in TOP10 bacteria (Invitrogen, San Diego, CA).

Platelet preparation

Washed human platelets were prepared from acid citrate dextrose (ACD) anticoagulated blood obtained from aspirin-free healthy volunteers by sequential centrifugation as previously described.¹⁶

Biotinylation

Cell biotinylation has been described in detail elsewhere.¹⁹ Briefly, platelets were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), centrifuged at 1900g for 8 minutes, and incubated for 30 minutes at room temperature (RT) in PBS containing 100 μ g/mL NHS-Biotin at a final concentration of 10⁶ platelets/ μ L.

Lysate preparation

Adherent CHO cells were detached with PBS EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid; 5 mM), and washed 3 times in PBS. The lysates were prepared by resuspending washed platelets (10⁶ platelets/ μ L) or washed cells (20 \times 10⁶ cells/mL) in ice-cold 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), 2.5 mM Na₃VO₄, 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 10 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), pH 7.5, 17 μ g/mL calpain inhibitor I, and 1X protease inhibitor cocktail. After 20 minutes, the lysates were centrifuged at 14 000g for 15 minutes to remove insoluble material. Lysates pretreated with potato alkaline phosphatase (PAP) were prepared under the same conditions but without added Na₃VO₄ or NaF.

Immunoprecipitation and immunodepletion

Cell lysates were cleared twice by incubation for 60 minutes at 4°C with 50 μ L protein G-Sepharose CL4B (50% wt/vol suspension in lysis buffer). Proteins were immunoprecipitated from 50 μ L cleared lysate by addition of 5 μ g mAb and 80 μ L protein G-Sepharose CL4B (50% wt/vol suspension) and rotation for 2 hours at 4°C. The beads were washed 3 times in PBS containing 1% Triton X-100 before addition of 45 μ L of 1X Laemmli buffer (62.5 mM Tris, pH 6.8, 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 25% glycerol, 0.01% bromophenol blue) containing 10 mM DTT. Samples were boiled for 5 minutes and proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on 4% to 15% gels and transferred to PVDF membranes. Biotinylated proteins were revealed with streptavidin-HRP as previously described,¹⁹ while nonbiotinylated proteins were identified by Western blotting as previously described.²⁰

In immunodepletion experiments, a first immunoprecipitation was performed using a 2- μ L aliquot of cleared platelet lysate to ensure an excess of anti-phospho-GPIb IgG (pSGPIb1 or pSer609) and 80 μ L protein G-Sepharose CL4B (50% wt/vol suspension). The remaining supernatant was reprecipitated with a mAb against GPIb β (RAM.1).

Enzyme immunoassays

Synthetic peptides corresponding to the GPIb α 580-590 domain were coated from 5 μ g/mL solutions in 50 mM carbonate buffer (pH 9.5) onto the wells of 96-well microtiter plates (Maxi-Sorb; Nunc, Rochester, NY) for 2 hours at RT. After 3 washes in PBS-T, the wells were blocked by incubation for 30 minutes at 37°C with 200 μ L of 1% BSA in PBS. All subsequent incubations were carried out for one hour at RT, and each was followed by washing 3 times with PBS-Tween 0.05% (PBS-T). The wells were treated first with 100 μ L diluted pSGPIb1 antiserum and then with GAR-HRP

(1:1000 dilution). The secondary antibody was detected by addition of a chromogenic substrate (OPD: o-phenylenediamine dihydrochloride; Pierce) and measurement of optical densities at 490 nm in a THERMO-max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Cell adhesion to VWF

Glass coverslips were coated with HVWF (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in a humid chamber for 90 minutes at RT and then blocked for 60 minutes with PBS containing 1% BSA. CHO cells in PBS were incubated with the coverslips in the wells of microtiter plates (10^5 cells/well) at 37°C for 20 minutes. The coverslips were then washed 3 times in PBS, fixed for 20 minutes with 4% PFA in PBS, washed 3 times in PBS, and labeled for 30 minutes in the dark with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TRITC-phalloidin. After 3 more washes in PBS and a last wash in water, the adherent cells were covered with 8 μL Mowiol 4-88 solution (France Biochem, Meudon, France), and the coverslips were mounted on microscope slides. Fluorescence was visualized by ultraviolet (UV) illumination at 570 nm under a Leica DMDL microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The cell count and morphology of the adherent cells were scored in 8 random fields ($2.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{field}$).

Analysis of platelet adhesion by confocal microscopy

Glass coverslips were coated with HVWF as before, or coated with 0.01% polylysine for 5 minutes at RT and dried for one hour at 60°C. Washed platelets in Tyrode buffer were incubated with the coverslips in the wells of microtiter plates (3×10^6 platelets/well) for different times at 37°C. When indicated, 5 mM EDTA and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ReoPro were added to block integrin activation. The coverslips were then washed 3 times in PBS, fixed for 15 minutes with 4% PFA in PBS, washed 3 times in PBS, and blocked with PBS containing 0.2% BSA and 1% normal goat serum (NGS) for one hour at RT. All subsequent incubations were followed by 3 washes in PBS-T. The samples were labeled for 45 minutes in the dark with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ALMA.12-cyanin 3 (Cy3); permeabilized for one hour in PBS containing 0.2% BSA, 0.05% saponin, and 1% NGS; labeled for 45 minutes in the dark with pSGPIb1 or pSer609 antiserum diluted 1:10 000 in the blocking buffer; and finally counterstained with GAR-Cy5 (1:2000 dilution). The coverslips were then washed in PBS, rinsed with water, and mounted in Mowiol 4-88. The labeled platelets were examined under a Zeiss laser scanning microscope (LSM 510 invert; Carl Zeiss, Le Pecq, France) equipped with a Planapo oil-immersion lens ($\times 63$, numerical aperture 1.4), and the Zeiss CLSM instrument software 2.8. Cy3 emission was excited with the 543-nm He/Ne laser line and signals were filtered with a long-pass 595-nm filter.

Shape change of CHO cells adhering to VWF

CHO cells ($1 \times 10^6/\text{mL}$) suspended in PBS containing 2 mM Ca^{2+} , 2 mM Mg^{2+} , and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ botrocetin were allowed to adhere to an HVWF matrix (deposited from a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution) for 30 minutes at 37°C. After fixation, the adherent cells were stained with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TRITC-phalloidin for 30 minutes, and the coverslips were mounted in Mowiol 4-88 solution on microscope slides. The cell morphology was examined by fluorescence microscopy (UV illumination at 570 nm, Leica DMDL microscope, PL Fluotar 40 \times /1.00-0.5 oil immersion objective) and visualized using a Micromax 1300Y digital camera (Princeton Instruments, Tucson, AZ) and Metamorph 4.5 software (Princeton Instruments), and numbers of adherent cells and spreading cells were scored in 5 random fields.

Statistical analyses

The statistical significance of differences between means was evaluated using Student *t* test for paired samples or Fisher exact test, and *P* values of less than .05 were considered significant.

Results

The GPIIb α 580-590 intracytoplasmic sequence is required for the interaction between the GPIIb-IX complex and 14-3-3 ζ

Interaction of 14-3-3 ζ with the GPIIb-IX complex was studied in human platelets and transfected CHO cells, following biotinylation

and immunoprecipitation with an antibody against GPIIb α or GPIIb β . As shown in Figure 1A, coimmunoprecipitation of the 2 proteins was confirmed in human platelet lysates. To identify potentially novel 14-3-3 ζ binding sites on GPIIb α , this subunit was subjected to a series of truncations covering the 535-610 intracellular region and stably transfected into GPIIb-IX CHO cells. The GPIIb-IX-14-3-3 ζ binding capacity was then evaluated by coimmunoprecipitation with an anti-GPIIb β mAb. Deletion of the known 605-610 binding site ($\Delta 605-610$) and larger truncations eliminating this domain ($\Delta 518-610$, $\Delta 569-610$, $\Delta 576-610$, and $\Delta 595-610$) prevented GPIIb-IX-14-3-3 ζ coprecipitation (Figure 1B). Conversely, deletion of the more central 535-569 region led to wild-type behavior and allowed efficient association of GPIIb-IX with 14-3-3 ζ (Figure 1B). To examine additional sites upstream of the 605-610 region, cells with shorter deletions spanning the 535-590 domain were evaluated (Figure 1C). All the deletions allowed for efficient GPIIb-IX-14-3-3 ζ binding with the exception of $\Delta 580-590$, which prevented association with 14-3-3 ζ . These results suggested the existence of a second 14-3-3 ζ binding site in addition to the previously identified 605-610 sequence.⁸

Deletion of the GPIIb α 580-590 sequence does not prevent phosphorylation of Ser609

Phosphorylation of Ser609 in the 605-610 sequence has been reported to be critical for the interaction of GPIIb α with 14-3-3 ζ .⁸ Therefore, the possibility that the 580-590 deletion could indirectly block 14-3-3 ζ interactions by interfering with Ser609 phosphorylation was explored. An antibody (pSer609) was raised and immunopurified against the YSGHpSL peptide. This antibody was specific

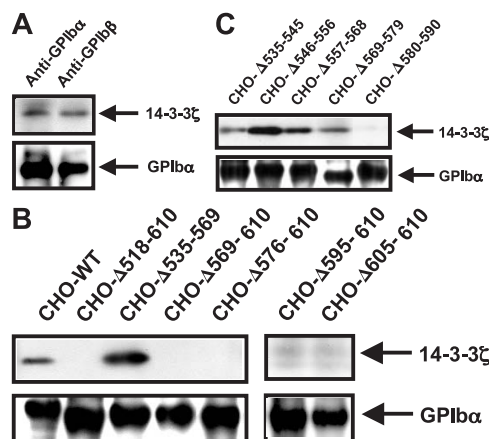


Figure 1. GPIIb-IX-14-3-3 ζ association in platelets and in GPIIb-IX CHO cells with intracellular GPIIb α deletions. Platelets (A) or CHO cells (B-C) were incubated with membrane-permeable EZ-link-NHS-Biotin and lysed in 1% Triton X-100. GPIIb-IX complexes were immunoprecipitated with an anti-GPIIb monoclonal antibody, separated by reduced 4% to 15% SDS-PAGE, and transferred to PVDF membranes. Coimmunoprecipitated 14-3-3 ζ was detected using the anti-14-3-3 ζ -specific polyclonal antibody C-16 and revealed by ECL. Membranes were then stripped and reprobed with streptavidin-HRP to reveal biotinylated GPIIb α . The upper panels correspond to the region of the gel containing the approximately 29 kDa 14-3-3 ζ band, and the lower panels correspond to the region containing the approximately 135 kDa GPIIb α band. (A) In human platelets, 14-3-3 ζ was coimmunoprecipitated with the GPIIb-IX complex by an antibody against GPIIb α or GPIIb β (for simplicity only the GPIIb α band is shown). (B) In transfected CHO cells, 14-3-3 ζ was coprecipitated with the wild-type (WT) GPIIb-IX complex and with a complex containing a central ($\Delta 535-569$) deletion. Complete deletion of the intracellular domain of GPIIb α ($\Delta 518-610$) or progressive truncations from the C-terminal end ($\Delta 605-610$, $\Delta 595-610$, $\Delta 576-610$, and $\Delta 569-610$) prevented GPIIb-IX-14-3-3 ζ association. (C) In cells containing a series of shorter deletions of the GPIIb α 535-590 region, GPIIb-IX-14-3-3 ζ interaction was absent only for the $\Delta 580-590$ mutant receptor. Results are representative of 4 separate experiments.

for the phosphorylated form of the peptide in dot blot experiments (Figure 2A) and recognized GPIbα from lysates of resting platelets (Figure 2B) and CHO cells transfected with normal GPIb-IX (Figure 2C). pSer609 also recognized the 580-590 deleted form of GPIbα in CHO cell lysates, indicating normal phosphorylation at Ser609, whereas the 518-610 deleted form of GPIbα was not revealed by the antibody (Figure 2C).

A GPIbα 580-590 peptide competes with GPIb-IX for association with 14-3-3ζ

The GPIbα 580-590 sequence is well conserved between the human, mouse, and dog species, and its structure with the serines at positions 587 and 590 conformed to a consensus phosphorylation-dependent 14-3-3ζ binding domain, RX_{1,2}(S_p)X_{2,3}S (Figure 3C).^{21,22} To evaluate the ability of this sequence to bind 14-3-3ζ and the importance of Ser587 and Ser590, phosphorylated and nonphosphorylated peptides were synthesized: LVAGRRPpSALpS (P₁P₂) and LVAGRRPSALS (ØP). Addition of these peptides to platelet lysates demonstrated that the diphosphorylated peptide (P₁P₂) efficiently displaced 14-3-3ζ from GPIb-IX, relative to the nonphosphorylated peptide (ØP), irrelevant peptide sequence, and no peptide control (Figure 3B).

The 580-590 domain of GPIbα is phosphorylated in resting platelets

To further analyze the role of the phosphoserines of the GPIbα 580-590 sequence in 14-3-3ζ binding, antibodies were raised against the P₁P₂ peptide. The pSGPIb1 antiserum specifically bound to P₁P₂ as detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) but did not recognize the nonphosphorylated peptide ØP

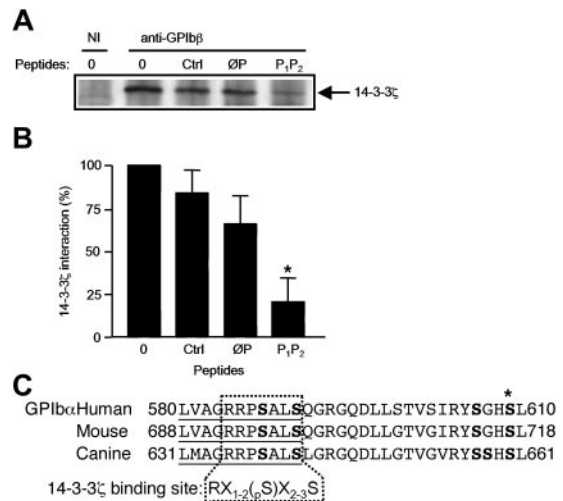


Figure 3. A phosphoserine GPIbα 580-590 peptide inhibits GPIb-IX-14-3-3ζ association. (A) Triton X-100 lysates of resting human platelets were immunoprecipitated with the mAb RAM.1 in the presence or absence of the nonphosphorylated ØP (LVAGRRPSALS) or diphosphorylated P₁P₂ (LVAGRRPpSALpS) GPIbα 580-590 synthetic peptide. Ctrl represents incubation with an unrelated peptide (TNRQPRD-KNVKK) from the P2Y₁₂ receptor sequence. RAM.1 coprecipitation of 14-3-3ζ was reduced in the presence of P₁P₂ and to a lesser extent in the presence of ØP, compared with incubation with no peptide or the Ctrl peptide. NI indicates nonimmune serum. (B) The coprecipitated 14-3-3ζ band was quantified with Quantity One Software (Bio-Rad, Hercules, CA) in 3 separate experiments, and results were expressed as the mean percentage (± SEM) of the band obtained in the absence of peptide (*P < .05). (C) Alignment of the amino acid sequences of the GPIbα 580-610 region in the human, mouse, and dog species. Ser residues are in boldface. The 580-590 domain (underlined) contains fully conserved serine residues with a spacing that corresponds to a consensus 14-3-3ζ binding motif.²² X indicates any amino acid; S, serine; pS, phosphorylated serine; R, arginine; and *, the pS609 residue. (GPIbα human, GPIbα mouse, and GPIbα canis have the GenBank accession numbers PO7359, AAC53320, and AAC14361, respectively.)

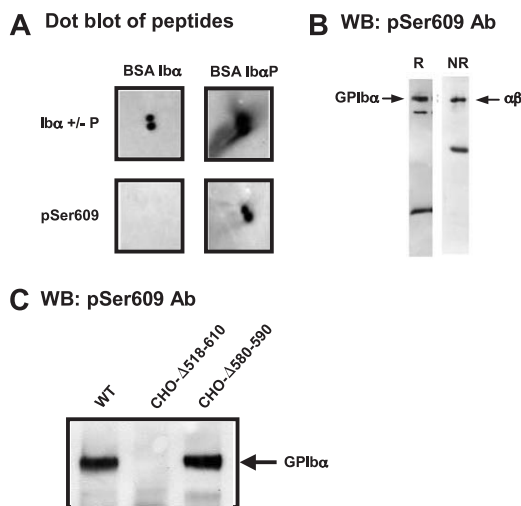


Figure 2. Deletion of the GPIbα 580-590 sequence does not interfere with Ser609 phosphorylation. (A) Dot blots of BSA-CYSGHSL or BSA-CYSGH(pS)L (peptides corresponding to the nonphosphorylated and phosphorylated C-terminus of GPIbα) with IgG against either the phosphorylation-independent (anti-Ibα +/- P) or phosphorylated (pSer609) C-terminal peptide of GPIbα. Blots were visualized using standard ECL substrates. (B) Western blots (WB) of whole platelet lysates analyzed by SDS-PAGE under reducing (R) or nonreducing (NR) conditions and probed with anti-pSer609 (pSer609). The major band at 135 kDa corresponds to GPIbα (disulfide-linked to GPIbβ, nonreduced); the band at approximately 20 kDa reduced or approximately 50 kDa nonreduced represents the membrane-associated calpain digestion fragment of GPIbα (minus the soluble extracellular glycoalcin fragment), which is linked to GPIbβ when nonreduced. (C) Triton X-100 lysates of GPIb-IX CHO cells were separated by 4% to 15% SDS-PAGE and immunoblotted with the pSer609 polyclonal antibody. Phosphorylated GPIbα was detected in cells expressing the wild-type complex or a complex containing the Δ580-590 deletion but not in cells lacking the entire GPIbα intracellular domain.

(Figure 4A). pSGPIb1 also recognized the monophosphorylated P₁ (LVAGRRPpSALS) and P₂ (LVAGRRPSALpS) peptides. pSGPIb1 revealed a band corresponding to GPIbα in lysates from resting platelets, suggesting phosphorylation of this domain in the native protein (Figure 4B). The pSer609 antibody also recognized GPIbα, confirming previous findings that Ser609 is phosphorylated in resting platelets.⁸ The specificity of pSGPIb1 for the phosphorylated motif in the native sequence was demonstrated by a drop in reactivity in platelet lysates treated with alkaline phosphatase (Figure 4C). Similarly pSer609 labeling decreased following phosphatase treatment. Hence in the resting state, GPIbα appeared to be doubly phosphorylated at the 580-590 and 609 sites. The degree of phosphorylation at these 2 positions was then evaluated in resting platelets by immunodepletion of lysates with the pSGPIb1 antiserum or pSer609 antibody. After pSGPIb1 or pSer609 depletion, reprecipitation with a GPIbβ antibody yielded significantly less GPIbα than following nonimmune (Figure 4D), suggesting that GPIbα is similarly phosphorylated at high levels in the 580-590 and 609 domains. To confirm the importance of GPIbα phosphorylation for 14-3-3ζ binding, GST-14-3-3ζ pull-down experiments were performed using phosphatase-treated platelet lysates. The results demonstrate that dephosphorylation prevented GPIbα association with 14-3-3ζ (Figure 4E), an effect that correlated with the decrease in pSGPIb1 and pSer609 labeling.

Phosphorylation status of the GPIbα 580-590 and 609 domains in resting and adherent platelets

To evaluate phosphorylation of GPIbα in intact platelets, dual-label confocal analysis was performed using either pSGPIb1 or pSer609

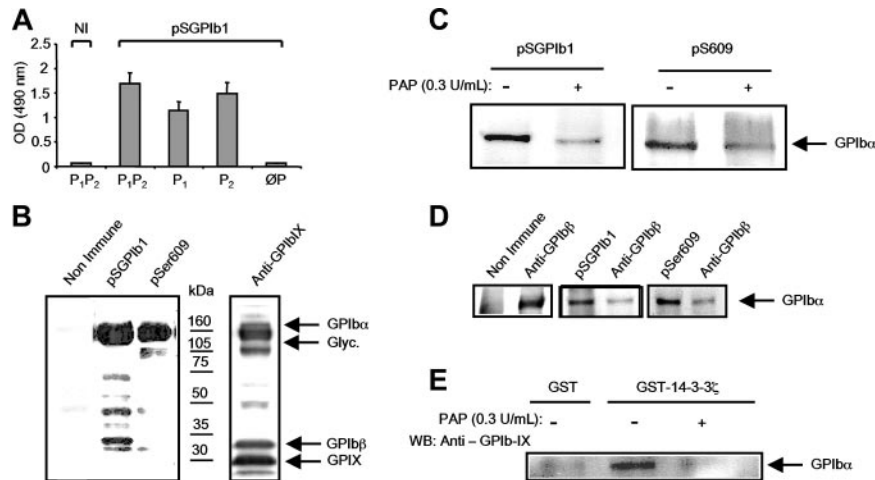


Figure 4. Serine phosphorylation of the GPIIb α 580-590 sequence in resting platelets and requirement for 14-3-3 ζ binding. (A) The rabbit antiserum pSGPIIb1 was obtained by immunization with the P₁P₂ phosphopeptide (LVAGRRPpSALpS) and its reactivity was analyzed by ELISA. Dilutions of the serum were incubated with immobilized GPIIb α peptides and revealed with GAR-HRP. pSGPIIb1 recognized P₁P₂ and the monophosphorylated P₁ (LVAGRRPpSALS) and P₂ (LVAGRRPpSALpS) peptides but not the nonphosphorylated ØP (LVAGRRPpSALS) peptide. Results are the mean (\pm SEM) of 3 separate experiments, and NI represents nonimmune serum from the same animal. (B) Triton X-100 lysates of resting platelets were separated by 4% to 15% SDS-PAGE and immunoblotted with pSGPIIb1, pSer609, or an antibody against the 3 GPIIb-IX subunits. GPIIb α was heavily labeled by pSGPIIb1, suggesting Ser phosphorylation of the 580-590 domain. In accordance with previous reports, labeling with pSer609 showed that GPIIb α was also phosphorylated at Ser609. (C) Triton X-100 lysates of resting platelets were treated or not with 0.3 U/mL PAP for 30 minutes at 37°C. Proteins were separated by 4% to 15% SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and probed with pSer609 and pSGPIIb1. Reactivity to the antibodies was lost in samples treated with PAP, confirming phosphorylation at both sites. (D) The proportion of phosphorylated GPIIb α was estimated by immunodepleting the cell lysates with an excess of the phosphospecific antibody pSGPIIb1 (middle panel) or pSer609 (right panel) and performing a second immunoprecipitation with an anti-GPIIb β antibody. Products of the first and second immunoprecipitations were revealed with a polyclonal anti-GPIIb-IX antibody. In both cases, a similar small proportion of GPIIb-IX was revealed following the second immunoprecipitation, indicating that most GPIIb α subunits were phosphorylated at both sites. The left panel corresponds to a control where the first depletion was performed in the presence of a nonimmune serum, and results are from 1 experiment representative of 4 independent assays. (E) In GST-14-3-3 ζ pull-down experiments, proteins were precipitated from the same lysates as in panel C and probed with an antibody against the GPIIb-IX complex. GST-14-3-3 ζ precipitated GPIIb α in the absence of PAP treatment but not after its dephosphorylation by PAP. A negative control using GST alone is shown in the left lane. Results in panels B-E are from 1 experiment representative of 3.

(detected with fluorescein isothiocyanate [FITC]) and the pan-anti-GPIIb α mAb ALMA.12 (coupled to Cy3). Platelets fixed in a resting discoid state and allowed to adhere to a polylysine surface were predominantly double labeled (yellow), indicating the colocalization of pSGPIIb1 or pSer609 with ALMA.12 (Figure 5A,D). This confirmed that most of the GPIIb α molecules were phosphorylated at the 580-590 and Ser609 sites in the resting state, in agreement with the biochemical data.

In previous studies it has been demonstrated that when platelets adhere to VWF in the presence of α _{IIb} β ₃ inhibitors, they become activated, change shape, and extend filopodia. The cell body of platelets adhering to a VWF matrix under these conditions remained double labeled (yellow). However, all the filopodia appeared in red (Figure 5B,E), indicating a lack of pSGPIIb1 or pSer609 labeling and hence a significant dephosphorylation of Ser587/590 and Ser609. In the absence of integrin blockade, platelets can spread on a VWF surface and such conditions resulted in a mixture of red and yellow labeling over the entire cell surface (Figure 5C,F). These results show that a significant proportion of GPIIb α molecules become dephosphorylated during the processes leading to integrin activation.

Critical role of Ser590 in the 589-590 domain for 14-3-3 ζ binding and integrin activation

To more precisely define the role of the serine residues in the 580-590 region in promoting GPIIb α association with 14-3-3 ζ , Ser587 and Ser590 were substituted to Ala either individually or together and GPIIb α was introduced into CHO cells containing GPIIb β -IX. Coimmunoprecipitation studies demonstrated a decreased 14-3-3 ζ association for all the mutants that was almost completely abolished for the 2 cell lines containing the Ser590Ala substitution (Figure 6A). This defect in 14-3-3 ζ binding was

similar to that observed with the GPIIb α Δ 580-590 deletion, suggesting a major role for Ser590 in 14-3-3 binding with a secondary role contributed by Ser587. In order to then assess the functional importance of the 14-3-3 ζ pool bound to the two 14-3-3 binding

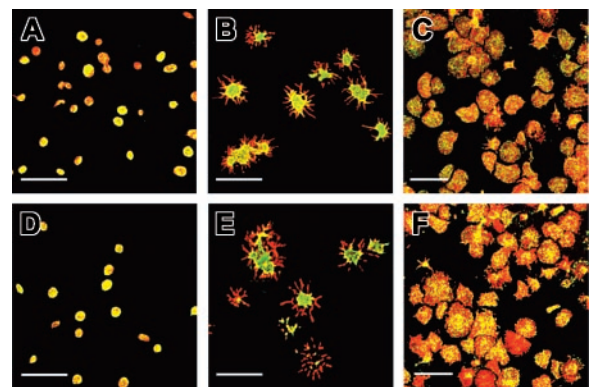


Figure 5. The GPIIb α intracellular domain is dephosphorylated after platelet adhesion and shape change on a VWF matrix. Resting platelets were either fixed and allowed to adhere to a polylysine matrix (A,D), or allowed to adhere to a VWF matrix in the presence (B,E) or absence (C,F) of EDTA by incubation with the matrix for 20 minutes in the presence of botrocetin followed by washing and fixation. GPIIb α was labeled with ALMA.12-Cy3 (red), and phosphorylated GPIIb α was labeled with pSGPIIb1 (A-C) or pSer609 (D-F), which was revealed with a secondary FITC-coupled antibody (green). Samples were analyzed by dual-label confocal microscopy. (A,D) Discoid platelets appeared predominantly yellow after staining with either pSGPIIb1 or pSer609, indicating that GPIIb α was mainly phosphorylated in resting platelets. (B,E) When platelets adhered to a VWF matrix and integrin activation was blocked with EDTA and ReoPro, they extended numerous filopodia. The staining of the cell body remained yellow, whereas the filopodia appeared in red, suggesting a lack of recognition by pSer609 or pSGPIIb1 and dephosphorylation of pSer609 and pSer587/590 within the membrane extensions. (C,F) In the absence of ReoPro and EDTA, platelets spread on the VWF matrix and the labeling appeared as a mixture of yellow and red over the entire cell surface, pointing to the existence of separate pools of phosphorylated and dephosphorylated GPIIb α . Shown is 1 representative experiment of 3 performed. Scale bars indicate 10 μ m.

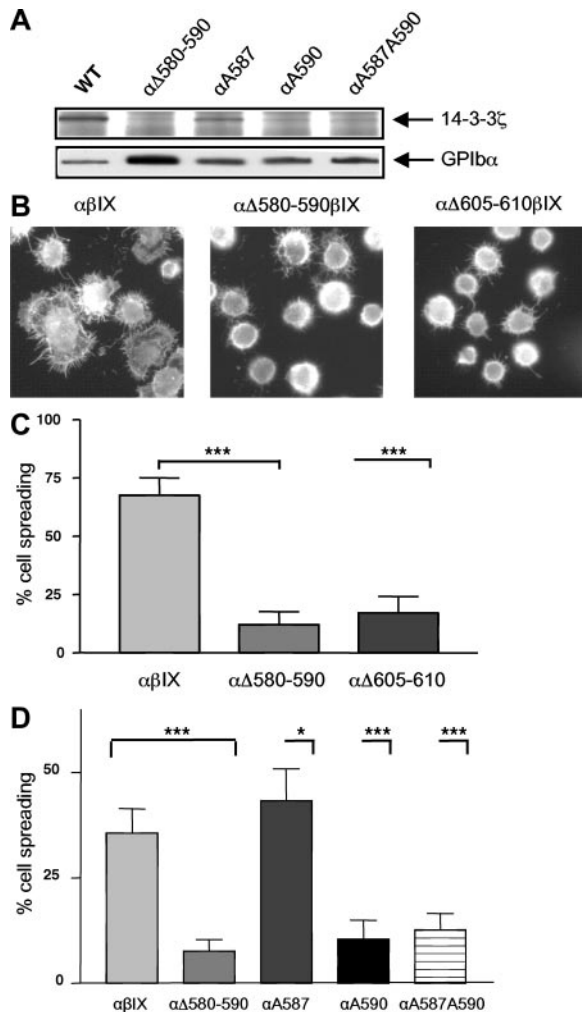


Figure 6. Involvement of serines in the 580-590 domain for 14-3-3 ζ binding and integrin activation. (A) GPIb-IX–14-3-3 ζ association was studied as described in Figure 1 in CHO GPIb-IX cells where Ser587 and Ser590 were individually substituted to Ala (α A587, α A590) or in cells containing a double mutation (α A587/590). A profound decrease in GPIb-IX–14-3-3 ζ association was observed in both cells with a Ser590 to Ala substitution and a milder defect was observed for the single Ala587 mutant. The results are representative of 3 separate experiments. (B-C) GPIb-IX CHO cells expressing wild-type GPIb α (α βIX) or GPIb α with deletions of the 580-590 or 605-610 sequence were allowed to adhere to a VWF matrix in the presence of botrocetin (5 μ g/mL) and left to spread for 30 minutes at 37°C. The cells were then fixed in 4% PFA and the actin cytoskeleton was labeled with TRITC-phalloidin. (B) Compared with α βIX cells, α Δ605-610βIX and α Δ580-590βIX cells adhered equally as efficiently but displayed a marked spreading defect. (C) Spreading cells were scored in 5 random fields and expressed as a percentage of total adherent cells. (***) $P < .001$; Fisher exact test.) Results are the mean (\pm SEM) of 4 separate experiments. (D) Cells containing Ser to Ala substitutions as described in panel A were allowed to adhere and spread as described in panel B. Spreading cells were scored in 5 random fields and expressed as a percentage of total adherent cells. The level of spreading at 30 minutes in control α βIX cells was lower than in experiments presented in panel B due to a new batch of botrocetin with a lower activity. (***) $P < .001$; * $P < .05$ Fisher exact test.) Results are the mean (\pm SEM) of 2 to 3 separate experiments.

sites of GPIb α for integrin activation, GPIb-IX CHO cell lines containing either the deletion mutants (GPIb α Δ605-610 and GPIb α Δ580-590) or the specific alanine mutants (α A587, α A590, and α A587A590) were studied in VWF adhesion assays. Cells expressing wild-type GPIb/IX underwent extensive cell spreading, indicating that intact GPIb/IX is able to mediate efficient integrin activation, observations consistent with previous studies.^{12,13} A comparison with the deletion mutant cells, which had completely lost the ability to support GPIb α –14-3-3 ζ association (Figure 1C), indicated that although these cells were still able to adhere as

efficiently as wild-type control cells (Figure 6B) they were significantly less susceptible to spread on the VWF matrix (Figure 6B-C). This suggested inefficient integrin activation possibly due to an absence of mobilizable 14-3-3 ζ . Similar assays were performed with the alanine mutants that demonstrated a profound and specific decrease in cell spreading for the 2 clones mutated at Ser590, reproducing the defect observed in GPIb α Δ 580-590 cells (Figure 6D). In contrast, the single Ser587Ala substitution did not prevent cell spreading. These observations suggested a central role for Ser590 to induce efficient integrin activation potentially as a result of a mobilizable pool of 14-3-3.

Discussion

The 96-amino acid GPIb α intracellular domain (residues 515-610) was originally described as a bridging sequence between the GPIb-V-IX complex and the platelet actin cytoskeleton via filamin.²³ Deficient association with the cytoskeleton likely contributes to the giant platelet phenotype observed in Bernard-Soulier syndrome.²⁴ It is now becoming apparent that this domain is multifunctional and can assemble additional partners potentially involved in signal transduction.²⁵ GPIb/VWF signaling leads to the mobilization of intracellular Ca²⁺, platelet shape change, and activation of integrin α Ib β ₃.^{12,26} The precise mechanism whereby binding of VWF to GPIb-IX triggers α Ib β ₃-dependent functions such as platelet spreading and aggregation nevertheless remains unclear. Recruitment of the 14-3-3 ζ adaptor protein to the GPIb α 605-610 C-terminal region has been proposed to play a role in integrin activation.^{7,12} The present study provides evidence for the existence of a second 14-3-3 ζ binding site in the upstream 580-590 region and suggests the implication of both the 605-610 and 580-590 domains for functional GPIb α –14-3-3 ζ association and in the control of integrin dependent spreading.

An interaction of 14-3-3 ζ with the GPIb-V-IX complex was initially revealed by their coisolation during affinity chromatography purification of GPIb from platelet lysates.⁶ Subsequent synthetic peptide binding experiments and deletion mutagenesis in GPIb-IX–transfected CHO cells located a binding site for 14-3-3 ζ in the last 6 amino acids of the GPIb α subunit (residues 605-610).^{7,10} A second binding site for 14-3-3 ζ has been assigned to the 557-575 region of the GPIb α subunit, mainly from studies of synthetic peptide binding.¹⁰ More recently, the existence of yet another binding site upstream of the 605-610 domain was suggested from the lack of GPIb α –14-3-3 ζ coprecipitation in cells deleted of the 570-590 region.⁹ In this work, a closer deletion scanning of the 535-610 region revealed defective GPIb–14-3-3 ζ association only for the 580-590 deletion mutant, in addition to the C-terminal truncation. Together, this study and previous work¹⁹ indicate that in fact the 570-590 sequence contains separate functional sites involved in filamin (570-580) and 14-3-3 ζ binding (580-590), respectively.

It was of interest that the 580-590 site contained serines at positions that agreed with a consensus 14-3-3 ζ binding motif.²² The capacity of a phosphorylated 580-590 synthetic peptide to inhibit GPIb α –14-3-3 ζ coimmunoprecipitation provided supporting evidence that the GPIb α 580-590 domain is involved in 14-3-3 ζ binding, and also agreed with the mode of interaction of most 14-3-3 ζ ligands, which require phosphorylation at key Ser or Thr residues for efficient binding.⁴ In a previous study, 2 large peptides (571-589 and 585-603) that partially overlapped the

580-590 sequence failed to bind purified 14-3-3 ζ .¹⁰ This apparent discrepancy could be related to the use of nonphosphorylated peptides, as the nonphosphorylated 580-590 peptide competed less efficiently for 14-3-3 ζ association (Figure 3). It can also be inferred from the present results that the 14-3-3 ζ molecule can accommodate 2 peptide sequences from the GPIb α intracellular domain. This mode of interaction might be necessary to allow for efficient binding of the adaptor protein and for a fine control of its release. There are previous evidences that 14-3-3 ζ can bind more than one peptide in other systems. For example, there was a report on the crystal structure of dimeric 14-3-3 ζ in complex with 2 peptides from the kinase Raf-1,²⁷ and, more recently, 3 separate binding sites were identified for the phosphatase cdc25B peptides.⁵ The C-terminal α -helix of 14-3-3 ζ (helix I)^{12,28} appears to contain the GPIb α binding motifs, but the precise mode of interaction and in particular its capacity to interact with the 580-590 and 605-610 sequences remain to be determined.

Functional relevance of the 580-590 domain and its phosphorylation was indicated in a series of experiments in platelets with the use of an antibody against the diphosphorylated peptide. These studies revealed that the GPIb α 580-590 domain is phosphorylated in resting platelets. Phosphorylation was observed both in platelet lysates by immunoblotting and in intact cells by confocal microscopy analysis. Use of an antibody against the pSer609 sequence confirmed that this domain is likewise phosphorylated in resting platelets. Phosphorylation at both sites appears to be required to support efficient 14-3-3 ζ -GPIb-V-IX association in resting platelets. Firstly, phosphatase treatment of platelet lysates prevented 14-3-3 ζ -GPIb-V-IX association and was accompanied by dephosphorylation of pSer587/590 and pSer609. Studies in GPIb-IX-transfected CHO cells were also consistent with this model and showed that deletion of either binding site prevented association of GPIb α with 14-3-3 ζ . Ala mutagenesis revealed that residues 587 and 590 were both required for correct association.

The occurrence of dephosphorylation of these 14-3-3 ζ binding sites during the process leading to platelet spreading supports their role in a pathway leading to integrin activation. Platelets adhering to a VWF matrix initially extend thin filopodia in a process that has been found to be integrin independent.²⁶ This is followed by platelet spreading, which requires integrin α _{IIb} β ₃ activation. Strikingly, the GPIb α molecules recruited to filopodial extensions were no longer recognized by pSer587/590 or pSer609 phosphospecific antibodies. This points to an early and localized dephosphorylation mechanism that precedes integrin activation and occurs concomitant with cytoskeletal reorganization. Deletion mutant cells lacking 14-3-3 ζ binding are still able to extend filopodia, suggesting that the release of 14-3-3 ζ from GPIb α is not required for this early cytoskeletal reorganization (data not shown). On the other hand, their inefficient spreading suggests a role in the late integrin-dependent shape change. In fully spread platelets, confocal microscopy indicated that a majority of the GPIb α subunits were dephosphorylated at this later integrin-dependent stage. Since phosphatase treatment leads to a decreased GPIb α -14-3-3 ζ interaction, one likely consequence of the pSer587/590 and pSer609 dephosphorylation in platelets adhering to VWF will be the release of GPIb α -associated 14-3-3 ζ . Consistent with this proposal, it has been reported that 14-3-3 ζ was released from the GPIb-V-IX complex in shear activated platelets.⁹ Although it cannot be excluded that the loss of antibody labeling during

shape change could be indirect, due for example to a change in GPIb α conformation or to the binding of other molecules that mask the epitopes, the fact that it was observed concomitantly for distinct GPIb α domains makes this appear less likely.

Deletion of the C-terminal end of GPIb α that contains the 605-610 14-3-3 ζ binding site has led to discordant conclusions concerning the role of this adaptor protein in integrin activation. CHO cells transfected with integrin α _{IIb} β ₃ and GPIb-IX containing the same GPIb α 591-610 deletion were found to undergo defective¹² or on the contrary normal or increased spreading^{13,14} following adhesion to a VWF matrix. These discrepancies are not easily explained but could be due to the use of larger deletions (591-610), which could affect other mechanisms, to the use of cells expressing different levels of integrin or 14-3-3, or to differences in the adhesive assays (adhesive proteins, botrocetin, time-course. . .). In the present study, deletion of the minimal GPIb α 605-610 binding site or the second binding motif in the 580-590 region prevented normal spreading of GPIb-IX-transfected cells on VWF. Furthermore, a single amino acid change of Ser590 to Ala, which has a low probability to alter the protein structure, yielded the same result. Collectively these findings favor a model in which a population of 14-3-3 ζ molecules bound at the resting state to the intracellular face of GPIb-IX through 2 phosphorylated motifs is required for integrin activation following its release from the GPIb-IX complex upon GPIb/VWF interaction.

The concomitant phosphorylation/dephosphorylation of the 580-590 and 605-610 regions of GPIb α in resting versus VWF-activated platelets suggests the possibility of a coordinated control by specific kinases and phosphatases. PKA and protein kinase G (PKG) were recently implicated in the control of platelet activation following GPIb/VWF interaction.^{29,30} However, it has been reported that inhibitors of PKA and PKG have no effect on Ser609 phosphorylation.⁸ The 580-590 sequence and the Ser587 site display good homology with a consensus PKA phosphorylation site (RRXSX).³⁰ However, incorporation of ³²P was not observed in the presence of agents increasing cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels such as forskolin (data not shown), and phosphorylation of GPIb α could be documented only with phosphospecific antibodies. This was surprising in view of the large proportion of phosphorylated GPIb α detected with the phosphospecific antibodies. This could be related to a slow rate of phosphate exchange during the washing procedure, which is designed to avoid platelet activation.¹⁶

In conclusion, the present study describes a new 14-3-3 ζ binding site located in the 580-590 region of GPIb α , which requires Ser phosphorylation in resting platelets. Adhesion of platelets to a VWF matrix led to dephosphorylation of GPIb α pSer587/590 and pSer609. This would seem to be a common regulatory mechanism mediating release of 14-3-3 ζ from the GPIb-IX complex and thereby integrin activation and subsequent cell spreading.

Acknowledgments

We thank Martine Santer, Marie-Jeanne Baas, Sylvie Moog, and Julie Thomas for technical assistance; Sylvette Chasserot for help in confocal microscopy studies; and Juliette N. Mulvihill for reviewing the English of the manuscript.

References

- Aitken A. 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends Cell Biol.* 1996;6:341-347.
- Wheeler-Jones CP, Learmonth MP, Martin H, Aitken A. Identification of 14-3-3 proteins in human platelets: effects of synthetic peptides on protein kinase C activation. *Biochem J.* 1996;315:41-47.
- Liu D, Bienkowska J, Petosa C, Collier RJ, Fu H, Liddington R. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature.* 1995;376:191-194.
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, et al. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell.* 1997;91:961-971.
- Giles N, Forrest A, Gabrielli B. 14-3-3 acts as an intramolecular bridge to regulate cdc25B localization and activity. *J Biol Chem.* 2003;278:28580-28587.
- Du X, Harris SJ, Tetaz TJ, Ginsberg MH, Berndt MC. Association of a phospholipase A2 (14-3-3 protein) with the platelet glycoprotein Ib-IX complex. *J Biol Chem.* 1994;269:18287-18290.
- Du X, Fox JE, Pei S. Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib alpha. *J Biol Chem.* 1996;271:7362-7367.
- Bodnar RJ, Gu M, Li Z, Englund GD, Du X. The cytoplasmic domain of the platelet glycoprotein Ibalpha is phosphorylated at serine 609. *J Biol Chem.* 1999;274:33474-33479.
- Feng S, Christodoulides N, Resendiz JC, Berndt MC, Kroll MH. Cytoplasmic domains of Gplbalpha and Gplbbeta regulate 14-3-3zeta binding to Gplb/IX/V. *Blood.* 2000;95:551-557.
- Andrews RK, Harris SJ, McNally T, Berndt MC. Binding of purified 14-3-3 zeta signaling protein to discrete amino acid sequences within the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Biochemistry.* 1998;37:638-647.
- Calverley DC, Kavanagh TJ, Roth GJ. Human signaling protein 14-3-3zeta interacts with platelet glycoprotein Ib subunits Ibalpha and Ibbeta. *Blood.* 1998;91:1295-1303.
- Gu M, Xi X, Englund GD, Berndt MC, Du X. Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(Ib)beta(3) using a reconstituted mammalian cell expression model. *J Cell Biol.* 1999;147:1085-1096.
- Zaffran Y, Meyer SC, Negrescu E, Reddy KB, Fox JE. Signaling across the platelet adhesion receptor glycoprotein Ib-IX induces alpha Ibbeta 3 activation both in platelets and a transfected Chinese hamster ovary cell system. *J Biol Chem.* 2000;275:16779-16787.
- Bialkowska K, Zaffran Y, Meyer SC, Fox JE. 14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac: platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta. *J Biol Chem.* 2003;278:33342-33350.
- Toti F, Gachet C, Ohlmann P, et al. Electrophoretic studies on molecular defects of von Willebrand factor and platelet glycoprotein IIb-IIIa with antibodies produced in egg yolk from laying hens. *Haemostasis.* 1992;22:32-40.
- Cazenave JP, Hemmendinger S, Beretz A, Sutter-Bay A, Launay J. Platelet aggregation: a tool for clinical investigation and pharmacological study: methodology. *Ann Biol Clin.* 1983;41:167-179.
- Cranmer SL, Ulsemer P, Cooke BM, et al. Glycoprotein (GP) Ib-IX-transfected cells roll on a von Willebrand factor matrix under flow: importance of the GPIb/actin-binding protein (ABP-280) interaction in maintaining adhesion under high shear. *J Biol Chem.* 1999;274:6097-6106.
- Perrault C, Mangin P, Santer M, et al. Role of the intracellular domains of GPIb in controlling the adhesive properties of the platelet GPIb/V/IX complex. *Blood.* 2003;101:3477-3484.
- Williamson D, Pikovski I, Cranmer SL, et al. Interaction between platelet glycoprotein Ibalpha and filamin-1 is essential for glycoprotein Ib/IX receptor anchorage at high shear. *J Biol Chem.* 2002;277:2151-2159.
- Perrault C, Moog S, Rubinstein E, et al. A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIbbeta modulates vWF mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost.* 2001;86:1238-1248.
- Craparo A, Freund R, Gustafson TA. 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. *J Biol Chem.* 1997;272:11663-11669.
- Liu YC, Liu Y, Elly C, Yoshida H, Lipkowitz S, Altman A. Serine phosphorylation of Cbl induced by phorbol ester enhances its association with 14-3-3 proteins in T cells via a novel serine-rich 14-3-3-binding motif. *J Biol Chem.* 1997;272:9979-9985.
- Andrews RK, Fox JE. Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex that binds to purified actin-binding protein. *J Biol Chem.* 1992;267:18605-18611.
- Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. *Blood.* 1998;91:4397-4418.
- Berndt MC, Shen Y, Doppeide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost.* 2001;86:178-188.
- Yuan Y, Kulkarni S, Ulsemer P, et al. The von Willebrand factor-glycoprotein Ib/V/IX interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells. *J Biol Chem.* 1999;274:36241-36251.
- Petosa C, Masters SC, Bankston LA, et al. 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J Biol Chem.* 1998;273:16305-16310.
- Gu M, Du X. A novel ligand-binding site in the zeta-form 14-3-3 protein recognizing the platelet glycoprotein Ibalpha and distinct from the c-Raf-binding site. *J Biol Chem.* 1998;273:33465-33471.
- Li Z, Xi X, Gu M, et al. A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Cell.* 2003;112:77-86.
- Li Z, Ajdic J, Eigenthaler M, Du X. A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. *Blood.* 2003;101:4423-4429.

Annexe 2: Publication n°5

“Synthesis of GPIIb β with novel transmembrane and cytoplasmic sequences in a Bernard-Soulier patient resulting in GPIIb-defective signalling in CHO cells”

C. Strassel, T. David, A. Eckly, M-J Baas, S. Moog, C. Ravanat, MC. Trzeciak, C. Vinciguerra, JP. Cazenave, C. Gachet and F.Lanza

JTH, 2006, 4 :217-228

Le syndrome hémorragique de Bernard-Soulier est provoqué par l'absence ou l'anomalie d'une des sous-unités du complexe GPIIb-V-IX. Ce syndrome se caractérise par un temps de saignement allongé lié à un défaut d'adhésion des plaquettes, ainsi que par une thrombopénie et la présence de plaquettes de grande taille. L'étude de différentes mutations a permis de préciser le rôle des différentes sous-unités pour les fonctions du complexe et notamment l'importance des sous-unités GPIIb α , GPIIb β et GPIIX pour l'expression efficace du récepteur et, dans le cas des variants, de préciser le rôle fonctionnel de la partie LR de la GPIIb α (**de la Salle et al. 1995b; Lopez et al. 1998**).

Une nouvelle mutation a été identifiée chez un patient Bernard-Soulier, suggérant de nouvelles fonctions de la sous-unité GPIIb β . Une insertion d'une guanine dans la région codant pour le domaine transmembranaire de la GPIIb β , entraîne la production d'une sous-unité formée d'une nouvelle région transmembranaire et d'une partie intracellulaire contenant 103 nouveaux acides aminés en place des 34 résidus de la séquence normale. Des analyses biochimiques (immunoempreinte et immunoprécipitations) à partir de lysats de plaquettes du patient et de cellules CHO GPIIb-IX reproduisant cette mutation, montrent la synthèse d'une sous-unité GPIIb β anormale de ~35-38 kDa. L'association de la GPIIb β à la sous-unité GPIIb α est perturbée, suggérant que l'intégrité du domaine transmembranaire et intracellulaire de la GPIIb β est requise pour la bonne expression du complexe GPIIb-V-IX. L'étude fonctionnelle des cellules CHO contenant la forme mutée et des plaquettes du patient montre que cette mutation n'empêche pas l'adhésion au FW mais s'accompagne d'une absence de changement de forme. Ces résultats appuient l'hypothèse d'un rôle suspecté de la GPIIb β et de son domaine intracellulaire dans la signalisation.

En conclusion, l'étude de cette mutation conforte les travaux précédents indiquant un rôle central de la GPIIb β pour l'expression efficace du complexe. Ces travaux apportent également des arguments pour un rôle du domaine intracellulaire de la GPIIb β dans la signalisation déclenchée par le complexe GPIIb-V-IX.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SICD – Service des thèses électroniques]

Synthesis of GPIIb β with novel transmembrane and cytoplasmic sequences in a Bernard–Soulier patient resulting in GPIIb-defective signaling in CHO cells

C. STRASSEL, T. DAVID, A. ECKLY, M- J BAAS, S. MOOG, C. RAVANAT, M-C TRZECIAK, C. VINCIGUERRA, J -P CAZENAVE, C. GACHET et F. LANZA

Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2006, Vol. 4, Pages 217–228

Pages 217 à 228 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1538-7836.2005.01654.x>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam, F., T. J. Verbeuren, J. L. Fauchere, M. C. Guillin et M. Jandrot-Perrus. "Thrombin-induced platelet PAR4 activation: role of glycoprotein Ib and ADP." *J Thromb Haemost* (2003) 1(4): 798-804.
- Aitken, A. "14-3-3 proteins: a historic overview." *Semin Cancer Biol* (2006) 16(3): 162-72.
- Aleil, B., J. M. Mossard, M. L. Wiesel, F. Lanza et J. P. Cazenave. "Increased plasma levels of soluble platelet glycoprotein V in patients with acute myocardial infarction." *J Thromb Haemost* (2003) 1(8): 1846-7.
- Allain, J. P., H. A. Cooper, R. H. Wagner et K. M. Brinkhous. "Platelets fixed with paraformaldehyde: a new reagent for assay of von Willebrand factor and platelet aggregating factor." *J Lab Clin Med* (1975) 85(2): 318-28.
- Altieri, D. C., A. M. Capitanio et P. M. Mannucci. "von Willebrand factor contaminating porcine factor VIII concentrate (Hyate:C) causes platelet aggregation." *Br J Haematol* (1986) 63(4): 703-11.
- Amann, K. J. et T. D. Pollard. "Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98(26): 15009-13.
- Anderson, C. L., G. W. Chacko, J. M. Osborne et J. T. Brandt. "The Fc receptor for immunoglobulin G (Fc gamma RII) on human platelets." *Semin Thromb Hemost* (1995) 21(1): 1-9.
- Andrews, R. K. et J. E. Fox. "Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex that binds to purified actin-binding protein." *J Biol Chem* (1992) 267(26): 18605-11.
- Andrews, R. K., J. J. Gorman, W. J. Booth, G. L. Corino, P. A. Castaldi et M. C. Berndt. "Cross-linking of a monomeric 39/34-kDa dispaase fragment of von Willebrand factor (Leu-480/Val-481-Gly-718) to the N-terminal region of the alpha-chain of membrane glycoprotein Ib on intact platelets with bis(sulfosuccinimidyl) suberate." *Biochemistry* (1989) 28(21): 8326-36.
- Andrews, R. K., S. J. Harris, T. McNally et M. C. Berndt. "Binding of purified 14-3-3 zeta signaling protein to discrete amino acid sequences within the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex." *Biochemistry* (1998) 37(2): 638-47.
- Andrews, R. K., A. D. Munday, C. A. Mitchell et M. C. Berndt. "Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex." *Blood* (2001) 98(3): 681-7.
- Andrews, R. K., Y. Shen, E. E. Gardiner, J. F. Dong, J. A. Lopez et M. C. Berndt. "The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling." *Thromb Haemost* (1999) 82(2): 357-64.
- Arthur, J. F., E. E. Gardiner, M. Matzaris, S. G. Taylor, L. Wijeyewickrema, Y. Ozaki, M. L. Kahn, R. K. Andrews et M. C. Berndt. "Glycoprotein VI is associated with GPIb-IX-V on the membrane of resting and activated platelets." *Thromb Haemost* (2005) 93(4): 716-23.
- Asazuma, N., Y. Ozaki, K. Satoh, Y. Yatomi, M. Handa, Y. Fujimura, S. Miura et S. Kume. "Glycoprotein Ib-von Willebrand factor interactions activate tyrosine kinases in human platelets." *Blood* (1997) 90(12): 4789-98.
- Asselin, J., J. M. Gibbins, M. Achison, Y. H. Lee, L. F. Morton, R. W. Farndale, M. J. Barnes et S. P. Watson. "A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1." *Blood* (1997) 89(4): 1235-42.

- Atkinson, B. T., W. Ellmeier et S. P. Watson. "Tec regulates platelet activation by GPVI in the absence of Btk." *Blood* (2003) 102(10): 3592-9.
- Auger, J. M., D. Best, D. C. Snell, J. I. Wilde et S. P. Watson. "c-Cbl negatively regulates platelet activation by glycoprotein VI." *J Thromb Haemost* (2003) 1(11): 2419-26.
- Azim, A. C., K. Barkalow, J. Chou et J. H. Hartwig. "Activation of the small GTPases, rac and cdc42, after ligation of the platelet PAR-1 receptor." *Blood* (2000) 95(3): 959-64.
- Azzam, K., M. Cisse-Thiam et L. Drouet. "The antithrombotic effect of aurin tricarboxylic acid in the guinea pig is not solely due to its interaction with the von Willebrand factor-GPIb axis." *Thromb Haemost* (1996) 75(1): 203-10.
- Bachmann, C., L. Fischer, U. Walter et M. Reinhard. "The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation." *J Biol Chem* (1999) 274(33): 23549-57.
- Barkalow, K., W. Witke, D. J. Kwiatkowski et J. H. Hartwig. "Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by gelsolin and capping protein." *J Cell Biol* (1996) 134(2): 389-99.
- Baumgartner, H. R., R. Muggli, T. B. Tschopp et V. T. Turitto. "Platelet adhesion, release and aggregation in flowing blood: effects of surface properties and platelet function." *Thromb Haemost* (1976) 35(1): 124-38.
- Baurand, A., A. Eckly, N. Bari, C. Leon, B. Hechler, J. P. Cazenave et C. Gachet. "Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors." *Thromb Haemost* (2000) 84(3): 484-91.
- Baurand, A., A. Eckly, B. Hechler, G. Kauffenstein, J. L. Galzi, J. P. Cazenave, C. Leon et C. Gachet. "Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties?" *Mol Pharmacol* (2005) 67(3): 721-33.
- Beglova, N., S. C. Blacklow, J. Takagi et T. A. Springer. "Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation." *Nat Struct Biol* (2002) 9(4): 282-7.
- Berg, J. S. et R. E. Cheney. "Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility." *Nat Cell Biol* (2002) 4(3): 246-50.
- Berman, D. M. et A. G. Gilman. "Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate." *J Biol Chem* (1998) 273(3): 1269-72.
- Berndt, M. C., Y. Shen, S. M. Dopheide, E. E. Gardiner et R. K. Andrews. "The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex." *Thromb Haemost* (2001) 86(1): 178-88.
- Berndt, M. C., C. M. Ward, W. J. Booth, P. A. Castaldi, A. V. Mazurov et R. K. Andrews. "Identification of aspartic acid 514 through glutamic acid 542 as a glycoprotein Ib-IX complex receptor recognition sequence in von Willebrand factor. Mechanism of modulation of von Willebrand factor by ristocetin and botrocetin." *Biochemistry* (1992) 31(45): 11144-51.
- Bertoni, A., S. Tadokoro, K. Eto, N. Pampori, L. V. Parise, G. C. White et S. J. Shattil. "Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin alpha IIb beta 3, and the actin cytoskeleton." *J Biol Chem* (2002) 277(28): 25715-21.
- Bialkowska, K., Y. Zaffran, S. C. Meyer et J. E. Fox. "14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta." *J Biol Chem* (2003) 278(35): 33342-50.
- Bodnar, R. J., M. Gu, Z. Li, G. D. Englund et X. Du. "The cytoplasmic domain of the platelet glycoprotein Ibalpha is phosphorylated at serine 609." *J Biol Chem* (1999) 274(47): 33474-9.

- Bodnar, R. J., X. Xi, Z. Li, M. C. Berndt et X. Du. "Regulation of glycoprotein Ib-IX-von Willebrand factor interaction by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation at Ser 166 of glycoprotein Ib(beta)." *J Biol Chem* (2002) 277(49): 47080-7.
- Boneu, B. et J. P. Cazenave. "Introduction à l'étude de l'Hémostase et de la Thrombose. 2ème édition." Alinéa. (1997).
- Bonnefoy, A., J. Vermylen et M. F. Hoylaerts. "Inhibition of von Willebrand factor-GPIb/IX/V interactions as a strategy to prevent arterial thrombosis." *Expert Rev Cardiovasc Ther* (2003) 1(2): 257-69.
- Bradford, H. N., R. A. Dela Cadena, S. P. Kunapuli, J. F. Dong, J. A. Lopez et R. W. Colman. "Human kininogens regulate thrombin binding to platelets through the glycoprotein Ib-IX-V complex." *Blood* (1997) 90(4): 1508-15.
- Bradford, H. N., R. A. Pixley et R. W. Colman. "Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation." *J Biol Chem* (2000) 275(30): 22756-63.
- Briddon, S. J. et S. P. Watson. "Evidence for the involvement of p59fyn and p53/56lyn in collagen receptor signalling in human platelets." *Biochem J* (1999) 338 (Pt 1): 203-9.
- Buckley, C. D., R. Doyonnas, J. P. Newton, S. D. Blystone, E. J. Brown, S. M. Watt et D. L. Simmons. "Identification of alpha v beta 3 as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1." *J Cell Sci* (1996) 109 (Pt 2): 437-45.
- Calderwood, D. A., S. J. Shattil et M. H. Ginsberg. "Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling." *J Biol Chem* (2000) 275(30): 22607-10.
- Calderwood, D. A., R. Zent, R. Grant, D. J. Rees, R. O. Hynes et M. H. Ginsberg. "The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation." *J Biol Chem* (1999) 274(40): 28071-4.
- Calverley, D. C., T. J. Kavanagh et G. J. Roth. "Human signaling protein 14-3-3zeta interacts with platelet glycoprotein Ib subunits Ibalpha and Ibbeta." *Blood* (1998) 91(4): 1295-303.
- Canobbio, I., A. Bertoni, P. Lova, S. Paganini, E. Hirsch, F. Sinigaglia, C. Balduini et M. Torti. "Platelet activation by von Willebrand factor requires coordinated signaling through thromboxane A2 and Fc gamma IIA receptor." *J Biol Chem* (2001) 276(28): 26022-9.
- Cauwenberghs, N., M. Meiring, S. Vauterin, V. van Wyk, S. Lamprecht, J. P. Roodt, L. Novak, J. Harsfalvi, H. Deckmyn et H. F. Kotze. "Antithrombotic effect of platelet glycoprotein Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2000) 20(5): 1347-53.
- Cavallini, L., M. Coassin, A. Borean et A. Alexandre. "Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation." *J Biol Chem* (1996) 271(10): 5545-51.
- Cazenave, J. P., M. A. Packham, M. A. Guccione et J. F. Mustard. "Inhibition of platelet adherence to damaged surface of rabbit aorta." *J Lab Clin Med* (1975) 86(4): 551-63.
- Celikel, R., R. A. McClintock, J. R. Roberts, G. L. Mendolicchio, J. Ware, K. I. Varughese et Z. M. Ruggeri. "Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha." *Science* (2003) 301(5630): 218-21.
- Chang, J. C., H. H. Chang, C. T. Lin et S. J. Lo. "The integrin alpha6beta1 modulation of PI3K and Cdc42 activities induces dynamic filopodium formation in human platelets." *J Biomed Sci* (2005) 12(6): 881-98.
- Chang, M. C., H. K. Lin, H. C. Peng et T. F. Huang. "Antithrombotic effect of crotalin, a platelet membrane glycoprotein Ib antagonist from venom of *Crotalus atrox*." *Blood* (1998) 91(5): 1582-9.

- Chen, M. et A. Stracher. "In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain." *J Biol Chem* (1989) 264(24): 14282-9.
- Chin, D. et A. R. Means. "Calmodulin: a prototypical calcium sensor." *Trends Cell Biol* (2000) 10(8): 322-8.
- Cicmil, M., J. M. Thomas, M. Leduc, C. Bon et J. M. Gibbins. "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets." *Blood* (2002) 99(1): 137-44.
- Cicmil, M., J. M. Thomas, T. Sage, F. A. Barry, M. Leduc, C. Bon et J. M. Gibbins. "Collagen, convulxin, and thrombin stimulate aggregation-independent tyrosine phosphorylation of CD31 in platelets. Evidence for the involvement of Src family kinases." *J Biol Chem* (2000) 275(35): 27339-47.
- Clemetson, K. J. "Platelet membrane glycoprotein I: structure and function. The domain of glycoprotein I involved in the von Willebrand receptor." *Blood Cells* (1983) 9(2): 319-29.
- Clemetson, K. J. et J. M. Clemetson. "Platelet collagen receptors." *Thromb Haemost* (2001) 86(1): 189-97.
- Colgan, J., M. Asmal, M. Neagu, B. Yu, J. Schneidkraut, Y. Lee, E. Sokolskaja, A. Andreotti et J. Luban. "Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk." *Immunity* (2004) 21(2): 189-201.
- Cordeaux, Y. et S. J. Hill. "Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors." *Neurosignals* (2002) 11(1): 45-57.
- Coughlin, S. R. "Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology." *J Thromb Haemost* (2005) 3(8): 1800-14.
- Covic, L., M. Misra, J. Badar, C. Singh et A. Kuliopulos. "Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation." *Nat Med* (2002) 8(10): 1161-5.
- Cranmer, S. L., I. Pikovski, P. Mangin, P. E. Thompson, T. Domagala, M. Frazzetto, H. H. Salem et S. P. Jackson. "Identification of a unique filamin A binding region within the cytoplasmic domain of glycoprotein Ibalpha." *Biochem J* (2005) 387(Pt 3): 849-58.
- Cranmer, S. L., P. Ulsemer, B. M. Cooke, H. H. Salem, C. de la Salle, F. Lanza et S. P. Jackson. "Glycoprotein (GP) Ib-IX-transfected cells roll on a von Willebrand factor matrix under flow. Importance of the GPIb/actin-binding protein (ABP-280) interaction in maintaining adhesion under high shear." *J Biol Chem* (1999) 274(10): 6097-106.
- Cunningham, J. G., S. C. Meyer et J. E. Fox. "The cytoplasmic domain of the alpha-subunit of glycoprotein (GP) Ib mediates attachment of the entire GP Ib-IX complex to the cytoskeleton and regulates von Willebrand factor-induced changes in cell morphology." *J Biol Chem* (1996) 271(19): 11581-7.
- Dai, K., R. Bodnar, M. C. Berndt et X. Du. "A critical role for 14-3-3zeta protein in regulating the VWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications." *Blood* (2005) 106(6): 1975-81.
- Dandona, P., K. Thusu, U. Khurana, J. Love, A. Aljada et S. Mousa. "Calcium, calmodulin and protein kinase C dependence of platelet shape change." *Thromb Res* (1996) 81(2): 163-75.
- Daniel, J. L., I. R. Molish, M. Rigmaiden et G. Stewart. "Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response." *J Biol Chem* (1984) 259(15): 9826-31.
- de la Salle, C., M. J. Baas, F. Lanza, A. Schwartz, D. Hanau, J. Chevalier, C. Gachet, M. E. Briquel et J. P. Cazenave. "A three-base deletion removing a leucine residue in a

- leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib alpha associated with a variant of Bernard-Soulier syndrome (Nancy I)." *Br J Haematol* (1995a) 89(2): 386-96.
- de la Salle, C., F. Lanza et J. P. Cazenave. "Biochemical and molecular basis of Bernard-Soulier syndrome: a review." *Nouv Rev Fr Hematol* (1995b) 37(4): 215-22.
- De Luca, M., D. A. Facey, E. J. Favaloro, M. S. Hertzberg, J. C. Whisstock, T. McNally, R. K. Andrews et M. C. Berndt. "Structure and function of the von Willebrand factor A1 domain: analysis with monoclonal antibodies reveals distinct binding sites involved in recognition of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and ristocetin-dependent activation." *Blood* (2000) 95(1): 164-72.
- De Marco, L., M. Mazzucato, F. Fabris, D. De Roia, P. Coser, A. Girolami, V. Vicente et Z. M. Ruggeri. "Variant Bernard-Soulier syndrome type bolzano. A congenital bleeding disorder due to a structural and functional abnormality of the platelet glycoprotein Ib-IX complex." *J Clin Invest* (1990) 86(1): 25-31.
- De Marco, L., M. Mazzucato, M. Grazia Del Ben, U. Budde, A. B. Federici, A. Girolami et Z. M. Ruggeri. "Type IIB von Willebrand factor with normal sialic acid content induces platelet aggregation in the absence of ristocetin. Role of platelet activation, fibrinogen, and two distinct membrane receptors." *J Clin Invest* (1987) 80(2): 475-82.
- Deckmyn, H., N. Cauwenberghs, D. Wu, H. Depraetere et K. Vanhoorelbeke. "Development of antibodies that interfere with the collagen-VWF-GPIb axis as new antithrombotics." *Verh K Acad Geneesk Belg* (2005) 67(1): 55-65.
- Denis, C., N. Methia, P. S. Frenette, H. Rayburn, M. Ullman-Cullere, R. O. Hynes et D. D. Wagner. "A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95(16): 9524-9.
- Deveaux, S., A. Filipe, V. Lemarchandel, J. Ghysdael, P. H. Romeo et V. Mignotte. "Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the coregulation of megakaryocyte-specific genes." *Blood* (1996) 87(11): 4678-85.
- Di Nardo, A., G. Cicchetti, H. Falet, J. H. Hartwig, T. P. Stossel et D. J. Kwiatkowski. "Arp2/3 complex-deficient mouse fibroblasts are viable and have normal leading-edge actin structure and function." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(45): 16263-8.
- Dong, J., A. J. Schade, G. M. Romo, R. K. Andrews, S. Gao, L. V. McIntire et J. A. Lopez. "Novel gain-of-function mutations of platelet glycoprotein IBalpha by valine mutagenesis in the Cys209-Cys248 disulfide loop. Functional analysis under static and dynamic conditions." *J Biol Chem* (2000) 275(36): 27663-70.
- Dong, J. F., S. Gao et J. A. Lopez. "Synthesis, assembly, and intracellular transport of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex." *J Biol Chem* (1998) 273(47): 31449-54.
- Dong, J. F., W. Hyun et J. A. Lopez. "Aggregation of mammalian cells expressing the platelet glycoprotein (GP) Ib-IX complex and the requirement for tyrosine sulfation of GP Ib alpha." *Blood* (1995) 86(11): 4175-83.
- Dong, J. F., C. Q. Li, G. Sae-Tung, W. Hyun, V. Afshar-Kharghan et J. A. Lopez. "The cytoplasmic domain of glycoprotein (GP) IBalpha constrains the lateral diffusion of the GP Ib-IX complex and modulates von Willebrand factor binding." *Biochemistry* (1997) 36(41): 12421-7.
- Du, X., J. E. Fox et S. Pei. "Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib alpha." *J Biol Chem* (1996) 271(13): 7362-7.
- Dubois, C., B. Steiner et S. C. Meyer Reigner. "Contribution of PAR-1, PAR-4 and GPIbalpha in intracellular signaling leading to the cleavage of the beta3 cytoplasmic domain during thrombin-induced platelet aggregation." *Thromb Haemost* (2004) 91(4): 733-42.

- Dumas, J. J., R. Kumar, T. McDonagh, F. Sullivan, M. L. Stahl, W. S. Somers et L. Mosyak. "Crystal structure of the wild-type von Willebrand factor A1-glycoprotein Ibalpha complex reveals conformation differences with a complex bearing von Willebrand disease mutations." *J Biol Chem* (2004) 279(22): 23327-34.
- Dumas, J. J., R. Kumar, J. Seehra, W. S. Somers et L. Mosyak. "Crystal structure of the GpIbalpha-thrombin complex essential for platelet aggregation." *Science* (2003) 301(5630): 222-6.
- Dyson, J. M., A. D. Munday, A. M. Kong, R. D. Huysmans, M. Matzaris, M. J. Layton, H. H. Nandurkar, M. C. Berndt et C. A. Mitchell. "SHIP-2 forms a tetrameric complex with filamin, actin, and GPIb-IX-V: localization of SHIP-2 to the activated platelet actin cytoskeleton." *Blood* (2003) 102(3): 940-8.
- Dyson, J. M., C. J. O'Malley, J. Becanovic, A. D. Munday, M. C. Berndt, I. D. Coghill, H. H. Nandurkar, L. M. Ooms et C. A. Mitchell. "The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP-2, binds filamin and regulates submembraneous actin." *J Cell Biol* (2001) 155(6): 1065-79.
- Edmead, C. E., D. A. Crosby, M. Southcott et A. W. Poole. "Thrombin-induced association of SHP-2 with multiple tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets." *FEBS Lett* (1999) 459(1): 27-32.
- Eigenthaler, M., L. Hofferer, S. J. Shattil et M. H. Ginsberg. "A conserved sequence motif in the integrin beta3 cytoplasmic domain is required for its specific interaction with beta3-endonexin." *J Biol Chem* (1997) 272(12): 7693-8.
- Emsley, J., M. Cruz, R. Handin et R. Liddington. "Crystal structure of the von Willebrand Factor A1 domain and implications for the binding of platelet glycoprotein Ib." *J Biol Chem* (1998) 273(17): 10396-401.
- Emsley, J., S. L. King, J. M. Bergelson et R. C. Liddington. "Crystal structure of the I domain from integrin alpha2beta1." *J Biol Chem* (1997) 272(45): 28512-7.
- Englund, G. D., R. J. Bodnar, Z. Li, Z. M. Ruggeri et X. Du. "Regulation of von Willebrand factor binding to the platelet glycoprotein Ib-IX by a membrane skeleton-dependent inside-out signal." *J Biol Chem* (2001) 276(20): 16952-9.
- Ezumi, Y., K. Kodama, T. Uchiyama et H. Takayama. "Constitutive and functional association of the platelet collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma-chain complex with membrane rafts." *Blood* (2002) 99(9): 3250-5.
- Ezumi, Y., K. Shindoh, M. Tsuji et H. Takayama. "Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets." *J Exp Med* (1998) 188(2): 267-76.
- Faix, J. et K. Rottner. "The making of filopodia." *Curr Opin Cell Biol* (2006) 18(1): 18-25.
- Falati, S., C. E. Edmead et A. W. Poole. "Glycoprotein Ib-V-IX, a receptor for von Willebrand factor, couples physically and functionally to the Fc receptor gamma-chain, Fyn, and Lyn to activate human platelets." *Blood* (1999) 94(5): 1648-56.
- Falet, H., K. M. Hoffmeister, R. Neujahr et J. H. Hartwig. "Normal Arp2/3 complex activation in platelets lacking WASp." *Blood* (2002a) 100(6): 2113-22.
- Falet, H., K. M. Hoffmeister, R. Neujahr, J. E. Italiano, Jr., T. P. Stossel, F. S. Southwick et J. H. Hartwig. "Importance of free actin filament barbed ends for Arp2/3 complex function in platelets and fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002b) 99(26): 16782-7.
- Feng, S., N. Christodoulides, J. C. Resendiz, M. C. Berndt et M. H. Kroll. "Cytoplasmic domains of GpIbalpha and GpIbbeta regulate 14-3-3zeta binding to GpIb/IX/V." *Blood* (2000) 95(2): 551-7.

- Feng, S., J. C. Resendiz, N. Christodoulides, X. Lu, D. Arboleda, M. C. Berndt et M. H. Kroll. "Pathological shear stress stimulates the tyrosine phosphorylation of alpha-actinin associated with the glycoprotein Ib-IX complex." *Biochemistry* (2002) 41(4): 1100-8.
- Feng, S., J. C. Resendiz, X. Lu et M. H. Kroll. "Filamin A binding to the cytoplasmic tail of glycoprotein Iba α regulates von Willebrand factor-induced platelet activation." *Blood* (2003) 102(6): 2122-9.
- Fernandes, J. B., U. P. Naik, M. S. Markell et E. Kornecki. "Comparative investigation of the effects of the immunosuppressants cyclosporine A, cyclosporine G, and FK-506 on platelet activation." *Cell Mol Biol Res* (1993) 39(3): 265-74.
- Fox, J. E. "Shedding of adhesion receptors from the surface of activated platelets." *Blood Coagul Fibrinolysis* (1994) 5(2): 291-304.
- Fox, J. E. "Cytoskeletal proteins and platelet signaling." *Thromb Haemost* (2001) 86(1): 198-213.
- Fox, S. C., H. M. Judge, B. R. Allen et S. Heptinstall. "Platelet aggregation and intracellular calcium mobilisation responses are enhanced by cyclosporin A but not by pimecrolimus (SDZ ASM 981)." *Platelets* (2002) 13(4): 213-8.
- Francesconi, M., A. Casonato, E. Pontara, L. Dalla Via, A. Girolami et R. Deana. "Type IIB von Willebrand factor induces phospholipase A2 activation and cytosolic Ca $^{2+}$ increase in platelets." *Biochem Biophys Res Commun* (1995) 214(1): 102-9.
- Francesconi, M. A., R. Deana, A. Girolami, E. Pontara et A. Casonato. "Platelet aggregation induced by plasma from type IIB von Willebrand's disease patients is associated with an increase in cytosolic Ca $^{2+}$ concentration." *Thromb Haemost* (1993) 70(4): 697-701.
- Freson, K., R. De Vos, C. Wittevrongel, C. Thys, J. Defoor, L. Vanhees, J. Vermylen, K. Peerlinck et C. Van Geet. "The TUBB1 Q43P functional polymorphism reduces the risk of cardiovascular disease in men by modulating platelet function and structure." *Blood* (2005) 106(7): 2356-62.
- Frischknecht, F. et M. Way. "Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization." *Trends Cell Biol* (2001) 11(1): 30-38.
- Fruman, D. A., C. B. Klee, B. E. Bierer et S. J. Burakoff. "Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992) 89(9): 3686-90.
- Galbusera, M., M. Noris et G. Remuzzi. "Thrombotic thrombocytopenic purpura--then and now." *Semin Thromb Hemost* (2006) 32(2): 81-9.
- Gao, J., K. E. Zoller, M. H. Ginsberg, J. S. Brugge et S. J. Shattil. "Regulation of the pp72syk protein tyrosine kinase by platelet integrin alpha IIb beta 3." *Embo J* (1997) 16(21): 6414-25.
- Garcia, A., T. M. Quinton, R. T. Dorsam et S. P. Kunapuli. "Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A2 generation are essential for VWF/GPIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets." *Blood* (2005) 106(10): 3410-4.
- Giancotti, F. G. et E. Ruoslahti. "Integrin signaling." *Science* (1999) 285(5430): 1028-32.
- Girma, J. P., Y. Takahashi, A. Yoshioka, J. Diaz et D. Meyer. "Ristocetin and botrocetin involve two distinct domains of von Willebrand factor for binding to platelet membrane glycoprotein Ib." *Thromb Haemost* (1990) 64(2): 326-32.
- Goncalves, I., S. C. Hughan, S. M. Schoenwaelder, C. L. Yap, Y. Yuan et S. P. Jackson. "Integrin alpha IIb beta 3-dependent calcium signals regulate platelet-fibrinogen interactions under flow. Involvement of phospholipase C gamma 2." *J Biol Chem* (2003) 278(37): 34812-22.

- Gorlin, J. B., R. Yamin, S. Egan, M. Stewart, T. P. Stossel, D. J. Kwiatkowski et J. H. Hartwig. "Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring." *J Cell Biol* (1990) 111(3): 1089-105.
- Goto, S., Y. Ikeda, E. Saldivar et Z. M. Ruggeri. "Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions." *J Clin Invest* (1998) 101(2): 479-86.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen et M. L. Dustin. "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." *Science* (1999) 285(5425): 221-7.
- Gross, B. S., J. I. Wilde, L. Quek, H. Chapel, D. L. Nelson et S. P. Watson. "Regulation and function of WASp in platelets by the collagen receptor, glycoprotein VI." *Blood* (1999) 94(12): 4166-76.
- Gu, M. et X. Du. "A novel ligand-binding site in the zeta-form 14-3-3 protein recognizing the platelet glycoprotein Ibalpha and distinct from the c-Raf-binding site." *J Biol Chem* (1998) 273(50): 33465-71.
- Gu, M., X. Xi, G. D. Englund, M. C. Berndt et X. Du. "Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3) using a reconstituted mammalian cell expression model." *J Cell Biol* (1999) 147(5): 1085-96.
- Haimovich, B., N. Kaneshiki et P. Ji. "Protein kinase C regulates tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets adherent to fibrinogen." *Blood* (1996) 87(1): 152-61.
- Haimovich, B., L. Lipfert, J. S. Brugge et S. J. Shattil. "Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal reorganization in platelets are triggered by interaction of integrin receptors with their immobilized ligands." *J Biol Chem* (1993) 268(21): 15868-77.
- Hannigan, G. E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M. G. Coppolino, G. Radeva, J. Filmus, J. C. Bell et S. Dedhar. "Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase." *Nature* (1996) 379(6560): 91-6.
- Hartwig, J. H. "The platelet: form and function." *Semin Hematol* (2006) 43(1 Suppl 1): S94-100.
- Hartwig, J. H., G. M. Bokoch, C. L. Carpenter, P. A. Janmey, L. A. Taylor, A. Toker et T. P. Stossel. "Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets." *Cell* (1995) 82(4): 643-53.
- Haslam, R. J., N. T. Dickinson et E. K. Jang. "Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets." *Thromb Haemost* (1999) 82(2): 412-23.
- Hato, T., N. Pampori et S. J. Shattil. "Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alphaIIb beta3." *J Cell Biol* (1998) 141(7): 1685-95.
- Hauser, W., K. P. Knobloch, M. Eigenthaler, S. Gambaryan, V. Krenn, J. Geiger, M. Glazova, E. Rohde, I. Horak, U. Walter et M. Zimmer. "Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96(14): 8120-5.
- He, H. T., A. Lellouch et D. Marguet. "Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling." *Semin Immunol* (2005) 17(1): 23-33.
- Hechler, B., M. Cattaneo et C. Gachet. "The P2 receptors in platelet function." *Semin Thromb Hemost* (2005) 31(2): 150-61.
- Hechler, B., N. Lenain, P. Marchese, C. Vial, V. Heim, M. Freund, J. P. Cazenave, M. Cattaneo, Z. M. Ruggeri, R. Evans et C. Gachet. "A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo." *J Exp Med* (2003) 198(4): 661-7.

- Hettasch, J. M. et J. R. Sellers. "Caldesmon phosphorylation in intact human platelets by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C." *J Biol Chem* (1991) 266(18): 11876-81.
- Hickey, M. J., S. A. Williams et G. J. Roth. "Human platelet glycoprotein IX: an adhesive prototype of leucine-rich glycoproteins with flank-center-flank structures." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989) 86(17): 6773-7.
- Hirsch, E., O. Bosco, P. Tropel, M. Laffargue, R. Calvez, F. Altruda, M. Wymann et G. Montrucchio. "Resistance to thromboembolism in PI3Kgamma-deficient mice." *Faseb J* (2001) 15(11): 2019-21.
- Hoffmeister, K. M., T. W. Felbinger, H. Falet, C. V. Denis, W. Bergmeier, T. N. Mayadas, U. H. von Andrian, D. D. Wagner, T. P. Stossel et J. H. Hartwig. "The clearance mechanism of chilled blood platelets." *Cell* (2003) 112(1): 87-97.
- Horenstein, A. L., H. Stockinger, B. A. Imhof et F. Malavasi. "CD38 binding to human myeloid cells is mediated by mouse and human CD31." *Biochem J* (1998) 330 (Pt 3): 1129-35.
- Horstrup, K., B. Jablonka, P. Honig-Liedl, M. Just, K. Kochsiek et U. Walter. "Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition." *Eur J Biochem* (1994) 225(1): 21-7.
- Hua, C. T., J. R. Gamble, M. A. Vadas et D. E. Jackson. "Recruitment and activation of SHP-1 protein-tyrosine phosphatase by human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). Identification of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-like binding motifs and substrates." *J Biol Chem* (1998) 273(43): 28332-40.
- Huizinga, E. G., S. Tsuji, R. A. Romijn, M. E. Schiphorst, P. G. de Groot, J. J. Sixma et P. Gros. "Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain." *Science* (2002) 297(5584): 1176-9.
- Hur, E. M. et K. T. Kim. "G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity." *Cell Signal* (2002) 14(5): 397-405.
- Huttelmaier, S., B. Harbeck, O. Steffens, T. Messerschmidt, S. Illenberger et B. M. Jockusch. "Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP." *FEBS Lett* (1999) 451(1): 68-74.
- Inoue, O., K. Suzuki-Inoue, W. L. Dean, J. Frampton et S. P. Watson. "Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2." *J Cell Biol* (2003) 160(5): 769-80.
- Ishihara, H., T. Sasaoka, H. Hori, T. Wada, H. Hirai, T. Haruta, W. J. Langlois et M. Kobayashi. "Molecular cloning of rat SH2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) and its role in the regulation of insulin signaling." *Biochem Biophys Res Commun* (1999) 260(1): 265-72.
- Italiano, J. E., Jr., W. Bergmeier, S. Tiwari, H. Falet, J. H. Hartwig, K. M. Hoffmeister, P. Andre, D. D. Wagner et R. A. Shivdasani. "Mechanisms and implications of platelet discoid shape." *Blood* (2003) 101(12): 4789-96.
- Italiano, J. E., Jr. et R. A. Shivdasani. "Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets." *J Thromb Haemost* (2003) 1(6): 1174-82.
- Ito, T., H. Matsuno, O. Kozawa, M. Niwa, N. Sakai et T. Uematsu. "Comparison of the antithrombotic effects and bleeding risk of fractionated aurin tricarboxylic acid and the GPIIb/IIIa antagonist GR144053 in a hamster model of stenosis." *Thromb Res* (1999) 95(1): 49-61.
- Jackson, D. E., C. M. Ward, R. Wang et P. J. Newman. "The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 binds platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and forms a distinct signaling complex during platelet aggregation. Evidence for a mechanistic link

- between PECAM-1- and integrin-mediated cellular signaling." *J Biol Chem* (1997) 272(11): 6986-93.
- Jackson, S. P., S. M. Schoenwaelder, I. Goncalves, W. S. Nesbitt, C. L. Yap, C. E. Wright, V. Kenche, K. E. Anderson, S. M. Dopheide, Y. Yuan, S. A. Sturgeon, H. Prabakaran, P. E. Thompson, G. D. Smith, P. R. Shepherd, N. Daniele, S. Kulkarni, B. Abbott, D. Saylik, C. Jones, L. Lu, S. Giuliano, S. C. Hughan, J. A. Angus, A. D. Robertson et H. H. Salem. "PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy." *Nat Med* (2005) 11(5): 507-14.
- Jackson, S. P., S. M. Schoenwaelder, Y. Yuan, I. Rabinowitz, H. H. Salem et C. A. Mitchell. "Adhesion receptor activation of phosphatidylinositol 3-kinase. von Willebrand factor stimulates the cytoskeletal association and activation of phosphatidylinositol 3-kinase and pp60c-src in human platelets." *J Biol Chem* (1994) 269(43): 27093-9.
- Jones, K. L., S. C. Hughan, S. M. Dopheide, R. W. Farndale, S. P. Jackson et D. E. Jackson. "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a negative regulator of platelet-collagen interactions." *Blood* (2001) 98(5): 1456-63.
- Josefsson, E. C., H. H. Gebhard, T. P. Stossel, J. H. Hartwig et K. M. Hoffmeister. "The macrophage alphaMbeta2 integrin alphaM lectin domain mediates the phagocytosis of chilled platelets." *J Biol Chem* (2005) 280(18): 18025-32.
- Joseph, K., Y. Nakazawa, W. F. Bahou, B. Ghebrehiwet et A. P. Kaplan. "Platelet glycoprotein Ib: a zinc-dependent binding protein for the heavy chain of high-molecular-weight kininogen." *Mol Med* (1999) 5(8): 555-63.
- Jung, S. M. et M. Moroi. "Activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1): its mechanism and participation in the physiological functions of platelets." *Trends Cardiovasc Med* (2000) 10(7): 285-92.
- Kageyama, S., H. Yamamoto, M. Nagano, H. Arisaka, T. Kayahara et R. Yoshimoto. "Anti-thrombotic effects and bleeding risk of AJvW-2, a monoclonal antibody against human von Willebrand factor." *Br J Pharmacol* (1997) 122(1): 165-71.
- Kahn, M. L., T. G. Diacovo, D. F. Bainton, F. Lanza, J. Trejo et S. R. Coughlin. "Glycoprotein V-deficient platelets have undiminished thrombin responsiveness and Do not exhibit a Bernard-Soulier phenotype." *Blood* (1999) 94(12): 4112-21.
- Kanaji, T., S. Russell et J. Ware. "Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome." *Blood* (2002) 100(6): 2102-7.
- Kashiwagi, H., M. A. Schwartz, M. Eigenthaler, K. A. Davis, M. H. Ginsberg et S. J. Shattil. "Affinity modulation of platelet integrin alphaIIb beta3 by beta3-endonexin, a selective binding partner of the beta3 integrin cytoplasmic tail." *J Cell Biol* (1997) 137(6): 1433-43.
- Kasirer-Friede, A., M. R. Cozzi, M. Mazzucato, L. De Marco, Z. M. Ruggeri et S. J. Shattil. "Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors." *Blood* (2004) 103(9): 3403-11.
- Kasirer-Friede, A., J. Ware, L. Leng, P. Marchese, Z. M. Ruggeri et S. J. Shattil. "Lateral clustering of platelet GP Ib-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of integrin alpha IIb beta 3." *J Biol Chem* (2002) 277(14): 11949-56.
- Keeney, S. et A. M. Cumming. "The molecular biology of von Willebrand disease." *Clin Lab Haematol* (2001) 23(4): 209-30.
- Kelly, M. D., D. W. Essex, S. S. Shapiro, F. J. Meloni, T. Druck, K. Huebner et B. A. Konkle. "Complementary DNA cloning of the alternatively expressed endothelial cell glycoprotein Ib beta (GPIb beta) and localization of the GPIb beta gene to chromosome 22." *J Clin Invest* (1994) 93(6): 2417-24.
- Kim, M., C. V. Carman et T. A. Springer. "Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins." *Science* (2003) 301(5640): 1720-5.

- Kim, S., J. Jin et S. P. Kunapuli. "Akt activation in platelets depends on Gi signaling pathways." *J Biol Chem* (2004) 279(6): 4186-95.
- Kinlough-Rathbone, R. L. et M. A. Packham. "Unexpected effects of aurin tricarboxylic acid on human platelets." *Thromb Haemost* (1992) 68(2): 189-93.
- Kirk, R. I., M. R. Sanderson et K. M. Lerea. "Threonine phosphorylation of the beta 3 integrin cytoplasmic tail, at a site recognized by PDK1 and Akt/PKB in vitro, regulates Shc binding." *J Biol Chem* (2000) 275(40): 30901-6.
- Knezevic, I., T. M. Leisner et S. C. Lam. "Direct binding of the platelet integrin alphaIIb beta3 (GPIIb-IIIa) to talin. Evidence that interaction is mediated through the cytoplasmic domains of both alphaIIb and beta3." *J Biol Chem* (1996) 271(27): 16416-21.
- Kobe, B. et J. Deisenhofer. "The leucine-rich repeat: a versatile binding motif." *Trends Biochem Sci* (1994) 19(10): 415-21.
- Konstantinides, S., J. Ware, P. Marchese, F. Almus-Jacobs, D. J. Loskutoff et Z. M. Ruggeri. "Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Iba and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis." *J Thromb Haemost* (2006) 4(9): 2014-21.
- Kozma, R., S. Ahmed, A. Best et L. Lim. "The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts." *Mol Cell Biol* (1995) 15(4): 1942-52.
- Kristiansen, K. "Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function." *Pharmacol Ther* (2004) 103(1): 21-80.
- Kroll, M. H., T. S. Harris, J. L. Moake, R. I. Handin et A. I. Schafer. "von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation." *J Clin Invest* (1991) 88(5): 1568-73.
- Kulkarni, S., S. M. Dopheide, C. L. Yap, C. Ravanat, M. Freund, P. Mangin, K. A. Heel, A. Street, I. S. Harper, F. Lanza et S. P. Jackson. "A revised model of platelet aggregation." *J Clin Invest* (2000) 105(6): 783-91.
- Kuwahara, M., M. Sugimoto, S. Tsuji, S. Miyata et A. Yoshioka. "Cytosolic calcium changes in a process of platelet adhesion and cohesion on a von Willebrand factor-coated surface under flow conditions." *Blood* (1999) 94(4): 1149-55.
- Kwiatkowski, A. V., F. B. Gertler et J. J. Loureiro. "Function and regulation of Ena/VASP proteins." *Trends Cell Biol* (2003) 13(7): 386-92.
- Lanza, F., M. Morales, C. de La Salle, J. P. Cazenave, K. J. Clemetson, T. Shimomura et D. R. Phillips. "Cloning and characterization of the gene encoding the human platelet glycoprotein V. A member of the leucine-rich glycoprotein family cleaved during thrombin-induced platelet activation." *J Biol Chem* (1993) 268(28): 20801-7.
- Lebart, M. C., C. Mejean, D. Casanova, E. Audemard, J. Derancourt, C. Roustan et Y. Benyamin. "Characterization of the actin binding site on smooth muscle filamin." *J Biol Chem* (1994) 269(6): 4279-84.
- Lemarchandel, V., J. Ghysdael, V. Mignotte, C. Rahuel et P. H. Romeo. "GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression." *Mol Cell Biol* (1993) 13(1): 668-76.
- Li, C. Q., J. F. Dong, F. Lanza, D. A. Sanan, G. Sae-Tung et J. A. Lopez. "Expression of platelet glycoprotein (GP) V in heterologous cells and evidence for its association with GP Ib alpha in forming a GP Ib-IX-V complex on the cell surface." *J Biol Chem* (1995) 270(27): 16302-7.
- Li, R., C. R. Babu, J. D. Lear, A. J. Wand, J. S. Bennett et W. F. DeGrado. "Oligomerization of the integrin alphaIIb beta3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98(22): 12462-7.

- Li, R., R. Gorelik, V. Nanda, P. B. Law, J. D. Lear, W. F. DeGrado et J. S. Bennett. "Dimerization of the transmembrane domain of Integrin alphaIIb subunit in cell membranes." *J Biol Chem* (2004a) 279(25): 26666-73.
- Li, R., N. Mitra, H. Gratkowski, G. Vilaire, R. Litvinov, C. Nagasami, J. W. Weisel, J. D. Lear, W. F. DeGrado et J. S. Bennett. "Activation of integrin alphaIIbbeta3 by modulation of transmembrane helix associations." *Science* (2003a) 300(5620): 795-8.
- Li, W., D. G. Metcalf, R. Gorelik, R. Li, N. Mitra, V. Nanda, P. B. Law, J. D. Lear, W. F. DeGrado et J. S. Bennett. "A push-pull mechanism for regulating integrin function." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(5): 1424-9.
- Li, Z., X. Xi, M. Gu, R. Feil, R. D. Ye, M. Eigenthaler, F. Hofmann et X. Du. "A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation." *Cell* (2003b) 112(1): 77-86.
- Li, Z., G. Zhang, J. A. Marjanovic, C. Ruan et X. Du. "A platelet secretion pathway mediated by cGMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* (2004b) 279(41): 42469-75.
- Liddington, R. C. et M. H. Ginsberg. "Integrin activation takes shape." *J Cell Biol* (2002) 158(5): 833-9.
- Liu, D., J. Bienkowska, C. Petosa, R. J. Collier, H. Fu et R. Liddington. "Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein." *Nature* (1995) 376(6536): 191-4.
- Liu, J., J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman et S. L. Schreiber. "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes." *Cell* (1991) 66(4): 807-15.
- Liu, J., M. E. Fitzgerald, M. C. Berndt, C. W. Jackson et T. K. Gartner. "Bruton's tyrosine kinase is essential for botrocetin/vWf- induced signaling and GPIb-dependent thrombus formation in vivo." *Blood* (2006).
- Lopez, J. A., R. K. Andrews, V. Afshar-Kharghan et M. C. Berndt. "Bernard-Soulier syndrome." *Blood* (1998) 91(12): 4397-418.
- Lopez, J. A., D. W. Chung, K. Fujikawa, F. S. Hagen, E. W. Davie et G. J. Roth. "The alpha and beta chains of human platelet glycoprotein Ib are both transmembrane proteins containing a leucine-rich amino acid sequence." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988) 85(7): 2135-9.
- Lopez, J. A., I. del Conde et C. N. Shrimpton. "Receptors, rafts, and microvesicles in thrombosis and inflammation." *J Thromb Haemost* (2005) 3(8): 1737-44.
- Lopez, J. A., B. Leung, C. C. Reynolds, C. Q. Li et J. E. Fox. "Efficient plasma membrane expression of a functional platelet glycoprotein Ib-IX complex requires the presence of its three subunits." *J Biol Chem* (1992) 267(18): 12851-9.
- Lopez, J. A., S. Weisman, D. A. Sanan, T. Sih, M. Chambers et C. Q. Li. "Glycoprotein (GP) Ib beta is the critical subunit linking GP Ib alpha and GP IX in the GP Ib-IX complex. Analysis of partial complexes." *J Biol Chem* (1994) 269(38): 23716-21.
- Lova, P., S. Paganini, E. Hirsch, L. Barberis, M. Wymann, F. Sinigaglia, C. Balduini et M. Torti. "A selective role for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in the Gi-dependent activation of platelet Rap1B." *J Biol Chem* (2003) 278(1): 131-8.
- Luo, B. H., C. V. Carman, J. Takagi et T. A. Springer. "Disrupting integrin transmembrane domain heterodimerization increases ligand binding affinity, not valency or clustering." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(10): 3679-84.
- Lyman, S., A. Gilmore, K. Burridge, S. Gidwitz et G. C. White, 2nd. "Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is independent of focal adhesion formation or integrin activation. Studies with activated and inhibitory beta3 cytoplasmic domain mutants." *J Biol Chem* (1997) 272(36): 22538-47.
- Mangin, P., T. David, V. Lavaud, S. L. Cranmer, I. Pikovski, S. P. Jackson, M. C. Berndt, J. P. Cazenave, C. Gachet et F. Lanza. "Identification of a novel 14-3-3zeta binding site

- within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ibalpha." *Blood* (2004) 104(2): 420-7.
- Mangin, P., Y. Yuan, I. Goncalves, A. Eckly, M. Freund, J. P. Cazenave, C. Gachet, S. P. Jackson et F. Lanza. "Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA." *J Biol Chem* (2003) 278(35): 32880-91.
- Mann, D. A. et A. D. Frankel. "Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein." *Embo J* (1991) 10(7): 1733-9.
- Marchese, P., M. Murata, M. Mazzucato, P. Pradella, L. De Marco, J. Ware et Z. M. Ruggeri. "Identification of three tyrosine residues of glycoprotein Ib alpha with distinct roles in von Willebrand factor and alpha-thrombin binding." *J Biol Chem* (1995) 270(16): 9571-8.
- Marshall, S. J., Y. A. Senis, J. M. Auger, R. Feil, F. Hofmann, G. Salmon, J. T. Peterson, F. Burslem et S. P. Watson. "GPIb-dependent platelet activation is dependent on Src kinases but not MAP kinase or cGMP-dependent kinase." *Blood* (2004) 103(7): 2601-9.
- Martin, K., G. Meade, N. Moran, D. C. Shields et D. Kenny. "A palmitylated peptide derived from the glycoprotein Ib beta cytoplasmic tail inhibits platelet activation." *J Thromb Haemost* (2003) 1(12): 2643-52.
- Matsushita, T., D. Meyer et J. E. Sadler. "Localization of von willebrand factor-binding sites for platelet glycoprotein Ib and botrocetin by charged-to-alanine scanning mutagenesis." *J Biol Chem* (2000) 275(15): 11044-9.
- Matuskova, J., A. K. Chauhan, B. Cambien, S. Astrof, V. S. Dole, C. L. Piffath, R. O. Hynes et D. D. Wagner. "Decreased plasma fibronectin leads to delayed thrombus growth in injured arterioles." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2006) 26(6): 1391-6.
- Maxwell, M. J., S. M. Dopheide, S. J. Turner et S. P. Jackson. "Shear induces a unique series of morphological changes in translocating platelets: effects of morphology on translocation dynamics." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2006) 26(3): 663-9.
- Mazzucato, M., L. D. Marco, A. Masotti, P. Pradella, W. F. Bahou et Z. M. Ruggeri. "Characterization of the initial alpha-thrombin interaction with glycoprotein Ib alpha in relation to platelet activation." *J Biol Chem* (1998) 273(4): 1880-7.
- Mazzucato, M., P. Pradella, M. R. Cozzi, L. De Marco et Z. M. Ruggeri. "Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibalpha mechanoreceptor." *Blood* (2002) 100(8): 2793-800.
- McCarty, O. J., S. D. Calaminus, M. C. Berndt, L. M. Machesky et S. P. Watson. "von Willebrand factor mediates platelet spreading through glycoprotein Ib and alphabeta in the presence of botrocetin and ristocetin, respectively." *J Thromb Haemost* (2006) 4(6): 1367-78.
- McCarty, O. J., M. K. Larson, J. M. Auger, N. Kalia, B. T. Atkinson, A. C. Pearce, S. Ruf, R. B. Henderson, V. L. Tybulewicz, L. M. Machesky et S. P. Watson. "Rac1 is essential for platelet lamellipodia formation and aggregate stability under flow." *J Biol Chem* (2005) 280(47): 39474-84.
- McCarty, O. J., Y. Zhao, N. Andrew, L. M. Machesky, D. Staunton, J. Frampton et S. P. Watson. "Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion." *J Thromb Haemost* (2004) 2(10): 1823-33.
- McGhie, A. I., J. McNatt, N. Ezov, K. Cui, L. K. Mower, Y. Hagay, L. M. Buja, L. I. Garfinkel, M. Gorecki et J. T. Willerson. "Abolition of cyclic flow variations in stenosed, endothelium-injured coronary arteries in nonhuman primates with a peptide

- fragment (VCL) derived from human plasma von Willebrand factor-glycoprotein Ib binding domain." *Circulation* (1994) 90(6): 2976-81.
- McGough, A. M., C. J. Staiger, J. K. Min et K. D. Simonetti. "The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions." *FEBS Lett* (2003) 552(2-3): 75-81.
- Mejillano, M. R., S. Kojima, D. A. Applewhite, F. B. Gertler, T. M. Svitkina et G. G. Borisov. "Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end." *Cell* (2004) 118(3): 363-73.
- Mekrache, M., C. Bachelot-Loza, N. Ajzenberg, A. Saci, P. Legendre et D. Baruch. "Activation of pp125FAK by type 2B recombinant von Willebrand factor binding to platelet GPIb at a high shear rate occurs independently of alpha IIb beta 3 engagement." *Blood* (2003) 101(11): 4363-71.
- Miller, J. L. "Platelet-type von Willebrand disease." *Thromb Haemost* (1996) 75(6): 865-9.
- Mistry, N., S. L. Cranmer, Y. Yuan, P. Mangin, S. M. Dopheide, I. Harper, S. Giuliano, D. E. Dunstan, F. Lanza, H. H. Salem et S. P. Jackson. "Cytoskeletal regulation of the platelet glycoprotein Ib/V/IX-von willebrand factor interaction." *Blood* (2000) 96(10): 3480-9.
- Miyata, S., S. Goto, A. B. Federici, J. Ware et Z. M. Ruggeri. "Conformational changes in the A1 domain of von Willebrand factor modulating the interaction with platelet glycoprotein Ibalpha." *J Biol Chem* (1996) 271(15): 9046-53.
- Mo, X., N. Lu, A. Padilla, J. A. Lopez et R. Li. "The transmembrane domain of glycoprotein Ibbeta is critical to efficient expression of glycoprotein Ib-IX complex in the plasma membrane." *J Biol Chem* (2006) 281(32): 23050-9.
- Moog, S., P. Mangin, N. Lenain, C. Strassel, C. Ravanat, S. Schuhler, M. Freund, M. Santer, M. Kahn, B. Nieswandt, C. Gachet, J. P. Cazenave et F. Lanza. "Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation." *Blood* (2001) 98(4): 1038-46.
- Moore, A., G. D. Ross et R. L. Nachman. "Interaction of platelet membrane receptors with von Willebrand factor, ristocetin, and the Fc region of immunoglobulin G." *J Clin Invest* (1978) 62(5): 1053-60.
- Morel, O., B. Hugel, L. Jesel, F. Lanza, M. P. Douchet, M. Zupan, M. Chauvin, J. P. Cazenave, J. M. Freyssinet et F. Toti. "Sustained elevated amounts of circulating procoagulant membrane microparticles and soluble GPV after acute myocardial infarction in diabetes mellitus." *Thromb Haemost* (2004a) 91(2): 345-53.
- Morel, O., B. Hugel, L. Jesel, Z. Mallat, F. Lanza, M. P. Douchet, M. Zupan, M. Chauvin, J. P. Cazenave, A. Tedgui, J. M. Freyssinet et F. Toti. "Circulating procoagulant microparticles and soluble GPV in myocardial infarction treated by primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. A possible role for GPIIb-IIIa antagonists." *J Thromb Haemost* (2004b) 2(7): 1118-26.
- Moroi, M., S. M. Jung, K. Shinmyozu, Y. Tomiyama, A. Ordinas et M. Diaz-Ricart. "Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion." *Blood* (1996) 88(6): 2081-92.
- Morris, A. J. et C. C. Malbon. "Physiological regulation of G protein-linked signaling." *Physiol Rev* (1999) 79(4): 1373-430.
- Mulvihill, J. N., H. G. Huisman, J. P. Cazenave, J. A. van Mourik et W. G. van Aken. "The use of monoclonal antibodies to human platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa to quantitate platelet deposition on artificial surfaces." *Thromb Haemost* (1987) 58(2): 724-31.

- Munday, A. D., M. C. Berndt et C. A. Mitchell. "Phosphoinositide 3-kinase forms a complex with platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and 14-3-3zeta." *Blood* (2000) 96(2): 577-84.
- Muslin, A. J., J. W. Tanner, P. M. Allen et A. S. Shaw. "Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine." *Cell* (1996) 84(6): 889-97.
- Muszbek, L. et M. Laposata. "Glycoprotein Ib and glycoprotein IX in human platelets are acylated with palmitic acid through thioester linkages." *J Biol Chem* (1989) 264(17): 9716-9.
- Naik, M. U. et U. P. Naik. "Calcium-and integrin-binding protein regulates focal adhesion kinase activity during platelet spreading on immobilized fibrinogen." *Blood* (2003) 102(10): 3629-36.
- Naik, U. P., P. M. Patel et L. V. Parise. "Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin alphaIIb cytoplasmic domain." *J Biol Chem* (1997) 272(8): 4651-4.
- Nakamura, F., R. Pudas, O. Heikkinen, P. Permi, I. Kilpelainen, A. D. Munday, J. H. Hartwig, T. P. Stossel et J. Ylanne. "The structure of the GPIb-filamin A complex." *Blood* (2006) 107(5): 1925-32.
- Nesbitt, W. S., S. Kulkarni, S. Giuliano, I. Goncalves, S. M. Dopheide, C. L. Yap, I. S. Harper, H. H. Salem et S. P. Jackson. "Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha IIbeta 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow." *J Biol Chem* (2002) 277(4): 2965-72.
- Newman, P. J. et D. K. Newman. "Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2003) 23(6): 953-64.
- Nishikawa, M., P. de Lanerolle, T. M. Lincoln et R. S. Adelstein. "Phosphorylation of mammalian myosin light chain kinases by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase and by cyclic GMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* (1984) 259(13): 8429-36.
- Nobes, C. D. et A. Hall. "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." *Cell* (1995) 81(1): 53-62.
- Nurden, A. T. "Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes." *J Thromb Haemost* (2005) 3(8): 1773-82.
- Obergfell, A., K. Eto, A. Mocsai, C. Buensuceso, S. L. Moores, J. S. Brugge, C. A. Lowell et S. J. Shattil. "Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton." *J Cell Biol* (2002) 157(2): 265-75.
- Obergfell, A., B. A. Judd, M. A. del Pozo, M. A. Schwartz, G. A. Koretzky et S. J. Shattil. "The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin alphaIIbbeta3 to the actin cytoskeleton." *J Biol Chem* (2001) 276(8): 5916-23.
- Offermanns, S. "The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation." *Biol Chem* (2000) 381(5-6): 389-96.
- Ohlmann, P., B. Hechler, J. P. Cazenave et C. Gachet. "Measurement and manipulation of [Ca²⁺]_i in suspensions of platelets and cell cultures." *Methods Mol Biol* (2004) 273: 229-50.
- Ohta, Y., N. Suzuki, S. Nakamura, J. H. Hartwig et T. P. Stossel. "The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96(5): 2122-8.
- Oury, C., E. Sticker, H. Cornelissen, R. De Vos, J. Vermynen et M. F. Hoylaerts. "ATP augments von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation through

- Ca²⁺-calmodulin and myosin light chain kinase activation." *J Biol Chem* (2004) 279(25): 26266-73.
- Oury, C., E. Toth-Zsamboki, C. Thys, J. Tytgat, J. Vermeylen et M. F. Hoylaerts. "The ATP-gated P2X₁ ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen." *Thromb Haemost* (2001) 86(5): 1264-71.
- Ozaki, Y., K. Satoh, Y. Yatomi, S. Miura, Y. Fujimura et S. Kume. "Protein tyrosine phosphorylation in human platelets induced by interaction between glycoprotein Ib and von Willebrand factor." *Biochim Biophys Acta* (1995) 1243(3): 482-8.
- Paavilainen, V. O., E. Bertling, S. Falck et P. Lappalainen. "Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins." *Trends Cell Biol* (2004) 14(7): 386-94.
- Pareti, F. I., M. Mazzucato, E. Bottini et P. M. Mannucci. "Interaction of porcine von Willebrand factor with the platelet glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex." *Br J Haematol* (1992) 82(1): 81-6.
- Pasquet, J. M., R. Bobe, B. Gross, M. P. Gratacap, M. G. Tomlinson, B. Payrastre et S. P. Watson. "A collagen-related peptide regulates phospholipase C γ 2 via phosphatidylinositol 3-kinase in human platelets." *Biochem J* (1999a) 342 (Pt 1): 171-7.
- Pasquet, J. M., B. Gross, L. Quek, N. Asazuma, W. Zhang, C. L. Sommers, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, B. Judd, J. R. Lee, G. Koretzky, P. E. Love, L. E. Samelson et S. P. Watson. "LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase c γ 2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI." *Mol Cell Biol* (1999b) 19(12): 8326-34.
- Patel, S. R., J. L. Richardson, H. Schulze, E. Kahle, N. Galjart, K. Drabek, R. A. Shivdasani, J. H. Hartwig et J. E. Italiano, Jr. "Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes." *Blood* (2005) 106(13): 4076-85.
- Paul, B. Z., J. L. Daniel et S. P. Kunapuli. "Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change." *J Biol Chem* (1999) 274(40): 28293-300.
- Pearce, A. C., Y. A. Senis, D. D. Billadeau, M. Turner, S. P. Watson et E. Vigorito. "Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen." *J Biol Chem* (2004) 279(52): 53955-62.
- Pelletier, A. J., S. C. Bodary et A. D. Levinson. "Signal transduction by the platelet integrin α IIb β 3: induction of calcium oscillations required for protein-tyrosine phosphorylation and ligand-induced spreading of stably transfected cells." *Mol Biol Cell* (1992) 3(9): 989-98.
- Perrault, C., H. Lankhof, D. Pidard, D. Kerbiriou-Nabias, J. J. Sixma, D. Meyer et D. Baruch. "Relative importance of the glycoprotein Ib-binding domain and the RGD sequence of von Willebrand factor for its interaction with endothelial cells." *Blood* (1997) 90(6): 2335-44.
- Perrault, C., P. Mangin, M. Santer, M. J. Baas, S. Moog, S. L. Cranmer, I. Pikovski, D. Williamson, S. P. Jackson, J. P. Cazenave et F. Lanza. "Role of the intracellular domains of GPIb in controlling the adhesive properties of the platelet GPIb/V/IX complex." *Blood* (2003) 101(9): 3477-84.
- Perrault, C., S. Moog, E. Rubinstein, M. Santer, M. J. Baas, C. de la Salle, C. Ravanat, J. Dambach, M. Freund, S. Santoso, J. P. Cazenave et F. Lanza. "A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIIb β modulates vWF mediated platelet adhesion." *Thromb Haemost* (2001) 86(5): 1238-48.

- Pfaff, M., S. Liu, D. J. Erle et M. H. Ginsberg. "Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins." *J Biol Chem* (1998) 273(11): 6104-9.
- Piotukh, K., W. Gu, M. Kofler, D. Labudde, V. Helms et C. Freund. "Cyclophilin A binds to linear peptide motifs containing a consensus that is present in many human proteins." *J Biol Chem* (2005) 280(25): 23668-74.
- Poletti, L. F., K. Bird, R. B. Harris, D. Marques et M. Sobel. "Prevention of arterial thrombosis using a novel heparin with enhanced antiplatelet activity and reduced anticoagulant activity." *J Vasc Surg* (1997) 26(3): 366-72.
- Pozgajova, M., U. J. Sachs, L. Hein et B. Nieswandt. "Reduced thrombus stability in mice lacking the alpha2A-adrenergic receptor." *Blood* (2006) 108(2): 510-4.
- Puri, R. N., F. Zhou, C. J. Hu, R. F. Colman et R. W. Colman. "High molecular weight kininogen inhibits thrombin-induced platelet aggregation and cleavage of aggrecan by inhibiting binding of thrombin to platelets." *Blood* (1991) 77(3): 500-7.
- Quek, L. S., J. Bolen et S. P. Watson. "A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen." *Curr Biol* (1998) 8(20): 1137-40.
- 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. "Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway." *Blood* (2000) 96(13): 4246-53.
- Rabie, T., A. Strehl, A. Ludwig et B. Nieswandt. "Evidence for a role of ADAM17 (TACE) in the regulation of platelet glycoprotein V." *J Biol Chem* (2005) 280(15): 14462-8.
- Ramakrishnan, V., F. DeGuzman, M. Bao, S. W. Hall, L. L. Leung et D. R. Phillips. "A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98(4): 1823-8.
- Rathore, V., M. A. Stapleton, C. A. Hillery, R. R. Montgomery, T. C. Nichols, E. P. Merricks, D. K. Newman et P. J. Newman. "PECAM-1 negatively regulates GPIIb/IIIa signaling in murine platelets." *Blood* (2003) 102(10): 3658-64.
- Rebecchi, M. J. et S. N. Pentylala. "Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C." *Physiol Rev* (2000) 80(4): 1291-335.
- Reddick, R. L., T. R. Griggs, M. A. Lamb et K. M. Brinkhous. "Platelet adhesion to damaged coronary arteries: Comparison in normal and von Willebrand disease swine." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1982) 79(16): 5076-9.
- Resendiz, J. C., S. Feng, G. Ji, K. A. Francis, M. C. Berndt et M. H. Kroll. "Purinergic P2Y12 receptor blockade inhibits shear-induced platelet phosphatidylinositol 3-kinase activation." *Mol Pharmacol* (2003) 63(3): 639-45.
- Richard, J. P., K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik et B. Lebleu. "Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake." *J Biol Chem* (2003) 278(1): 585-90.
- Richardson, J. L., R. A. Shivdasani, C. Boers, J. H. Hartwig et J. E. Italiano, Jr. "Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production." *Blood* (2005) 106(13): 4066-75.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann et A. Hall. "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." *Cell* (1992) 70(3): 401-10.
- Riobo, N. A. et D. R. Manning. "Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family." *Trends Pharmacol Sci* (2005) 26(3): 146-54.
- Rolf, M. G., C. A. Brearley et M. P. Mahaut-Smith. "Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP." *Thromb Haemost* (2001) 85(2): 303-8.

- Romer, L. H., K. G. Birukov et J. G. Garcia. "Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus." *Circ Res* (2006) 98(5): 606-16.
- Romo, G. M., J. F. Dong, A. J. Schade, E. E. Gardiner, G. S. Kansas, C. Q. Li, L. V. McIntire, M. C. Berndt et J. A. Lopez. "The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin." *J Exp Med* (1999) 190(6): 803-14.
- Roth, M., M. Nauck, S. Yousefi, M. Tamm, K. Blaser, A. P. Perruchoud et H. U. Simon. "Platelet-activating factor exerts mitogenic activity and stimulates expression of interleukin 6 and interleukin 8 in human lung fibroblasts via binding to its functional receptor." *J Exp Med* (1996) 184(1): 191-201.
- Ruggeri, Z. M. "Structure and function of von Willebrand factor." *Thromb Haemost* (1999) 82(2): 576-84.
- Ruggeri, Z. M., J. A. Dent et E. Saldivar. "Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood." *Blood* (1999) 94(1): 172-8.
- Rynningen, A., B. Olav Jensen et H. Holmsen. "Elevation of cyclic AMP decreases phosphoinositide turnover and inhibits thrombin-induced secretion in human platelets." *Biochim Biophys Acta* (1998) 1394(2-3): 235-48.
- Saci, A., S. Pain, F. Rendu et C. Bachelot-Loza. "Fc receptor-mediated platelet activation is dependent on phosphatidylinositol 3-kinase activation and involves p120(Cbl)." *J Biol Chem* (1999) 274(4): 1898-904.
- Saci, A., F. Rendu et C. Bachelot-Loza. "Platelet alpha IIb-beta 3 integrin engagement induces the tyrosine phosphorylation of Cbl and its association with phosphoinositide 3-kinase and Syk." *Biochem J* (2000) 351 Pt 3: 669-76.
- Sadler, J. E. "Biochemistry and genetics of von Willebrand factor." *Annu Rev Biochem* (1998) 67: 395-424.
- Sadler, J. E. "Biomedicine. Contact--how platelets touch von Willebrand factor." *Science* (2002) 297(5584): 1128-9.
- Sakariassen, K. S., P. A. Aarts, P. G. de Groot, W. P. Houdijk et J. J. Sixma. "A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components." *J Lab Clin Med* (1983) 102(4): 522-35.
- Satoh, K., N. Asazuma, Y. Yatomi, Y. Fujimura, S. Miura, K. Titani et Y. Ozaki. "Activation of protein-tyrosine kinase pathways in human platelets stimulated with the A1 domain of von Willebrand factor." *Platelets* (2000) 11(3): 171-6.
- Savage, B., F. Almus-Jacobs et Z. M. Ruggeri. "Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow." *Cell* (1998) 94(5): 657-66.
- Savage, B. et Z. M. Ruggeri. "Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets." *J Biol Chem* (1991) 266(17): 11227-33.
- Savage, B., E. Saldivar et Z. M. Ruggeri. "Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor." *Cell* (1996) 84(2): 289-97.
- Schade, A. J., M. Arya, S. Gao, R. Diz-Kucukkaya, B. Anvari, L. V. McIntire, J. A. Lopez et J. F. Dong. "Cytoplasmic truncation of glycoprotein Ib alpha weakens its interaction with von Willebrand factor and impairs cell adhesion." *Biochemistry* (2003) 42(7): 2245-51.
- Schaller, M. D., C. A. Otey, J. D. Hildebrand et J. T. Parsons. "Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains." *J Cell Biol* (1995) 130(5): 1181-7.

- Schick, P. K. et J. Walker. "The acylation of megakaryocyte proteins: glycoprotein IX is primarily myristoylated while glycoprotein Ib is palmitoylated." *Blood* (1996) 87(4): 1377-84.
- Schirenbeck, A., R. Arasada, T. Bretschneider, T. E. Stradal, M. Schleicher et J. Faix. "The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103(20): 7694-9.
- Schirenbeck, A., T. Bretschneider, R. Arasada, M. Schleicher et J. Faix. "The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia." *Nat Cell Biol* (2005) 7(6): 619-25.
- Schwarz, U. R., U. Walter et M. Eigenthaler. "Taming platelets with cyclic nucleotides." *Biochem Pharmacol* (2001) 62(9): 1153-61.
- Schwindinger, W. F. et J. D. Robishaw. "Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation." *Oncogene* (2001) 20(13): 1653-60.
- Selheim, F., H. Holmsen et F. S. Vassbotn. "PI 3-kinase signalling in platelets: the significance of synergistic, autocrine stimulation." *Platelets* (2000) 11(2): 69-82.
- Shattil, S. J. et P. J. Newman. "Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets." *Blood* (2004) 104(6): 1606-15.
- Shen, Y., G. M. Romo, J. F. Dong, A. Schade, L. V. McIntire, D. Kenny, J. C. Whisstock, M. C. Berndt, J. A. Lopez et R. K. Andrews. "Requirement of leucine-rich repeats of glycoprotein (GP) Ibalpha for shear-dependent and static binding of von Willebrand factor to the platelet membrane GP Ib-IX-V complex." *Blood* (2000) 95(3): 903-10.
- Shrimpton, C. N., G. Borthakur, S. Larrucea, M. A. Cruz, J. F. Dong et J. A. Lopez. "Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib-IX-V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation." *J Exp Med* (2002) 196(8): 1057-66.
- Siedlecki, C. A., B. J. Lestini, K. K. Kottke-Marchant, S. J. Eppell, D. L. Wilson et R. E. Marchant. "Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor." *Blood* (1996) 88(8): 2939-50.
- Simon, D. I., Z. Chen, H. Xu, C. Q. Li, J. Dong, L. V. McIntire, C. M. Ballantyne, L. Zhang, M. I. Furman, M. C. Berndt et J. A. Lopez. "Platelet glycoprotein Ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)." *J Exp Med* (2000) 192(2): 193-204.
- Small, J. V., T. Stradal, E. Vignal et K. Rottner. "The lamellipodium: where motility begins." *Trends Cell Biol* (2002) 12(3): 112-20.
- Snapper, S. B., F. Takeshima, I. Anton, C. H. Liu, S. M. Thomas, D. Nguyen, D. Dudley, H. Fraser, D. Purich, M. Lopez-Illasaca, C. Klein, L. Davidson, R. Bronson, R. C. Mulligan, F. Southwick, R. Geha, M. B. Goldberg, F. S. Rosen, J. H. Hartwig et F. W. Alt. "N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility." *Nat Cell Biol* (2001) 3(10): 897-904.
- Sorisky, A., W. G. King et S. E. Rittenhouse. "Accumulation of PtdIns(3,4)P2 and PtdIns(3,4,5)P3 in thrombin-stimulated platelets. Different sensitivities to Ca²⁺ or functional integrin." *Biochem J* (1992) 286 (Pt 2): 581-4.
- Soslau, G., R. Class, D. A. Morgan, C. Foster, S. T. Lord, P. Marchese et Z. M. Ruggeri. "Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib." *J Biol Chem* (2001) 276(24): 21173-83.
- Soulet, C., B. Hechler, M. P. Gratacap, M. Plantavid, S. Offermanns, C. Gachet et B. Payrastre. "A differential role of the platelet ADP receptors P2Y1 and P2Y12 in Rac activation." *J Thromb Haemost* (2005) 3(10): 2296-306.
- Spradino, J. D., S. S. Shapiro, P. Thiagarajan et S. McCord. "Cultured human umbilical vein endothelial cells contain a membrane glycoprotein immunologically related to platelet glycoprotein Ib." *Blood* (1988) 71(1): 234-7.

- Springer, T. A. "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." *Annu Rev Physiol* (1995) 57: 827-72.
- Stephens, G., N. O'Lunaigh, D. Reilly, P. Harriott, B. Walker, D. Fitzgerald et N. Moran. "A sequence within the cytoplasmic tail of GpIIb independently activates platelet aggregation and thromboxane synthesis." *J Biol Chem* (1998) 273(32): 20317-22.
- Stradal, T. E., K. Rottner, A. Disanza, S. Confalonieri, M. Innocenti et G. Scita. "Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins." *Trends Cell Biol* (2004) 14(6): 303-11.
- Strassel, C., S. Moog, M. J. Baas, J. P. Cazenave et F. Lanza. "Biosynthesis of platelet glycoprotein V expressed as a single subunit or in association with GPIb-IX." *Eur J Biochem* (2004) 271(18): 3671-7.
- Sugimoto, M., H. Mohri, R. A. McClintock et Z. M. Ruggeri. "Identification of discontinuous von Willebrand factor sequences involved in complex formation with botrocetin. A model for the regulation of von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib." *J Biol Chem* (1991) 266(27): 18172-8.
- Sullam, P. M., W. C. Hyun, J. Szollosi, J. Dong, W. M. Foss et J. A. Lopez. "Physical proximity and functional interplay of the glycoprotein Ib-IX-V complex and the Fc receptor FcγRIIA on the platelet plasma membrane." *J Biol Chem* (1998) 273(9): 5331-6.
- Sultan, C., M. Plantavid, C. Bachelot, P. Grondin, M. Breton, G. Mauco, S. Levy-Toledano, J. P. Caen et H. Chap. "Involvement of platelet glycoprotein IIb-IIIa (αIIb-β3 integrin) in thrombin-induced synthesis of phosphatidylinositol 3',4'-bisphosphate." *J Biol Chem* (1991) 266(35): 23554-7.
- Sun, B., J. Li et J. Kambayashi. "Interaction between GPIIb/IIIa and FcγRIIA receptor in human platelets." *Biochem Biophys Res Commun* (1999) 266(1): 24-7.
- Suzuki-Inoue, K., D. Tulasne, Y. Shen, T. Bori-Sanz, O. Inoue, S. M. Jung, M. Moroi, R. K. Andrews, M. C. Berndt et S. P. Watson. "Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling." *J Biol Chem* (2002) 277(24): 21561-6.
- Suzuki-Inoue, K., J. I. Wilde, R. K. Andrews, J. M. Auger, R. P. Siraganian, F. Sekiya, S. G. Rhee et S. P. Watson. "Glycoproteins VI and Ib-IX-V stimulate tyrosine phosphorylation of tyrosine kinase Syk and phospholipase Cγ2 at distinct sites." *Biochem J* (2004) 378(Pt 3): 1023-9.
- Suzuki, T., S. Futaki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda et Y. Sugiura. "Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides." *J Biol Chem* (2002) 277(4): 2437-43.
- Tablin, F., M. J. Reeber et V. T. Nachmias. "Platelets contain a 210K microtubule-associated protein related to a similar protein in HeLa cells." *J Cell Sci* (1988) 90 (Pt 2): 317-24.
- Takagi, J., B. M. Petre, T. Walz et T. A. Springer. "Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling." *Cell* (2002) 110(5): 599-11.
- Takaya, A., Y. Ohba, K. Kurokawa et M. Matsuda. "Rac1A activation at nascent lamellipodia of epidermal growth factor-stimulated Cos7 cells and migrating Madin-Darby canine kidney cells." *Mol Biol Cell* (2004) 15(6): 2549-57.
- Thien, C. B. et W. Y. Langdon. "c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses." *Biochem J* (2005) 391(Pt 2): 153-66.
- Torti, M., A. Bertoni, I. Canobbio, F. Sinigaglia, E. G. Lapetina et C. Balduini. "Rap1B and Rap2B translocation to the cytoskeleton by von Willebrand factor involves FcγRII receptor-mediated protein tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* (1999) 274(19): 13690-7.

- Toth-Zsamboki, E., C. Oury, H. Cornelissen, R. De Vos, J. Vermylen et M. F. Hoylaerts. "P2X1-mediated ERK2 activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation." *J Biol Chem* (2003) 278(47): 46661-7.
- Tsuboi, S. "Calcium integrin-binding protein activates platelet integrin alpha IIb beta 3." *J Biol Chem* (2002) 277(3): 1919-23.
- Tsuji, S., M. Sugimoto, S. Miyata, M. Kuwahara, S. Kinoshita et A. Yoshioka. "Real-time analysis of mural thrombus formation in various platelet aggregation disorders: distinct shear-dependent roles of platelet receptors and adhesive proteins under flow." *Blood* (1999) 94(3): 968-75.
- Uff, S., J. M. Clemetson, T. Harrison, K. J. Clemetson et J. Emsley. "Crystal structure of the platelet glycoprotein Ib(alpha) N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation." *J Biol Chem* (2002) 277(38): 35657-63.
- Ulsemer, P., C. Strassel, M. J. Baas, J. Salamero, S. Chasserot-Golaz, J. P. Cazenave, C. De La Salle et F. Lanza. "Biosynthesis and intracellular post-translational processing of normal and mutant platelet glycoprotein GPIb-IX." *Biochem J* (2001) 358(Pt 2): 295-303.
- van der Flier, A. et A. Sonnenberg. "Function and interactions of integrins." *Cell Tissue Res* (2001a) 305(3): 285-98.
- van der Flier, A. et A. Sonnenberg. "Structural and functional aspects of filamins." *Biochim Biophys Acta* (2001b) 1538(2-3): 99-117.
- Vasudevan, S., J. R. Roberts, R. A. McClintock, J. A. Dent, R. Celikel, J. Ware, K. I. Varughese et Z. M. Ruggeri. "Modeling and functional analysis of the interaction between von Willebrand factor A1 domain and glycoprotein Iba1." *J Biol Chem* (2000) 275(17): 12763-8.
- Vermylen, J., M. B. Donati, G. De Gaetano et M. Verstraete. "Aggregation of human platelets by bovine or human factor VIII: role of carbohydrate side chains." *Nature* (1973) 244(5412): 167-8.
- Vial, C., M. G. Rolf, M. P. Mahaut-Smith et R. J. Evans. "A study of P2X1 receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors." *Br J Pharmacol* (2002) 135(2): 363-72.
- Vicente, V., R. A. Houghten et Z. M. Ruggeri. "Identification of a site in the alpha chain of platelet glycoprotein Ib that participates in von Willebrand factor binding." *J Biol Chem* (1990) 265(1): 274-80.
- Vidal, C., B. Geny, J. Melle, M. Jandrot-Perrus et M. Fontenay-Roupie. "Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin." *Blood* (2002) 100(13): 4462-9.
- Vinogradova, O., A. Velyvis, A. Velyviene, B. Hu, T. Haas, E. Plow et J. Qin. "A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face." *Cell* (2002) 110(5): 587-97.
- Walders-Harbeck, B., S. Y. Khaitlina, H. Hinssen, B. M. Jockusch et S. Illenberger. "The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin." *FEBS Lett* (2002) 529(2-3): 275-80.
- Walther, D. J., J. U. Peter, S. Winter, M. Holtje, N. Paulmann, M. Grohmann, J. Vowinkel, V. Alamo-Bethencourt, C. S. Wilhelm, G. Ahnert-Hilger et M. Bader. "Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release." *Cell* (2003) 115(7): 851-62.
- Wang, Y., M. Sakuma, Z. Chen, V. Ustinov, C. Shi, K. Croce, A. C. Zago, J. Lopez, P. Andre, E. Plow et D. I. Simon. "Leukocyte engagement of platelet glycoprotein

- Ibalpha via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury." *Circulation* (2005) 112(19): 2993-3000.
- Wang, Z., T. M. Leisner et L. V. Parise. "Platelet alpha2beta1 integrin activation: contribution of ligand internalization and the alpha2-cytoplasmic domain." *Blood* (2003) 102(4): 1307-15.
- Ward, C. M., R. K. Andrews, A. I. Smith et M. C. Berndt. "Mocarhagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrand factor receptor glycoprotein Ibalpha. Identification of the sulfated tyrosine/anionic sequence Tyr-276-Glu-282 of glycoprotein Ibalpha as a binding site for von Willebrand factor and alpha-thrombin." *Biochemistry* (1996) 35(15): 4929-38.
- Wardell, M. R., C. C. Reynolds, M. C. Berndt, R. W. Wallace et J. E. Fox. "Platelet glycoprotein Ib beta is phosphorylated on serine 166 by cyclic AMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* (1989) 264(26): 15656-61.
- Ware, J., S. Russell et Z. M. Ruggeri. "Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97(6): 2803-8.
- Watson, S. P., J. M. Auger, O. J. McCarty et A. C. Pearce. "GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets." *J Thromb Haemost* (2005) 3(8): 1752-62.
- Wender, P. A., D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman et J. B. Rothbard. "The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97(24): 13003-8.
- Wenger, R. H., A. N. Wicki, N. Kieffer, S. Adolph, H. Hameister et K. J. Clemetson. "The 5' flanking region and chromosomal localization of the gene encoding human platelet membrane glycoprotein Ib alpha." *Gene* (1989) 85(2): 517-24.
- Wheeler-Jones, C. P., M. P. Learmonth, H. Martin et A. Aitken. "Identification of 14-3-3 proteins in human platelets: effects of synthetic peptides on protein kinase C activation." *Biochem J* (1996) 315 (Pt 1): 41-7.
- Williamson, D., I. Pikovski, S. L. Cranmer, P. Mangin, N. Mistry, T. Domagala, S. Chehab, F. Lanza, H. H. Salem et S. P. Jackson. "Interaction between platelet glycoprotein Ibalpha and filamin-1 is essential for glycoprotein Ib/IX receptor anchorage at high shear." *J Biol Chem* (2002) 277(3): 2151-9.
- Wolff, V., B. Aleil, M. Giroud, J. L. Lorenzini, N. Meyer, M. L. Wiesel, J. P. Cazenave et F. Lanza. "Soluble platelet glycoprotein V is a marker of thrombosis in patients with ischemic stroke." *Stroke* (2005) 36(3): e17-9.
- Wonerow, P., A. C. Pearce, D. J. Vaux et S. P. Watson. "A critical role for phospholipase Cgamma2 in alphaIIbbeta3-mediated platelet spreading." *J Biol Chem* (2003) 278(39): 37520-9.
- Woulfe, D., H. Jiang, R. Mortensen, J. Yang et L. F. Brass. "Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets." *J Biol Chem* (2002) 277(26): 23382-90.
- Wu, D., K. Vanhoorelbeke, N. Cauwenberghs, M. Meiring, H. Depraetere, H. F. Kotze et H. Deckmyn. "Inhibition of the von Willebrand (VWF)-collagen interaction by an antihuman VWF monoclonal antibody results in abolition of in vivo arterial platelet thrombus formation in baboons." *Blood* (2002) 99(10): 3623-8.
- Wu, G., D. W. Essex, F. J. Meloni, T. Takafuta, K. Fujimura, B. A. Konkle et S. S. Shapiro. "Human endothelial cells in culture and in vivo express on their surface all four components of the glycoprotein Ib/IX/V complex." *Blood* (1997) 90(7): 2660-9.
- Wu, W. B., H. C. Peng et T. F. Huang. "Crotalin, a vWF and GP Ib cleaving metalloproteinase from venom of *Crotalus atrox*." *Thromb Haemost* (2001a) 86(6): 1501-11.

- Wu, Y., N. Asazuma, K. Satoh, Y. Yatomi, T. Takafuta, M. C. Berndt et Y. Ozaki. "Interaction between von Willebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinase in human platelets: role of phosphoinositide 3-kinase." *Blood* (2003) 101(9): 3469-76.
- Wu, Y., K. Suzuki-Inoue, K. Satoh, N. Asazuma, Y. Yatomi, M. C. Berndt et Y. Ozaki. "Role of Fc receptor gamma-chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling." *Blood* (2001b) 97(12): 3836-45.
- Xiao, T., J. Takagi, B. S. Collier, J. H. Wang et T. A. Springer. "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics." *Nature* (2004) 432(7013): 59-67.
- Xiong, J. P., T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman et M. A. Arnaout. "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3." *Science* (2001) 294(5541): 339-45.
- Yagi, M., S. Edelhoff, C. M. Disteché et G. J. Roth. "Structural characterization and chromosomal location of the gene encoding human platelet glycoprotein Ib beta." *J Biol Chem* (1994) 269(26): 17424-7.
- Yamamoto, H., I. Vreys, J. M. Stassen, R. Yoshimoto, J. Vermynen et M. F. Hoylaerts. "Antagonism of vWF inhibits both injury induced arterial and venous thrombosis in the hamster." *Thromb Haemost* (1998) 79(1): 202-10.
- Yamamoto, N., H. Kitagawa, K. Tanoue et H. Yamazaki. "Monoclonal antibody to glycoprotein Ib inhibits both thrombin- and ristocetin-induced platelet aggregations." *Thromb Res* (1985) 39(6): 751-9.
- Yanabu, M., Y. Ozaki, S. Nomura, T. Miyake, Y. Miyazaki, H. Kagawa, Y. Yamanaka, N. Asazuma, K. Satoh, S. Kume, Y. Komiyama et S. Fukuhara. "Tyrosine phosphorylation and p72syk activation by an anti-glycoprotein Ib monoclonal antibody." *Blood* (1997) 89(5): 1590-8.
- Yao, Q., M. Li, H. Yang, H. Chai, W. Fisher et C. Chen. "Roles of cyclophilins in cancers and other organ systems." *World J Surg* (2005) 29(3): 276-80.
- Yao, S. K., J. C. Ober, L. I. Garfinkel, Y. Hagay, N. Ezov, J. J. Ferguson, H. V. Anderson, A. Panet, M. Gorecki, L. M. Buja et et al. "Blockade of platelet membrane glycoprotein Ib receptors delays intracoronary thrombogenesis, enhances thrombolysis, and delays coronary artery reocclusion in dogs." *Circulation* (1994) 89(6): 2822-8.
- Yap, C. L., K. E. Anderson, S. C. Hughan, S. M. Dopheide, H. H. Salem et S. P. Jackson. "Essential role for phosphoinositide 3-kinase in shear-dependent signaling between platelet glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha(IIb)beta(3)." *Blood* (2002) 99(1): 151-8.
- Yap, C. L., S. C. Hughan, S. L. Cranmer, W. S. Nesbitt, M. M. Rooney, S. Giuliano, S. Kulkarni, S. M. Dopheide, Y. Yuan, H. H. Salem et S. P. Jackson. "Synergistic adhesive interactions and signaling mechanisms operating between platelet glycoprotein Ib/IX and integrin alpha IIbbeta 3. Studies in human platelets and transfected Chinese hamster ovary cells." *J Biol Chem* (2000) 275(52): 41377-88.
- Yuan, Y., S. Kulkarni, P. Ulsemer, S. L. Cranmer, C. L. Yap, W. S. Nesbitt, I. Harper, N. Mistry, S. M. Dopheide, S. C. Hughan, D. Williamson, C. de la Salle, H. H. Salem, F. Lanza et S. P. Jackson. "The von Willebrand factor-glycoprotein Ib/V/IX interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells." *J Biol Chem* (1999) 274(51): 36241-51.
- Zimmermann, H. "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2000) 362(4-5): 299-309.