



N° :

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

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie
Option : Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

Par

Christelle NONNE

**Développement et caractérisation d'un modèle de
thrombose artérielle mésentérique induite par un rayon
laser et évaluation de nouvelles cibles antiplaquettaires.**

Directeur de Thèse

Mr François LANZA

Soutenue publiquement le : 23 avril 2007

Membres du jury

Dr. Alain RUPIN
Dr. Cécile DENIS
Pr. Alain BERETZ
Dr. Christian GACHET
Dr. François LANZA

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Examineur
Directeur de Thèse

Unité de Recherche

INSERM U.311

Laboratoire de Biologie et Pharmacologie de l'Hémostase
et de la Thrombose

Directeur : Dr. Christian Gachet

Etablissement Français du Sang (EFS) – Alsace

Directeur : Pr. Jean-Pierre Cazenave

10, rue Spielmann, B.P. 36, 67065 Strasbourg Cedex

Tél : +33/ 03.88.21.25.25

Fax : +33/ 03.88.21.25.21

E-mail : u311@efs-alsace.fr

Direction de thèse :

Dr. François Lanza

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

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean-Pierre Cazenave, Directeur de l'EFS-Alsace de Strasbourg, de m'avoir accueillie au sein de son Etablissement et de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont également au Docteur Christian Gachet, Directeur de l'Unité 311 de l'INSERM. Il a constamment porté un regard pertinent, constructif et pédagogue sur mon travail.

Un grand merci aux membres de mon jury, Madame Denis, Monsieur Beretz et Monsieur Rupin de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse.

Ma reconnaissance s'adresse à François Lanza qui m'a accueillie dans son équipe et encadrée. Je te remercie pour m'avoir fait bénéficier de tes vastes connaissances et de ta rigueur scientifique. Merci pour ta confiance, ta patience à mon égard et les conseils personnels prodigués.

Je remercie chaleureusement les membres et le personnel technique de l'équipe de François et de l'ensemble de l'Unité 311. Un grand merci à ceux de passage et ceux encore présents : ces années m'ont permis de créer certains liens privilégiés. Merci au personnel de l'animalerie pour son aide et sa disponibilité et notamment à Catherine Meyer pour son soutien technique. Merci Monique pour tes conseils tant scientifiques qu'humains. Merci Anita et Pierre pour les corrections du manuscrit et pour votre contribution à ce travail. Je n'oublie pas Nadège, Véronique et Stéphanie qui ont connus avec moi les joies et les souffrances du laser.

Merci aux copains pour avoir toujours été présents, pour votre perpétuelle bonne humeur et pour votre soutien sans faille. Je vous promets de nombreuses déclarations d'amour pour les prochains jours...

Merci au personnel de la crèche de la montagne verte pour avoir pris le relais auprès d'Emiliana pendant la rédaction de ce manuscrit.

Je voudrais remercier mon Amoureux de m'avoir soutenu jusqu'à la fin de la rédaction et d'être auprès de moi et Emiliana d'illuminer mes journées. Ce manuscrit a été couronné par l'apparition d'une première dent!

C'est avec une immense tendresse que je remercie mes parents pour leur aide, leur soutien et leur indulgence. J'ai une pensée particulière pour mon Abuelita à qui je dédie ce travail.

FIGURES ET TABLEAUX.....	7
ABREVIATIONS	9
A) INTRODUCTION GENERALE	11
BUT DE LA THESE ET PRINCIPAUX RESULTATS	15
B) REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
1. Structure d'une artère, composition cellulaire, matrices et réactivité hémostatique.	21
1.1. Structure d'une artère.....	21
1.2. Composition d'une artère saine.....	23
1.2.1. Les cellules endothéliales.....	23
a) Origine et structure.....	23
b) Endothélium « quiescent » ou activé.....	25
c) Cellules endothéliales « quiescentes » : présentation d'une surface non thrombogène.....	25
d) Cellules endothéliales activées.....	29
1.2.2. Les cellules musculaires lisses et les fibroblastes vasculaires.....	30
1.2.3. La matrice extracellulaire.....	31
a) Les collagènes.....	32
b) Les fibres élastiques.....	35
c) Les glycoprotéines de structure.....	37
d) Les protéoglycanes.....	39
1.3. Modifications pathologiques de la paroi et de la rhéologie sanguine.....	41
1.3.1. Notions de rhéologie applicables au vaisseau.....	41
1.3.2. Impact de la rhéologie sanguine sur l'adhésion et l'activation plaquettaire.....	42
1.3.3. Modifications de la composition de la paroi artérielle au cours de l'athérosclérose.....	42
1.3.4. Rhéologie sanguine et athéromatose.....	44
1.3.5. Conséquences cliniques.....	45
2. Mécanismes de l'hémostase et de la thrombose	46
2.1. La plaquette sanguine	47
2.2. Interactions des plaquettes avec les protéines adhésives de la paroi vasculaire lésée.....	49
2.2.1. Adhésion réversible et initiation de l'activation des plaquettes par la liaison du FW à la GPIIb.....	49
a) Structure du complexe GPIIb-V-IX.....	49
b) Fonction d'adhésion de la GPIIb.....	51
c) Fonction de signalisation.....	53
d) Rôle dans la thrombose.....	53
2.2.2. Activation de l'intégrine plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$	54
a) Structure et fonctions.....	55
b) Rôle dans la thrombose.....	57
2.2.3. Adhésion stable et activation par les récepteurs au collagène.....	58
a) L'intégrine $\alpha_2\beta_1$	58
b) La GPVI.....	59
2.2.4. Les récepteurs à la thrombine.....	61
2.3. Rôle de l'ADP et du TxA ₂ dans l'amplification de l'activation plaquettaire et la croissance du thrombus.....	63
2.3.1. ADP.....	64
2.3.2. Thromboxane A ₂	67
2.4. Stabilisation du thrombus, rétraction du caillot et fibrinolyse	72
2.4.1. Activation de la coagulation et stabilisation du thrombus.....	72
2.4.2. Rétraction du caillot et désagrégation	74

2.4.3.	Fibrinolyse et réparation vasculaire	75
3.	Modèles animaux de thrombose artérielle.....	76
3.1.	Intérêts et limites des modèles murins, précautions dans l'interprétation des résultats	79
3.2.	Modèle de type Folts.....	81
3.3.	Modèles de lésion mécanique	82
3.4.	Modèle électrolytique	83
3.5.	Modèle de lésion photoinduite.....	85
3.6.	Modèle au FeCl ₃	86
3.7.	Modèle de lésion induite au laser.....	89
3.8.	Modèle de thromboembolisme généralisé.....	91
C)	RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	93
1.	Caractérisation pharmacologique d'un modèle de thrombose localisée induite au laser sur artérioles mésentériques de souris	95
	PUBLICATION 1	95
1.1.	Introduction.....	97
1.2.	Conclusion	115
2.	Caractérisation histologique.....	119
	PUBLICATION 2	119
2.1.	Introduction.....	120
2.2.	Matériels et méthodes	122
2.3.	Résultats et discussion	125
3.	Rôle du complexe GPIb-V-IX et des récepteurs au collagène dans la thrombose artérielle.....	137
3.1.	Le complexe GPIb-V-IX.....	139
3.1.1.	Evaluation d'une lignée de souris Bernard-Soulier présentant une inactivation du gène de la sous-unité GPIbβ.....	139
	PUBLICATION 3	139
a)	Introduction.....	141
b)	Conclusion	157
3.1.2.	Evaluation d'une lignée de souris présentant une inactivation du gène de la sous-unité GPV ...	159
	PUBLICATION 4	159
a)	Introduction.....	161
b)	Conclusion	185
3.2.	Le récepteur au collagène GPVI/γRFc.....	187
	PUBLICATION 5.....	187
3.2.1.	Introduction.....	189
3.2.2.	Conclusion	199
4.	Rôle des récepteurs à l'ADP P2Y₁ et P2Y₁₂ dans la thrombose.....	201
	PUBLICATION 6	201
4.1.	Introduction.....	203
4.2.	Conclusion	213
D)	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	215
E)	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	229

FIGURES ET TABLEAUX

Figures :

	Page
1 L'hémostase primaire.....	14
2 Structure d'une artère saine.....	20
3 Photographie de microscopie électronique à transmission d'un corps de Weibel-Palade d'une cellule endothéliale.	22
4 Représentation schématique des différents domaines structuraux du facteur Willebrand.....	24
5 Les cellules endothéliales quiescentes.....	26
6 Les cellules endothéliales activées.....	28
7 Représentation schématique et image de microscopie électronique des collagènes fibrillaires de type I et III.....	33
8 Structure du collagène IV.....	35
9 Structure de la fibronectine.....	36
10 Structure de la laminine.....	36
11 Structure de la thrombospondine-1.....	39
12 Représentation schématique de la vitesse et du taux de cisaillement d'un liquide newtonien.....	40
13 Plaque d'athérosclérose.....	43
14 Flux sanguin dans un vaisseau sténosé.....	45
15 Morphologie et ultrastructure des plaquettes.....	45
16 Représentation schématique du complexe GPIb-V-IX.....	50
17 La signalisation déclenchée par les récepteurs aux protéines adhésives.....	52

18 Mécanisme bidirectionnel de signalisation médié par l'intégrine αIbβ3	56
19 Signalisation déclenchée par la thrombine.....	63
20 La signalisation déclenchée par les récepteurs plaquettaires P2.....	66
21 Signalisation déclenchée par le thromboxane A₂ (TxA₂), via le récepteur TPα prédominant dans les plaquettes.....	67
22 Modèle de Folts.....	81
23 Modèle de lésion électrique.....	84
24 Thrombose carotidienne induite par le FeCl₃ dans la souris.....	87
25 Modèle de lésion au Chlorure de Fer sur artères mésentériques de souris.....	87
26 Modèle de thrombose induite au laser.....	89
27 Caractérisation pharmacologique du modèle de thrombose par application localisée de FeCl₃ sur la carotide de souris.....	142

Tableaux :

1 Composition d'une artère saine.....	20
2 Protéines stockées dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et fonctions principales.....	22
3 Principales protéines d'adhésion présentes dans la paroi vasculaire et leurs récepteurs plaquettaires respectifs.....	32
4 Paramètres hémodynamiques dans différentes artères humaine	40
5 Effets de l'inactivation génique ou de l'inhibition pharmacologique de récepteurs plaquettaires et de protéines adhésives dans des modèles de thrombose <i>in vivo</i> chez la souris.....	69
6 Caractérisation pharmacologique des modèles de thrombose artérielle dans différentes espèces animales.....	77

ABREVIATIONS

ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeat
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
AMP	Adénosine-5'-monophosphate
AMP _c	Adénosine-3',5'-monophosphate cyclique
apoE	Apolipoprotéine E
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
BS	Bernard-Soulier
CFR	Cyclic Flow Reduction
CHO	Cellules d'ovaire de hamster
CML	Cellules Musculaires Lisses
COX	Cyclooxygénase
CRP	Collagen-related peptide
DAG	Diacylglycérol
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	Monoxyde d'azote synthase endothéliale
EPCR	Endothelial Protein C Receptor
FACIT _s	Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helix
FeCl ₃	Chlorure de fer
Fg	Fibrinogène
FN	Fibronectine
FT	Facteur Tissulaire
FW	Facteur Willebrand
GAG	Glycosaminoglycanes
Gas6	Growth arrest-specific gene 6
GMP _c	Guanosine-3',5'-monophosphate cyclique
GP	Glycoprotéine
IL-1	Interleukine 1
InsP3	Inositol (1,4,5)-triphosphate
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

kDa	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoproteine
LEE	Lame élastique externe
LEI	Lame élastique interne
LEI	Limitante Elastique Interne
LN	Laminines
LPS	Lipopolisaccharide
MEC	Matrice extracellulaire
MEC	Matrice extracellulaire
NO	Monoxyde d'azote
PAR	Protease Activated Receptor
PG	Protéoglycanes
PGG ₂	Prostaglandines endopéroxydes
PGI ₂	Prostacycline
PI 3-kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Platelet Membrane Calcium ATPase
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
SCO	Système canaliculaire ouvert
TFPI	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TM	Thrombomoduline
TNF	Tumor necrosis factor
TP	Récepteur au thromboxane et aux prostanoides
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
TSP	Thrombin-sensitive protein
TxA ₂	Thromboxane A ₂
VASP	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein
WP	Weibel-Palade
γR _{Fc}	Chaîne γ des récepteurs Fc

A) INTRODUCTON GENERALE

L'hémostase regroupe l'ensemble des mécanismes qui concourent à l'arrêt des saignements. Trois phases très intriquées sont mises en jeu : 1) l'hémostase primaire va permettre de limiter les pertes sanguines par la contraction de la paroi vasculaire, la modification des conditions hémodynamiques, l'exposition de la matrice sous-endothéliale et la formation d'un clou plaquettaire qui va obstruer la lésion 2) la coagulation plasmatique en transformant le fibrinogène insoluble en fibrine va constituer l'armature du thrombus et en assurer la stabilité 3) la fibrinolyse qui entraîne la résorption du caillot fibrineux va rétablir une circulation sanguine normale et participer à la réparation tissulaire. Une parfaite intégration de ces différents mécanismes concourt au maintien de l'équilibre hémostatique. Un dysfonctionnement de l'un de ces systèmes peut perturber cet équilibre et induire soit une tendance hémorragique soit une tendance thrombotique

L'hémostase primaire fait donc intervenir plusieurs éléments : le vaisseau, le sang, notamment les plaquettes sanguines et certaines protéines du plasma, et les forces hémodynamiques. Les plaquettes jouent un rôle crucial lors de l'hémostase primaire. Ce sont des fragments cellulaires anucléés de petite taille produits à partir des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Au repos, elles ont une forme discoïde, un diamètre de 2 μm pour un volume d'environ 8 μm^3 . Les 2/3 des plaquettes de l'organisme circulent dans le sang à une concentration physiologique variant entre 150.000 et 400.000 plaquettes/ μl , le dernier tiers étant séquestré majoritairement par la rate. Leur durée de vie moyenne est de 8 à 10 jours. Lors d'une lésion vasculaire, et dans des conditions de forces de cisaillement à la paroi élevées (artérioles, artères), les plaquettes circulantes interagissent avec le facteur Willebrand (FW) présent dans le sous-endothélium ou capturé à partir du plasma grâce à un récepteur multimoléculaire : le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX (**Berndt et al. 2001**). Cette liaison réversible ralentit les plaquettes capturées qui s'activent, changent de forme et s'immobilisent par liaison de l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (GPIIb-IIIa) au FW et des récepteurs (GPVI et $\alpha_2\beta_1$) au collagène. Lors de l'activation, les plaquettes sécrètent le contenu de leurs granules (ADP) et produisent du thromboxane A2 qui amplifient l'activation initiale et permettent de recruter d'autres plaquettes (agrégation) par la liaison du fibrinogène à l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activée et d'accroître la taille du thrombus. L'ensemble de ces étapes va permettre la formation du «clou plaquettaire» qui stoppe les saignements. Le clou plaquettaire (thrombus blanc) ainsi constitué est instable et peut être consolidé par l'activation de la coagulation. Celle-ci est initiée par le facteur tissulaire présent dans la paroi vasculaire et renforcée par l'exposition de phospholipides anioniques et de cofacteurs de la coagulation par les plaquettes activées. La cascade de coagulation aboutit à la génération locale de thrombine, qui clive le fibrinogène

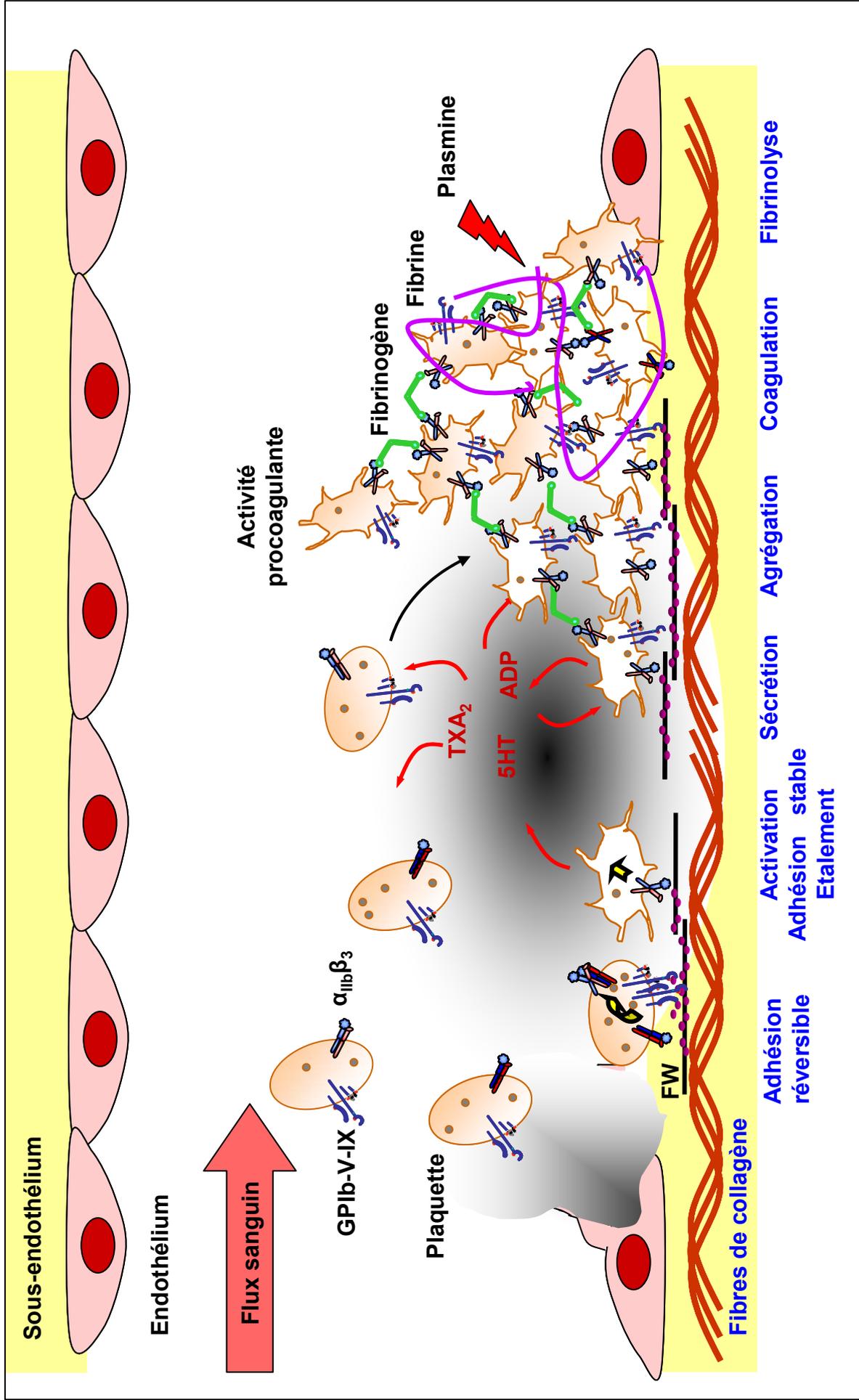


Figure 1 : L'hémostase primaire.

circulant afin de former un réseau fibrillaire de fibrine qui va permettre de consolider l'agrégat. Aux temps tardifs, le système fibrinolytique est déclenché : sous l'effet de la génération de fibrine, de la plasmine est générée à partir du plasminogène circulant. La plasmine permet *in fine* la solubilisation du thrombus fibrineux, conduisant à la réparation complète du vaisseau (**Boneu and Cazenave 1997**) (Figure 1). La thrombose est un processus pathologique faisant intervenir les mêmes mécanismes que l'hémostase mais de manière non contrôlée pouvant aboutir à l'obstruction du vaisseau sanguin. La thrombose occlusive peut survenir notamment au niveau artériel lors de l'érosion ou de la rupture d'une plaque d'athérome et provoquer un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral (**Lusis 2000**).

But de la thèse et principaux résultats

La compréhension des mécanismes de développement des thromboses et l'évaluation de l'efficacité de substances antithrombotiques nécessitent d'établir des modèles expérimentaux dans l'animal. L'avènement de souris génétiquement modifiées a entraîné un regain d'intérêt pour les modèles de thrombose et le développement de techniques appliquées au petit animal (**Falati et al. 2004; Gachet et al. 2006a; Jackson and Schoenwaelder 2003; Sturgeon et al. 2006; Ware 2004**). Les modèles les plus couramment utilisés, notamment ceux basés sur une lésion vasculaire par le FeCl₃, présentent certaines limites en terme de sensibilité, de reproductibilité et de quantification. Le but de cette thèse a été i) de développer un modèle *in vivo* de thrombose artérielle dans la souris par lésion laser présentant plusieurs niveaux de sévérité ii) d'évaluer la sensibilité du modèle aux traitements antiplaquettaires et anticoagulants iii) d'examiner le rôle des grandes voies d'adhésion et d'activation des plaquettes déclenchées par les principaux récepteurs d'adhésion (GPIIb-V-IX, GPVI et intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$) et par les récepteurs aux agonistes solubles tels que les récepteurs P2 à l'ADP.

Des lésions superficielles ou sévères ont été produites par tir laser sur la paroi d'artérioles mésentériques de souris après calibration de l'intensité et la durée du tir. Ces lésions induisent respectivement la formation d'un thrombus non occlusif de taille modérée rapidement réversible et d'un thrombus quasi occlusif et plus stable (**Article 1**). L'étendue des lésions et la nature de la surface exposée dans les deux types de lésion ont été analysées par

microscopie électronique, couplée à de l'immunomarquage. La lésion superficielle entraîne une desquamation sélective de l'endothélium avec préservation du sous-endothélium, de la média et de l'adventice de la paroi artérielle. L'immunomarquage montre la présence dans le sous-endothélium de fibres de collagène de types III et IV. Les plaquettes qui ont adhéré à ces structures ont changé de forme n'ont mais pas dégranulé. La lésion sévère entraîne une desquamation de l'endothélium et une perforation de la lame élastique externe permettant le contact du sang avec l'adventice riche en fibres de collagène I et en facteur tissulaire. La présence de fibrine a été détectée à la base du thrombus au site de la lésion sévère en microscopie électronique et confirmée par microscopie confocale *in vivo* (**Article 2**).

Afin d'évaluer la sensibilité pharmacologique de ce modèle, les souris ont été traitées par divers agents antiplaquettaires et anticoagulants. L'aspirine, un antiplaquettaire à visée préventive et qui agit en prévenant la production de thromboxane A₂, n'empêche pas la formation du thrombus quelque soit le type de lésion. Au contraire, le clopidogrel, antagoniste du récepteur à l'ADP P2Y₁₂, ou un inhibiteur de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, deux médicaments utilisés en clinique interventionnelle et en prévention (clopidogrel), diminuent fortement la taille des thrombi après lésions superficielles ou sévères. L'hirudine, inhibiteur puissant et sélectif de la thrombine, entraîne une forte diminution de la thrombose suite à une lésion sévère (indiquant la formation de thrombine), mais n'a pas ou peu d'effet à la suite d'une lésion superficielle qui apparaît comme plus dépendante d'une activation par le collagène (**Article 1**).

Dans un second temps, le modèle de thrombose laser a été mis à profit pour évaluer la contribution de deux grandes voies participant à l'hémostase primaire provenant *i*) des récepteurs d'adhésion au FW et au collagène *ii*) d'un récepteur (P2Y₁) à l'agoniste soluble ADP. Le complexe GPIb-V-IX joue un rôle essentiel lors de l'hémostase et son absence entraîne un syndrome hémorragique, le syndrome de Bernard-Soulier (**Lopez et al. 1998**). Les répercussions du syndrome de Bernard-Soulier et le rôle du complexe GPIb-V-IX dans la thrombose artérielle ont été évalués dans des souris déficientes pour la sous-unité GPIb β qui reproduisent cette pathologie. Une forte diminution de la thrombose a été observée dans ces souris en réponse aux deux types de lésions laser (**Article 3**).

Le rôle du principal récepteur d'activation par le collagène, la GPVI, a été évalué dans les souris déficientes en chaîne γ des récepteurs Fc, une sous-unité associée à la GPVI et nécessaire pour sa signalisation. Une diminution de la thrombose n'a été observée que dans le modèle de lésion superficielle, où la thrombine n'est que peu impliquée (**Article 5**). Une réponse similaire a été observée dans les souris déficientes en PLC γ 2, qui est une enzyme clef de la signalisation provenant de GPVI (**Article 1**). Ces deux résultats questionnent l'intérêt

d'un ciblage pharmacologique de la GPVI dans la thrombose artérielle, tout au moins dans des conditions où le rôle de la thrombine prédomine.

La GPV est une autre sous-unité du complexe GPIb-V-IX dont la fonction est mal établie mais qui semble moduler les réponses plaquettaires à la thrombine et au collagène. L'étude des souris $GPV^{-/-}$ a montré une tendance pro- ou anti-thrombotique selon le type de lésion laser, respectivement sévère ou superficielle (**Article 4**).

La seconde grande voie étudiée a été celle déclenchée par les agonistes solubles qui se lient à des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) signalant via la protéine $G_{\alpha q}$ et la $PLC\beta$, tels que le récepteur $P2Y_1$ à l'ADP, $TP\alpha$ au TxA_2 , PAR à la thrombine et 5-HT_{2A} à la sérotonine. Une thrombose diminuée a été observée pour les souris $G_{\alpha q}^{-/-}$ dans le modèle de thrombose au laser quelque soit le type de lésion (**Article 1**). Un nouvel antagoniste puissant de $P2Y_1$, le MRS2500, a été évalué dans ce modèle montrant l'inhibition efficace et durable de la formation du thrombus. Le clopidogrel, antagoniste du récepteur à l'ADP $P2Y_{12}$, a montré en association avec le MRS2500 une inhibition totale de la thrombose dans les deux types de lésions (**Article 6**). Ces résultats suggèrent que le récepteur $P2Y_1$ puisse devenir une cible intéressante en complément des stratégies antiplaquettaires déjà existantes.

Le modèle de thrombose induite au laser développé durant ce travail de thèse présente un certain nombre de caractéristiques intéressantes par comparaison aux modèles existants : les lésions sont localisées, reproductibles et modulables. Par ailleurs, ce modèle a été caractérisé histologiquement et pharmacologiquement, et est sensible aux traitements antiplaquettaires et anticoagulants (lésion sévère). Il a permis d'explorer de nouvelles cibles et voies d'activation, dont le complexe GPIb-V-IX et le récepteur $P2Y_1$, pour lesquels n'existent encore que peu d'inhibiteurs, mais qui représentent des voies de recherche pharmacologique intéressantes. Une seconde information importante obtenue dans ce travail est que le blocage du récepteur GPVI au collagène ou de sa voie de signalisation est par elle-même peu efficace dans des conditions de thrombose sévère où l'activation par la thrombine prédomine. Cependant, le ciblage de GPVI pourrait être intéressant en situations de lésions superficielles ou en association avec d'autres antiplaquettaires. Enfin, ce travail a montré l'intérêt potentiel de bloquer simultanément les deux principaux récepteurs de l'ADP, $P2Y_1$ et $P2Y_{12}$.

B) REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

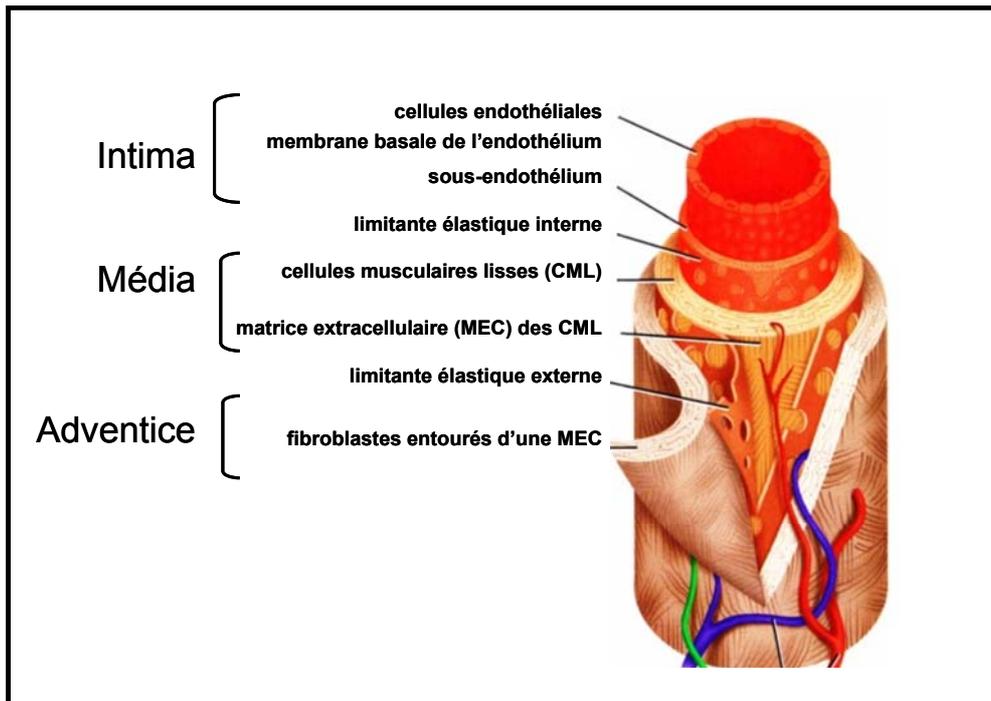


Figure 2 : Structure d'une artère saine

Tuniques	Composition cellulaire	Composition protéique de la MEC
Intima	Cellules endothéliales	FW P-sélectine Collagènes III, IV, VI
Média	Cellules musculaires lisses	Fibres élastiques Collagènes I, III, IV Fibronectines Laminines Thrombospondines Ténascines Ostéopontine Protéoglycanes
Adventice	Fibroblastes	Facteur tissulaire Collagène I Fibronectines Laminines Thrombospondines Ténascines Ostéopontine Protéoglycanes

Tableau 1 : Composition d'une artère saine

Cette revue traitera des trois acteurs mis en jeu lors de la constitution d'un thrombus décrits dans la triade de Virchow à savoir : le vaisseau, les forces hémodynamiques et le sang. Mon travail de thèse ayant été axé sur la thrombose en réponse à une lésion artérielle, je traiterai tout d'abord de la composition d'une artère et des propriétés thrombogènes des couches pouvant être exposées. Une seconde partie considérera l'impact de la rhéologie sanguine sur l'adhésion et l'activation plaquettaire dans une artère saine ou pathologique. Dans une troisième partie, les mécanismes de l'hémostase et de la thrombose seront abordés en focalisant sur les interactions et l'activation des plaquettes au niveau de la paroi. Enfin, un dernier chapitre traitera des modèles de thrombose *in vivo* en centrant sur ceux développés dans les petits animaux comme la souris.

1. Structure d'une artère, composition cellulaire, matrices et réactivité hémostatique.

On distingue classiquement trois types de vaisseaux sanguins, les artères, les veines et les capillaires qui présentent des spécialisations à différents niveaux de l'arbre vasculaire. En général, on retrouve les mêmes composants primaires (cellules, matrice extracellulaire) dans tous les vaisseaux, mais leur organisation, leur richesse et leur qualité diffèrent selon la fonction et la localisation du vaisseau (**Bou-Gharios et al. 2004**).

1.1. Structure d'une artère

Les vaisseaux larges, tels que les artères musculaires et élastiques, sont composés de trois couches structurales ou tuniques (Figure 2, Tableau 1) (**Bou-Gharios et al. 2004**). La couche la plus proche de la lumière du vaisseau est l'intima qui se compose d'une monocouche de cellules endothéliales disposées longitudinalement en contact avec le sang circulant, d'une membrane basale et d'un sous-endothélium. La couche médiane, la média, comprend des cellules musculaires lisses (CML) disposées circonférentiellement et entourées d'une matrice extracellulaire (MEC) riche en collagènes, fibres élastiques et protéoglycanes. La proportion de CML et de fibres élastiques est variable et va définir les artères élastiques et les artères musculaires. La couche la plus externe, l'adventice, est composée essentiellement de fibroblastes arrangés longitudinalement dans une MEC contenant des fibres de collagène et élastiques. Les lames élastiques qui séparent l'intima de la média et la média de l'adventice sont respectivement la lame élastique interne (LEI) et externe (LEE).

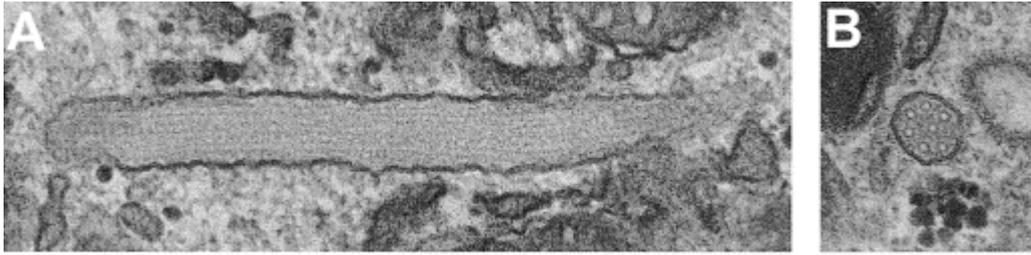


Figure 3 : Photographie de microscopie électronique à transmission d'un corps de Weibel-Palade d'une cellule endothéliale en section longitudinale (A) et transversale (B) (Hannah et al. 2002). Les corps de Weibel-Palade mesurent 0.1 μm de large et jusqu'à 3 μm de long et sont délimités par une membrane épaisse de 60 à 80 Å. Des tubes cylindriques de 150 à 200 Å de diamètre, parallèles à l'axe longitudinal, sont visibles à l'intérieur des granules.

Contenu	Fonction
FW	Hémostase
P-sélectine	Hémostase et inflammation
Endothéline-1	Vasoconstriction
CD63/lamp3	Adhésion et migration cellulaire
Interleukine-8	Inflammation
α 1,3-Fucosyltransférase VI	Glycosylation
Activateur tissulaire du plasminogène (t-PA)	Fibrinolyse
Eotaxine-3	Inflammation
Angiopoïétine-2	Angiogenèse
Ostéoprotégérine	Inflammation osseuse (ostéoclastogénèse)

Tableau 2 : Protéines stockées dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et fonctions principales.

1.2. Composition d'une artère saine

1.2.1. Les cellules endothéliales

a) Origine et structure

Les cellules endothéliales dérivent de l'hémangioblaste, un précurseur également à l'origine de la lignée hématopoïétique. Ce sont des cellules aplaties dont le renouvellement est très lent, sauf au niveau des orifices vasculaires et des bifurcations, où les forces hémodynamiques de cisaillement à la paroi sont importantes et où leur prolifération est plus grande. Elles sont polarisées : ancrées sur une membrane basale (collagène de type IV, des laminines, du nidogène/entactine et des protéoglycanes sulfatés) et en contact avec le sang circulant au niveau apical.

Les cellules endothéliales ont comme particularité de contenir des corps de Weibel-Palade (WP) qui sont des granules endothéliaux de stockage issus de l'appareil de Golgi, mesurant 0.1 μm de large et jusqu'à 3 μm de long et délimités par une membrane de 60 à 80 Å. Des tubes cylindriques de 150 à 200 Å de diamètre, parallèles à l'axe longitudinal, sont visibles à l'intérieur des granules et sont formés par l'empaquetage des multimères de haut poids moléculaires de facteur Willebrand (FW) (Figure 3). L'exocytose des corps de WP libère localement des protéines et médiateurs ayant des fonctions très diverses dans l'hémostase, l'inflammation et l'angiogenèse (Tableau 2).

Le FW, protéine multimérique pouvant atteindre jusqu'à 20 000 kDa formée de l'assemblage de dimères, est le composant majoritaire de ces granules. Le monomère est constitué de plusieurs domaines fonctionnels (Figure 4) (**Sadler 1998**). Le domaine D3 lie le facteur VIII, le domaine A1 permet la liaison à la sous-unité GPIb α du complexe GPIb-V-IX (voir paragraphe 2.2.1.). Le collagène VI interagit avec les domaines A1 et A3 et les collagènes I, III et IV avec le domaine A3 principalement (**Denis et al. 1993; Hoylaerts et al. 1997**). A l'extrémité N-terminale, au sein du domaine C1 se situe un motif RGD permettant la liaison aux intégrines β_3 ($\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$). Un site de clivage pour la métalloprotéinase ADAMTS-13 (*ADAMTS-13*) est situé sur le domaine A2. Le FW est synthétisé par la cellule endothéliale et par le mégacaryocyte. Il est présent dans les granules α des plaquettes sous forme de multimères de haut poids moléculaire

(20 000 kDa). Le FW plasmatique (5 à 10 µg/ml) pourrait provenir des multimères de haut poids moléculaire libérés par les corps de WP et par les plaquettes et clivés par une métalloprotéase plasmatique, ADAMTS-13. Lors d'une brèche vasculaire, ce FW est capturé à partir du plasma par les collagènes I, III, IV et VI (Hoylaerts et al. 1997; Pareti et al. 1987). Dans la cellule endothéliale en culture, la majeure partie du FW synthétisé est sécrétée constitutivement (95%) sous la forme de multimères de bas poids moléculaire alors qu'une faible partie est stockée dans les corps de WP sous la forme de multimères de haut poids moléculaire (5%). La proportion sécrétée vers le plasma et vers la matrice sous-endothéliale, sans stimulation, dépend des conditions de culture et du support cellulaire (van Mourik et al. 2002). Des études de microscopie électronique et d'immunofluorescence ont montré sa présence *in situ* dans le sous-endothélium de vaisseaux humains sains (Rand et al. 1980) et son exposition après désendothélialisation (Baruch et al. 1991).

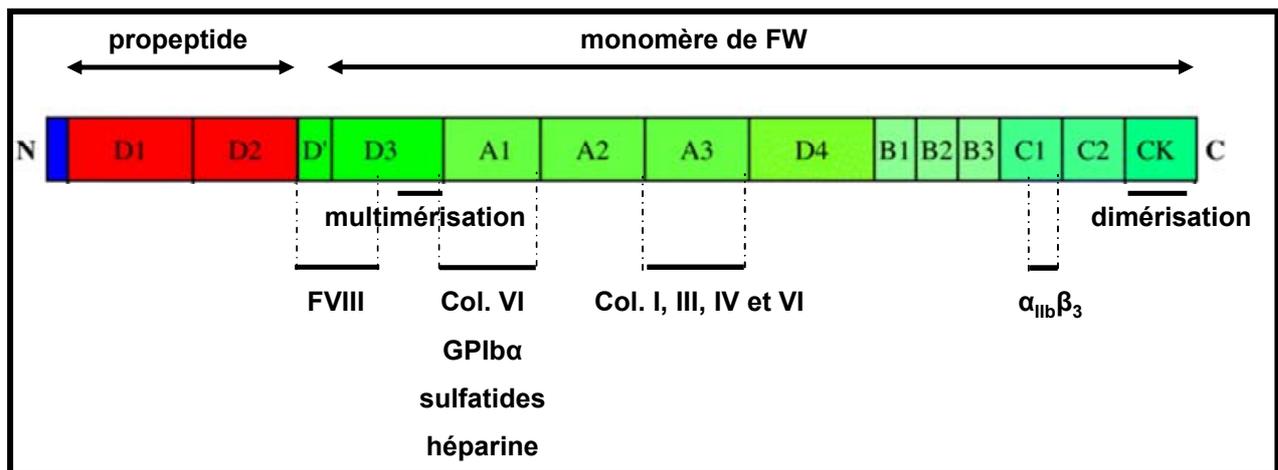


Figure 4 : Représentation schématique des différents domaines structuraux du facteur Willebrand. Col. : : collagène.

La P-sélectine est une protéine transmembranaire de type I de la famille des sélectines localisée dans les granules α des plaquettes et les corps de WP des cellules endothéliales (Andre 2004). Elle est constituée par un domaine lectine calcium-dépendant en N-terminal suivi d'un motif de type EGF (*epidermal growth factor*), d'éléments répétés, d'un domaine transmembranaire et d'une extrémité C-terminale cytoplasmique. La P-sélectine interagit avec le ligand PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) des leucocytes mais également avec la GPIb α des plaquettes (Mayadas et al. 1993).

b) Endothélium « quiescent » ou activé

L'endothélium participe à de nombreux processus homéostatiques comme le contrôle du tonus vasculaire, le trafic cellulaire et de nutriments au travers du vaisseau, le maintien d'une circulation sanguine fluide, la régulation de la perméabilité vasculaire et la vasculogénèse. Ces grandes fonctions ainsi que le profil d'expression génique des cellules endothéliales varient selon la localisation dans l'arbre vasculaire et le moment et reflètent la capacité de l'endothélium à répondre aux besoins ponctuels des tissus environnants. Dans la suite de ce chapitre, seul le rôle de l'endothélium dans l'hémostase sera traité. Le terme de cellules endothéliales quiescentes est utilisé pour les différencier de celles activées lors de stimuli physiologiques ou pathologiques. Cette activation n'est pas un processus du type tout ou rien mais comprend un éventail de réponses. Selon cette classification, les cellules dites « quiescentes » ne sont pas strictement inactives et expriment des phénotypes antiadhésif, anticoagulant et vasodilatateur (Figure 5), tandis que l'endothélium activé présente des propriétés proadhésive, procoagulante et vasoconstrictrice (**Aird 2005**) (Figure 6).

c) Cellules endothéliales « quiescentes » : présentation d'une surface non thrombogène

Dans des conditions non pathologiques, la surface luminale d'un endothélium au repos inhibe l'adhésion et l'activation des plaquettes et présente des propriétés anticoagulante, vasodilatatrice et fibrinolytique (Figure 5).

Les cellules endothéliales sécrètent des substances telles que le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline et des ecto-nucléotidases qui empêchent l'activation plaquettaire. Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine par la NO synthase endothéliale (eNOS), dont l'expression constitutive assure un faible taux basal. Une fois généré, le NO peut diffuser vers les CML et induire la dilatation du vaisseau (**Furchgott and Zawadzki 1980**) et empêcherait aussi l'exocytose des corps WP (**Lowenstein et al. 2005**).

La production de prostacycline (PGI₂) à partir de l'acide arachidonique par action de la cyclooxygénase de type 2 (Cox-2) et de la prostacycline synthétase, va provoquer la relaxation des CML. Dans la plupart des vaisseaux sanguins, la contribution de la PGI₂ à la relaxation des CML est négligeable par rapport à l'effet du NO (**Moncada and Vane 1979**). Présents localement sur la face luminale des cellules endothéliales, la PGI₂, par liaison au récepteur plaquettaire IP, et le NO inhibent efficacement la capacité des plaquettes à s'activer

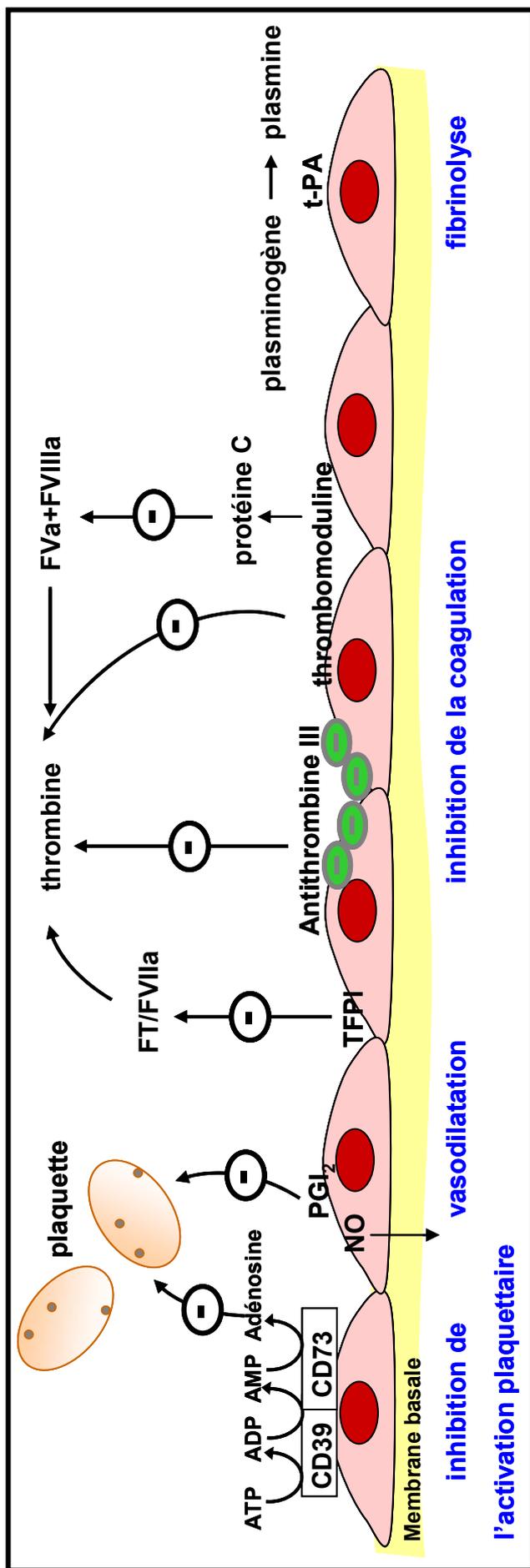


Figure 5 : Les cellules endothéliales quiescentes inhibent l'activation des plaquettes, la coagulation et activent la fibrinolyse. FT : facteur tissulaire ; PGI₂ : prostacycline ; TFPI : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire ; tPA : activateur naturel du plasminogène.

et agréger. Le NO est aussi un inhibiteur efficace de l'adhésion plaquettaire sur une surface **(Pearson 1999)**.

L'ADP et l'ATP sont des agonistes plaquettaires sécrétés par les plaquettes activées par des agonistes forts (thrombine, collagène) et libérés par les cellules endothéliales lésées et par les globules rouges endommagés. L'ADP et l'ATP activent les récepteurs plaquettaires purinergiques de type 2 (P2) P2Y₁, P2Y₁₂ et P2X₁ (voir paragraphe 2.3.1.) et des récepteurs purinergiques endothéliaux P2Y₁ et P2Y₂ initiant notamment la synthèse de NO et de PGI₂ **(Gachet 2006)**. Des ecto-nucléotidases présentes à la surface luminale des cellules endothéliales au repos contribuent à limiter l'activation et l'agrégation plaquettaire en hydrolysant l'ADP et l'ATP extracellulaires. La famille des ecto-nucléosides triphosphates diphosphohydrolases (NTPDases) comprend le CD39 et une ecto-5'-nucléotidase, CD73 qui sont exprimées majoritairement par les cellules endothéliales. Elles déphosphorylent séquentiellement l'ATP en ADP et l'ADP en AMP et adénosine qui est un inhibiteur de l'activation des plaquettes **(Atkinson et al. 2006)**.

Des protéoglycanes présents à la surface endothéliale, dont des chaînes d'héparan sulfate, forment le glycocalyx et sont capables de lier l'antithrombine III, principal inhibiteur de la thrombine. Les cellules endothéliales synthétisent et expriment aussi à leurs surfaces la thrombomoduline (TM) une protéine transmembranaire qui se lie à la thrombine avec une haute affinité. Cette liaison altère la spécificité de la thrombine inhibant l'interaction de la thrombine avec les récepteurs à la thrombine (PARs) et le fibrinogène via l'exosite I de la thrombine. Le complexe TM-thrombine permet aussi l'activation optimale de la protéine C qui protéolyse les cofacteurs Va et VIIIa indispensables à l'amplification de la génération de thrombine **(Weiler and Isermann 2003)**. Le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) amplifierait l'activation de la protéine C en présence du complexe TM-thrombine **(Stearns-Kurosawa et al. 1996)**. L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), attaché à la surface de l'endothélium par un glycosylphosphatidylinositol, inhibe le complexe facteur tissulaire/FVIIa qui initie la génération de thrombine.

L'endothélium participe aussi à la fibrinolyse en libérant de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) permettant la transformation du plasminogène en plasmine capable d'hydrolyser la fibrine **(Huber et al. 2002)**.

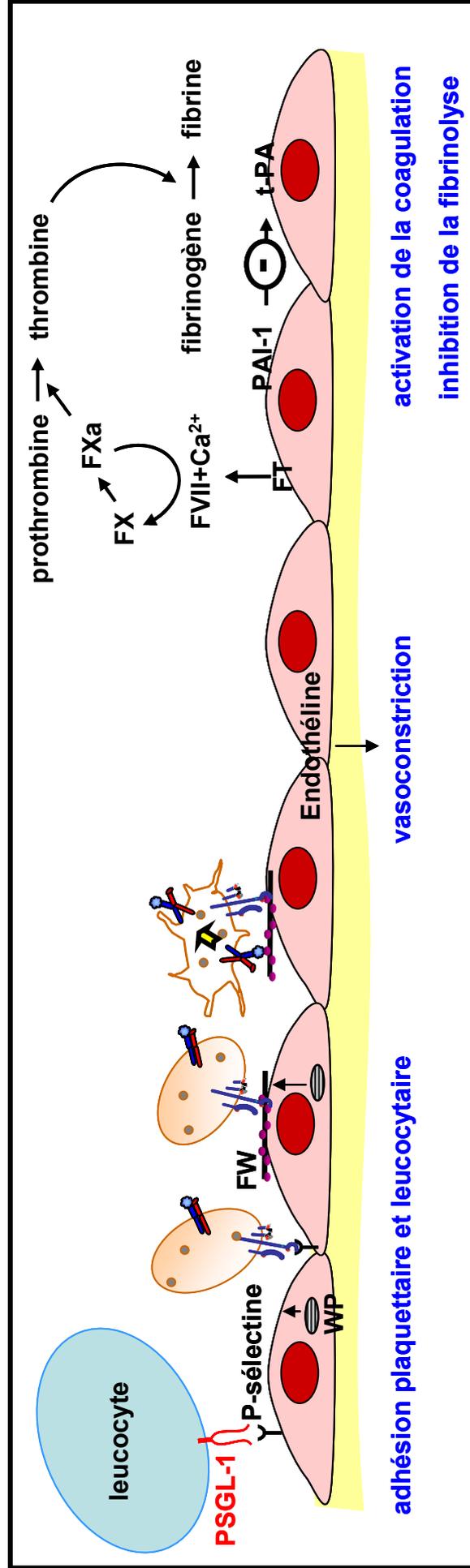


Figure 6 : Les cellules endothéliales activées favorisent l'adhésion plaquettaire, inhibent la coagulation, inhibent la fibrinolyse et participent à une réponse contractile du vaisseau. FW : facteur Willebrand ; PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor type 1* ; tPA : activateur naturel du plasminogène.

d) Cellules endothéliales activées

La stimulation des cellules endothéliales peut favoriser l'adhésion plaquettaire, la coagulation, inhiber la fibrinolyse et participer à une réponse contractile du vaisseau (Figure 6). Dans les artères, la seule activation des cellules sans rupture du tapis endothélial est insuffisante pour déclencher une thrombose et permettre la croissance d'un thrombus mais pourrait plutôt participer à un état prothrombotique dans l'inflammation ou le développement de tumeurs (**Esmon 2000**).

La stimulation des cellules endothéliales, suite à une agression (hypoxie, ischémie, radiations, trauma), par des agonistes (ADP, ATP, adrénaline, sérotonine, histamine), par des protéines (thrombine, fibrine, voie du complément, VEGF) ou par des messagers lipidiques (céramides, shingosine-1 phosphate, LDL oxydés), aboutit à l'exocytose des corps de WP (**Lowenstein et al. 2005**). C'est une réponse rapide qui permet de rendre immédiatement disponible des composés bioactifs comme le FW et la P-sélectine.

L'adhésion des plaquettes au FW nécessite l'intervention séquentielle de deux récepteurs, la GPIb α appartenant au complexe GPIb-V-IX et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (voir paragraphe 2.2.).

La P-sélectine induit le roulement des plaquettes et des leucocytes sur l'endothélium de veinules mésentériques activées par un ionophore calcique (A23187) qui induit la libération du contenu des corps de WP (**Frenette et al. 1995; Mayadas et al. 1993**). Les plaquettes expriment deux ligands connus pour la P-sélectine : la GPIb α et le PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) (**Frenette et al. 2000; Romo et al. 1999**).

Lors de l'activation de l'endothélium, ses capacités à produire de la thrombine sont augmentées.

Le facteur tissulaire (FT) est une glycoprotéine transmembranaire dont la partie extracellulaire est formée de deux domaines de type III fibronectine. Les cellules endothéliales non activées n'expriment pas le FT. Après exposition à la thrombine, au TNF (*tumor necrosis factor*), aux cytokines ou au lipopolysaccharide (LPS), des cellules endothéliales en culture synthétisent et expriment le FT à leur surface (**Mackman 1997; Nawroth and Stern 1986**). L'expression de FT *in vivo* par l'endothélium a été rarement observée. Dans un modèle de choc septique chez le singe, l'expression de FT est détectée sur les cellules endothéliales de la microcirculation de la rate (**Drake et al. 1993**). Chez l'homme, le FT est exprimé par les cellules endothéliales de vaisseaux présents dans les tumeurs de

patients atteints d'un cancer du sein (**Contrino et al. 1996**). Les cellules endothéliales activées synthétisent également d'autres acteurs de la coagulation (facteur V, récepteur du facteur IX/IXa, récepteur du facteur Xa, protéine S et son récepteur, α_2 -macroglobuline). Parallèlement l'expression de protéines à propriétés anticoagulantes, TM et EPCR, est diminuée (**Esmon 1999**).

L'activation de l'endothélium par des cytokines *in vitro* (LPS, Il-1, TNF ou TGF β) et *in vivo* (LPS) entraîne d'autre part une inhibition du système de la fibrinolyse (**Esmon 2000; Pearson 1999**).

Les cellules endothéliales activées peuvent participer à une réponse contractile essentiellement exercée par l'endothéline. C'est un peptide de 21 acides aminés, synthétisé principalement par les cellules endothéliales sous deux formes (endothéline-1 majoritaire et -2), sécrété sous sa forme active de façon polarisée vers la membrane basale et stocké dans les corps de WP. Elle agit sur les CML à travers deux récepteurs : ETA dans les artères et ETB dans les veines (**Giannessi et al. 2001**).

1.2.2. Les cellules musculaires lisses et les fibroblastes vasculaires

Localisées dans la média, les CML sont des cellules mononuclées, allongées (25-50 μm de long, 5 μm de diamètre). Elles peuvent présenter soit un phénotype sécrétoire et synthétiser des macromolécules de la MEC, soit un phénotype contractile où prédomine le matériel myofilamentaire. Les CML des artères saines présentent majoritairement un phénotype contractile, sont incapables de migrer et possèdent une capacité de prolifération et de sécrétion extrêmement faible. Elles contrôlent le tonus vasomoteur en répondant directement à divers neuromédiateurs ou hormones (adrénaline, acétylcholine, noradrénaline, vasopressine, système rénine-angiotensine-aldostérone, bradykinine, histamine, sérotonine, prostaglandines) ou indirectement par l'intermédiaire de la cellule endothéliale qui synthétise et libère des facteurs relaxants (NO, PGI₂) ou contractants (endothéline-1) (**Bou-Gharios et al. 2004**). A l'état, les propriétés pro- ou anti-thrombotiques des CML semblent très limitées. Par contre, les CML stimulées par des médiateurs (facteurs de croissance, cytokines) expriment le FT à leur surface (**Mackman 1997**). Dans des modèles de lésion artérielle chez l'animal, le FT est rapidement synthétisé et exprimé par les CML nouvellement synthétisées (**Harker et al. 1996; Marmur et al. 1993; Speidel et al. 1995**).

Localisés dans l'adventice, les fibroblastes sont des cellules fusiformes ou étoilées possédant de longs prolongements cytoplasmiques. Ils synthétisent les macromolécules protéiques et polysaccharidiques de la MEC. Ils sont aussi capables de sécréter de nombreuses autres molécules (cytokines, facteurs de croissance, enzymes) et jouent un rôle important dans les processus de réparation tissulaire ou dans l'entretien des réactions inflammatoires. Des analyses d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* ont démontré que l'antigène et l'ARNm du FT étaient présents en grande quantité dans les fibroblastes de l'adventice de nombreuses artères humaines (**Drake et al. 1989; Wilcox et al. 1989**).

1.2.3. La matrice extracellulaire

Les constituants majeurs de la paroi vasculaire sont les composants extracellulaires, formant la matrice (MEC) qui entoure les CML de la média et les fibroblastes de l'adventice. La composition de la MEC n'est pas unique mais varie en fonction des territoires vasculaires, évolue au cours du développement et lors du vieillissement et lors du développement de pathologies vasculaires (**Hungerford and Little 1999**). Ces composants ont des fonctions multiples en dehors du territoire vasculaire aussi ce chapitre n'est-il consacré qu'à la description des formes vasculaires de ces composants et à leurs rôles dans l'hémostase (Tableau 3).

Quatre grandes familles de composants sont rencontrées dans la MEC : les collagènes, les fibres élastiques, les glycoprotéines de structure et les protéoglycanes. D'autres composants, tels que des microfibrilles (en majorité des fibrillines) et un abondant matériel amorphe ou soluble comme les protéoglycanes et de petites glycoprotéines riches en leucine, sont présents dans les espaces extracellulaires de la paroi vasculaire. Le matériel extracellulaire de la média, incluant les fibres élastiques et de collagènes, est produit par les CML lors du développement embryonnaire. Dans l'adventice, le collagène est synthétisé et sécrété par les fibroblastes (**Bou-Gharios et al. 2004**).

Protéines adhésives	Localisation	Récepteur plaquettaire
FW	Endothélium et sous-endothélium	GP1b α $\alpha_{11b}\beta_3$ $\alpha_v\beta_3$
P-sélectine	Endothélium	GP1b α PSGL-1
Collagènes I	MEC de la média et de l'adventice	GPVI, $\alpha_2\beta_1$
III	Sous-endothélium et MEC de la média	GPVI, $\alpha_2\beta_1$ $\alpha_2\beta_1$
IV	Membrane basale de l'endothélium et des CML de la média	$\alpha_2\beta_1$
VI	Sous-endothélium	$\alpha_{11b}\beta_3$
Fibronectine	MEC de la média et de l'adventice	$\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$
Laminines	MEC de la média et de l'adventice	$\alpha_6\beta_1$, GPVI
Thrombospondine-1	MEC de la média et de l'adventice	?

Tableau 3 : Principales protéines d'adhésion présentes dans la paroi vasculaire et leurs récepteurs plaquettaires respectifs.

a) Les collagènes

Le collagène est constitué d'une répétition de motifs GXY, où X est souvent une proline (P) et Y souvent une hydroxyproline (O). Ces répétitions forment une hélice gauche qui par association avec deux autres hélices constituent une triple superhélice droite. Les superhélices se réassocient entre elles par leur extrémité N- et C-terminales pour former des fibrilles de collagène (Ottani et al. 2002). Plus de vingt cinq types de collagènes, combinaisons précises de chaînes polypeptidiques α (1, 2 et 3) produits de gènes différents, sont connus à ce jour. Schématiquement, on peut distinguer les collagènes formant des fibrilles à striation périodique (I-III, V, XI, XXIV et XXVII), formant des filaments sans striation périodique (VI), non fibrillaires formant des feuilletts (IV, VIII, X), transmembranaires (XIII, XVII) ou formant des fibrilles d'ancrage de certains épithéliums (VII) et les collagènes FACITs (*Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helix*) présentant des interruptions de triple hélice (IX, XII, XIV, XV XVI, XVIII, XIX). Dans la

paroi vasculaire, on trouve des collagènes fibrillaires de type I, III et V, les collagènes non-fibrillaires IV, VI et VIII et des FACITS XII à XV (**Exposito et al. 2002; Siljander and Farndale 2002**). Les collagènes I et III sont les plus abondants au niveau vasculaire et le collagène IV (majoritairement) et VI sont localisés au niveau des membranes basales. Les autres types de collagènes trouvés dans la paroi sont minoritaires ou uniquement sécrétés par des cellules endothéliales en culture (**Exposito et al. 2002; Legrand et al. 1979**).

Des études d'immunofluorescence ont localisé le collagène de type III au niveau de la matrice sous-endothéliale et dans la média tandis que le collagène de type I a été trouvé dans la média et l'adventice mais pas dans le sous-endothélium (**Gay et al. 1975; Legrand et al. 1979; Madri et al. 1980**). Le collagène de type I est composé de deux chaînes $\alpha 1(I)$ et d'une chaîne $\alpha 2(I)$ tandis que le collagène de type III est constitué d'un homotrimère de chaînes $\alpha 1(III)$. Chaque chaîne de collagènes I et III possède un domaine en triple hélice d'environ 1 000 acides aminés encadré par des télépeptides. En microscopie électronique, l'aspect en bandes avec une périodicité de 67 nm est la conséquence de la superposition des triples hélices (Figure 7).

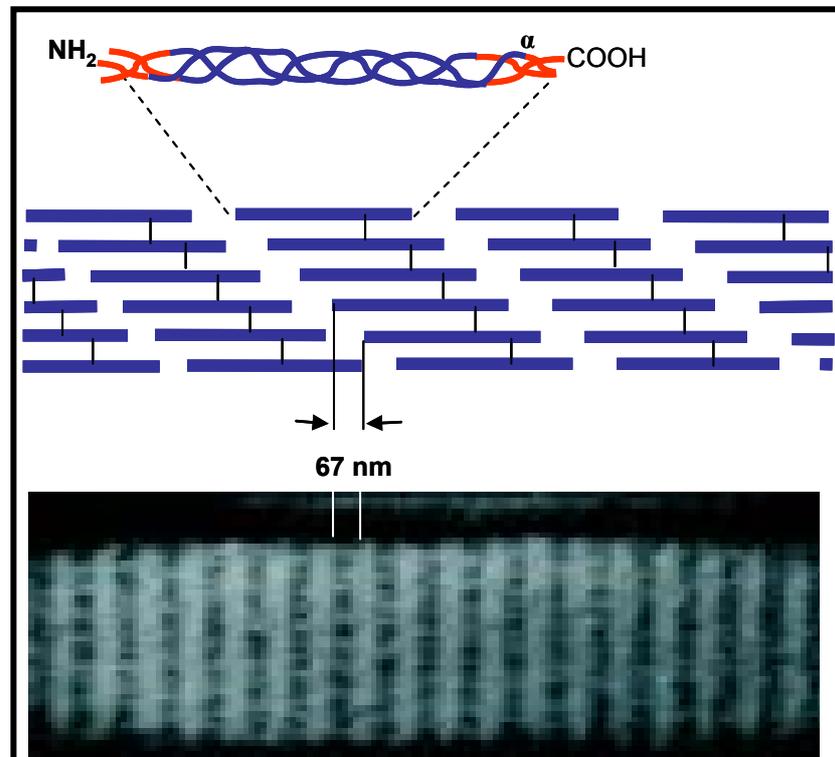


Figure 7 : Représentation schématique et image de microscopie électronique des collagènes fibrillaires de type I et III. Les chaînes polypeptidiques α s'organisent en triple hélice formant la molécule de collagène. Les molécules de collagène s'organisent en fibrilles avec une périodicité de 67 nm.

Ces collagènes vont permettre l'adhésion stable et sont de puissants agents agrégants des plaquettes. Les plaquettes possèdent plusieurs glycoprotéines de surface susceptibles de s'y lier, dont la GPVI et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, qui jouent un rôle fonctionnel important (voir paragraphe 2.2.3.). Les séquences GPO et GFOGER des collagènes sont nécessaires pour la liaison au récepteur GPVI et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ respectivement. La séquence GPO représente environ 10% des collagènes I et III. Des peptides en triple hélice contenant la séquence GPO (*collagen-related peptide*, CRP) sont des puissants agonistes plaquettaire via leur interaction avec la GPVI (**Barnes et al. 1996; Farndale et al. 2004**). Ainsi la reconnaissance des collagènes par les récepteurs plaquettaire dépend de la séquence primaire de ces collagènes. La structure fibrillaire est requise pour une activation efficace des plaquettes et la dénaturation en simple polypeptides empêche la liaison à ces récepteurs malgré une séquence peptidique conservée (**Morton et al. 1994**). La superposition des triples hélices de collagènes est également nécessaire pour l'activation des plaquettes. Des collagènes digérés par la pepsine, qui clive les télépeptides empêchant la formation de fibrilles, ou par le bromure de cyanogène supportent l'adhésion mais pas l'activation plaquettaire (**Savage et al. 1999; Siljander and Lassila 1999**). La structure fibrillaire du collagène pourrait en induisant le regroupement (clustering) de récepteurs à la surface plaquettaire augmenter l'activation plaquettaire.

D'autre part, les collagènes fibrillaires induisent l'exposition des phospholipides chargés négativement à la surface des plaquettes permettant l'assemblage des complexes de la coagulation et la génération de thrombine (**Heemskerk et al. 2000; Hemker et al. 1983**).

Le collagène de type IV ne forme pas de structure visible en microscopie électronique et ne peut être localisé que par immunomarquage. Il est localisé au niveau des membranes basales des cellules endothéliales et entoure les CML de la média (**Hudson et al. 2003**). Il est composé de segments en triple hélice gauche séparés par des domaines globulaires, le domaine 7S à l'extrémité N-terminale et le domaine NC1 à l'extrémité C-terminale. La polymérisation de monomères de collagène IV conduit à la formation d'un feuillet structurant la membrane basale (Figure 8).

Une matrice de collagène IV, en conditions de flux élevés ($1\ 500\ s^{-1}$) et en présence de Mg^{2+} , permet l'adhésion des plaquettes par liaison de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (**Henrita van Zanten et al. 1996; Parsons et al. 1986; Saelman et al. 1994; Staatz et al. 1989**).

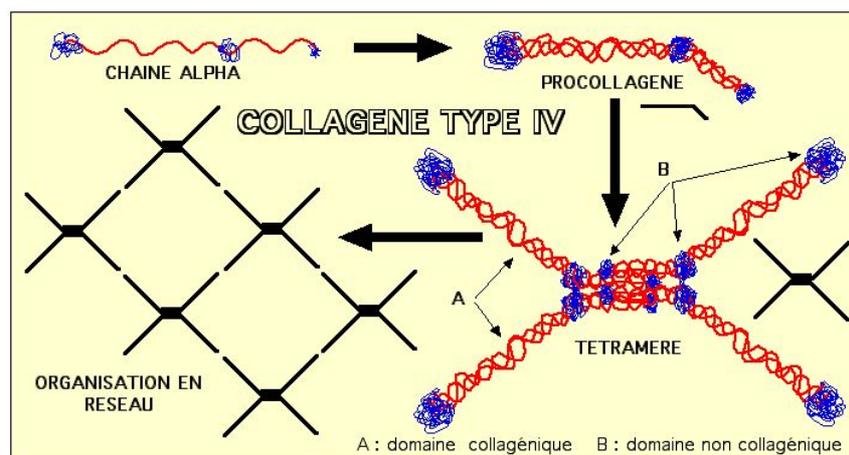


Figure 8 : Structure du collagène IV. Les monomères de collagène de type IV s'associent en trimères (procollagène) en liant leurs domaines NC1. La liaison des domaines 7S de quatre protomères en leur extrémité N terminale et des domaines NC1 de deux protomères en leur extrémité C terminale crée un feuillet structurant la membrane basale.

Le collagène VI est colocalisé avec le FW et le collagène IV au niveau du sous-endothélium vasculaire (Kuo et al. 1997; Rand et al. 1993; Wu et al. 1996). La molécule de collagène VI est composée d'une courte triple hélice de 105 nm contenant des séquences RGD avec des domaines globulaires à chaque extrémité, homologues aux domaines A du FW. Elle forme des filaments qui sont des assemblages tétramériques stabilisés par des ponts disulfures. *In vitro*, le collagène VI permet l'adhésion des plaquettes par liaison à l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (Ross et al. 1995; Saelman et al. 1994). Cette adhésion et la formation de thrombi en conditions de flux faibles (100 s^{-1}) sont complètement abolies par un anticorps dirigé contre l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Les plaquettes de patients atteints d'une forme sévère de la maladie de Willebrand (type II) adhèrent peu sur une matrice de collagène VI suggérant un rôle possible du FW dans l'adhésion plaquettaire à ce collagène (Ross et al. 1995).

b) Les fibres élastiques

Les fibres élastiques sont constituées par un cœur insoluble et amorphe composé à 90% d'élastine et en périphérie par une maille de microfibrilles de 10 à 12 nm de diamètre constituées de glycoprotéines comme la fibrilline (Rosenbloom et al. 1993). L'élastine est responsable des propriétés élastiques de ces fibres. Les fibres élastiques de la média sont disposées parallèlement aux CML et par conséquent sont placées circonférentiellement au vaisseau. Elles varient en épaisseur, longueur et en organisation tridimensionnelle selon la

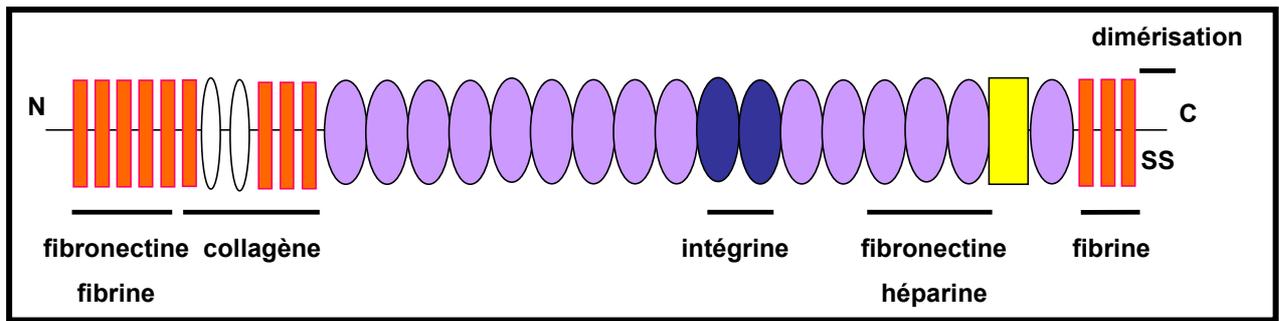


Figure 9 : Structure de la fibronectine constituée de domaines de type I (orange), II (blanc) et III (violet). Les sites de liaison pour d'autres protéines adhésives sont représentés.

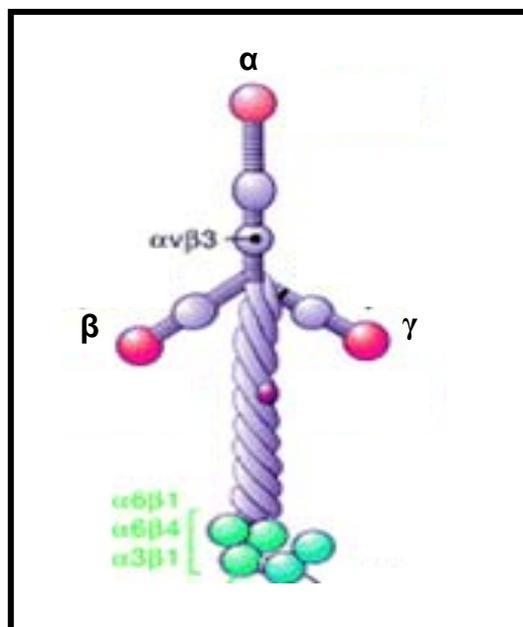


Figure 10 : Structure des laminines 10 et 11 constituées de trois chaînes α, β et γ (d'après Miner, 2004). Le site de liaison pour les intégrines de la famille α₆ se situe en Ct de la chaîne α.

direction et l'amplitude des forces exercées sur le tissu. Les fibres élastiques sont moins abondantes dans l'adventice. Aucune interaction de ces fibres avec les plaquettes n'a été jusqu'à présent décrite.

c) Les glycoprotéines de structure

Les principales glycoprotéines de structure de la MEC entourant les CML de la média et les fibroblastes de l'adventice sont les fibronectines, les laminines, les thrombospondines, les ténascines et l'ostéopontine. Ces protéines sont caractérisées par des séquences qui leur permettent de s'auto-associer, de s'associer à d'autres protéines de la matrice, ou d'interagir avec les cellules.

La fibronectine (FN) est une glycoprotéine homodimérique qui existe sous forme soluble circulante dans le sang, sous forme polymérisée et insoluble dans la MEC, ou sous les deux formes dans les granules α des plaquettes. Chaque monomère contient trois types de modules répétés dont l'assemblage diffère selon qu'il s'agisse de la FN soluble ou associée à la MEC. Chaque monomère porte des sites d'interaction avec la fibrine, l'héparine et les collagènes et vers le milieu de la molécule un domaine de liaison aux intégrines plaquettaires ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$) portant le motif RGD (Figure 9). L'adhésion des plaquettes à la FN est moins efficace et moins stable que l'adhésion au FW et au collagène. Les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ assurent l'adhésion des plaquettes sur une matrice de FN en conditions statiques mais la formation de lamellipodes et la mobilisation de calcium intracellulaire nécessitent la liaison à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Cho and Mosher 2006; McCarty et al. 2004). L'absence de FN plasmatique chez des souris induit une diminution de la thrombose artérielle et de la stabilité des thrombi (Matuskova et al. 2006; Ni et al. 2003b). La contribution de la FN de la paroi vasculaire dans la thrombose n'a pas été évaluée *in vivo*.

Les laminines (LN) sont les constituants majoritaires des membranes basales où elles sont assemblées en polymères et interagissent avec différentes protéines de la MEC (collagène IV, nidogène 1, héparan-sulfate protéoglycanes) (Tunggal et al. 2000). Ce sont des glycoprotéines hétérotrimériques d'environ 800 kDa, constituées des chaînes α , β et γ (Figure 10) (Miner and Yurchenco 2004). La famille des LN est composée d'au moins 12 membres. A côté de la famille des LN, on peut décrire la famille des nétrines dont les membres sont structurellement très proches des chaînes γ des LN. Il y a peu de données

concernant l'interaction des LN avec les plaquettes. Selon certaines études, les LN permettent l'adhésion des plaquettes via l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ mais pas leur activation (**Ill et al. 1984; Nigatu et al. 2006; Poole and Watson 1995**). D'autres études suggèrent que les LN permettent l'adhésion via l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ et l'activation des plaquettes via GPVI et $\alpha_6\beta_1$ (**Hindriks et al. 1992; Inoue et al. 2006**). Les différences entre ces observations pourraient provenir de l'origine et de la pureté des laminines (**Inoue et al. 2006**).

Les thrombospondines (TSP) sont peu abondantes chez l'animal adulte et sain, sauf dans les tissus à renouvellement permanent comme l'os, et sont surtout exprimées durant le développement et en réponse à une lésion (**Adams and Lawler 2004; Bornstein 2001**). Ces protéines sont des glycoprotéines trimériques dont plusieurs sous-types ont été caractérisés (TSP-1 à -5). La thrombospondine 1 a été identifiée en premier comme un composant majeur des granules α des plaquettes, libéré lors de l'activation par la thrombine et s'associant à la surface plaquettaire (*thrombin-sensitive protein*, TSP). La TSP-1 est aussi synthétisée, sécrétée et incorporée à la MEC par les macrophages, les CML vasculaires et les cellules endothéliales. Elle interagit avec de nombreuses protéines du plasma comme le fibrinogène, le plasminogène, les protéines structurantes de la MEC comme les collagènes, le FW, la fibronectine et les laminines. L'extrémité C-terminale de chaque monomère de TSP-1 est suivie d'un site de polymérisation puis on retrouve des modules permettant la fixation aux protéines du plasma ou de la MEC. L'extrémité N-terminale est un domaine globulaire de type lectine (Figure 11) (**Annis et al. 2006**). De nombreux récepteurs, incluant CD36 (GPIV), GPIIb α , $\alpha_2\beta_1$, α IIB β 3, α v β 3 et l'héparan sulfate, ont été proposés pour lier cette glycoprotéine. Des études *in vitro* suggèrent que la TSP-1 potentialiserait l'activation plaquettaire et stabiliserait les agrégats (**Bonnefoy et al. 2001; Legrand et al. 1994**). Les souris déficientes en TSP-1 (Tsp1^{-/-}) ont une agrégation plaquettaire normale en réponse à différents agonistes et un temps de formation d'un premier thrombus semblable aux souris contrôles dans des modèles de thrombose (modèles de lésion photoinduite ou d'endothélium activé). Cependant, on observe une diminution de la stabilité des thrombi formés chez les souris Tsp1^{-/-} par rapport aux souris contrôles, défaut qui est corrigé par l'injection de TSP-1 soluble. La TSP-1 lierait le domaine A3 du FW et empêcherait le clivage des multimères de FW par ADAMTS13 (**Bonnefoy et al. 2006**). Néanmoins, les rôles respectifs de la TSP-1 constituant la MEC de la paroi et de celle sécrétée par les plaquettes n'ont pas été évalués dans cette étude.

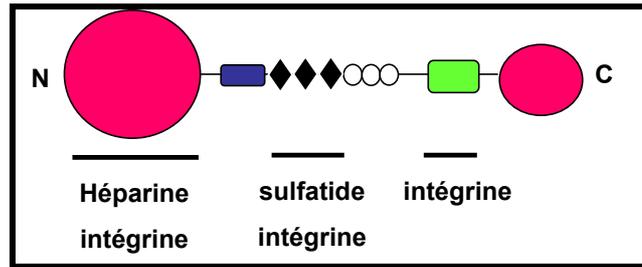


Figure 11 : Structure de la thrombospondine-1 (d'après Adams, 2004).

La TSP-2, abondante dans les mégacaryocytes, joue un rôle dans la production des plaquettes à partir des mégacaryocytes, thrombopoïèse. Les souris déficientes pour TSP-2 présentent des défauts d'organisation des fibres de collagènes dans la paroi vasculaire (Kyriakides et al. 1999).

Les ténascines sont des glycoprotéines exprimées au cours du développement embryonnaire des neurones, du squelette et du système cardiovasculaire et lors de réparations tissulaires et de pathologies notamment cardiovasculaires et tumorales. L'ostéopontine est une glycoprotéine phosphorylée composant majeur de la formation osseuse. En cas d'inflammation et de remodelage tissulaire, notamment dans le cas de l'athérosclérose, elle est associée aux calcifications des lésions vasculaires. Aucune interaction de ces glycoprotéines avec les plaquettes n'a été jusqu'à présent décrite.

d) Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PG) sont constitués d'une chaîne protéique sur laquelle sont attachés un ou plusieurs glycosaminoglycanes (GAG). Les chaînes GAG sont des polymères de disaccharides portant des carboxylates ou des sulfates. Les PG peuvent être identifiés par le type prédominant de GAG qu'ils portent : chondroïtine sulfate PG (CS-PG), héparane sulfate PG (HS-PG), dermatane-sulfate (DS-PG) ou kératane sulfate-PG (KS-PG). Dans les vaisseaux sanguins, les PG permettent la fixation des cellules à la MEC, la fixation de cytokines, le contrôle de la coagulation et la modulation de l'angiogenèse (Iozzo 1998). L'héparane sulfate, dont la structure est proche de celle de l'héparine, est un puissant activateur de l'antithrombine. Le dermatane sulfate active le cofacteur II de l'héparine, régulant aussi l'activité de la thrombine (Boneu and Cazenave 1997).

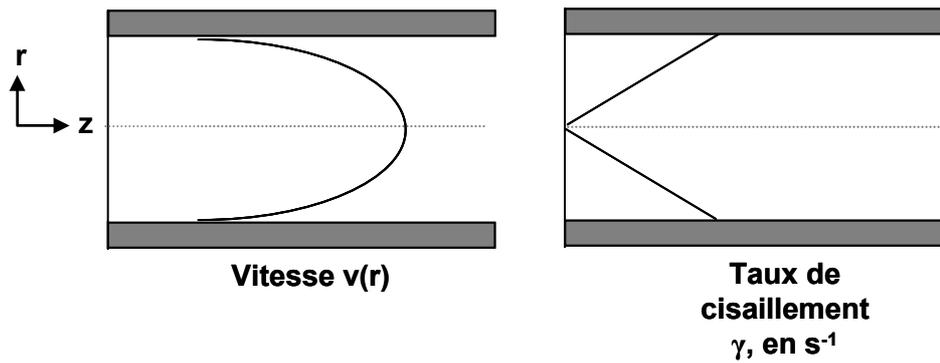


Figure 12 : Représentation schématique de la vitesse et du taux de cisaillement d'un liquide newtonien. La représentation graphique de la vitesse du flux est une parabole. La vitesse du liquide est nulle au contact de la paroi, augmente progressivement quand on s'en éloigne et est maximale au centre du vaisseau. Le taux de cisaillement, et donc la force exercée, est inversement proportionnel à la vitesse et est nul au centre du vaisseau et maximal à la paroi.

Vaisseaux	Diamètre (mm)	Débit sanguin (ml/s)	Nombre de Reynolds	Taux de cisaillement ou flux (s^{-1})	Forces de cisaillement (dyne / cm^2)
Artère fémorale	5,0	3,7	280	300	11
Carotide commune	5,9	5,1	330	250	8,9
Coronaire gauche	4,0	2,9	240	460	16
Petite artère	0,3	$3,5 \cdot 10^{-3}$	2,3	1335	4,7
Artériole	0,025	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \cdot 10^{-2}$	1600	5,6

Tableau 4 : Paramètres hémodynamiques dans différentes artères humaines (d'après Goldsmith, 1986). Les taux et les forces de cisaillement sont calculés à la paroi. Le nombre de Reynolds est le coefficient de viscosité du milieu.

1.3. Modifications pathologiques de la paroi et de la rhéologie sanguine

In vivo, la formation d'un thrombus plaquettaire a lieu en présence de forces hémodynamiques qui dépendent du débit sanguin, de la géométrie du vaisseau et de la composition cellulaire du sang. Les forces hémodynamiques créées par le flux sanguin sont un élément essentiel à considérer dans l'étude de l'interaction entre les éléments du sang et la paroi vasculaire. Lorsque les artères présentent des plaques d'athérosclérose, les modifications de composition de la paroi et des forces hémodynamiques contribuent au déclenchement et à la propagation de la thrombose et à ses conséquences cliniques.

1.3.1. Notions de rhéologie applicables au vaisseau

Les interactions des éléments du sang et notamment les plaquettes avec la paroi vasculaire en conditions de flux font appel à des notions de rhéologie (Nesbitt et al. 2006; Wootton and Ku 1999). En application des lois établies par Poiseuille, le flux sanguin peut être considéré comme laminaire et composé d'une infinité de plans de fluide parallèles les uns aux autres. La représentation graphique de la vitesse du liquide dans le vaisseau décrit une parabole (Figure 12). Chaque plan de fluide a une vitesse propre avec une vitesse théorique nulle pour le plan de liquide en contact avec la paroi et une vitesse maximale pour le plan de liquide au centre du vaisseau. Deux paramètres définissent l'écoulement d'un fluide dans un cylindre :

- Le taux de cisaillement γ , en s^{-1} , qui est une valeur algébrique caractérisant le gradient de vitesse entre deux plans de liquide adjacents. Positif, il entraîne la surface de l'objet sur lequel il s'applique ; négatif, il s'oppose à son mouvement et le ralentit. Il est maximal à la paroi et nul au centre du vaisseau.
- La contrainte de cisaillement τ , en $dyne/cm^2$. Elle représente la force par unité de surface exercée par un plan de liquide sur un autre ou sur la paroi. Selon l'équation $\tau(r) = \gamma(r) \cdot \eta$, la force de cisaillement est directement proportionnelle au taux de cisaillement et est fonction de la viscosité du sang, η (coefficient de viscosité ou nombre de Reynolds).

Cependant, la rhéologie dans les vaisseaux sanguins est plus complexe que le système simplifié d'un flux de Poiseuille. En effet, le sang n'est pas un liquide newtonien. Il contient notamment des protéines, des cellules plus ou moins déformables (globules rouges, globules blancs et plaquettes) et sa viscosité varie avec le taux de cisaillement (Tableau 4). D'autre

part, l'écoulement du sang est pulsatile et il est contenu dans des vaisseaux dont les parois possèdent une tension, une élasticité et une inertie propres.

1.3.2. Impact de la rhéologie sanguine sur l'adhésion et l'activation plaquettaire

Une conséquence importante de la rhéologie sanguine est la distribution et la localisation non uniforme des cellules sanguines dans la lumière du vaisseau (**Aarts et al. 1988; Goldsmith and Turitto 1986**). Au centre du vaisseau, le sang est enrichi en globules rouges et sa vitesse y est plus grande. Au niveau de la paroi du vaisseau, le sang est plus riche en protéines et en plaquettes sanguines. Cette distribution a des conséquences importantes car l'accumulation/l'enrichissement de plaquettes au niveau de la paroi, où le taux de cisaillement est maximal, favorise l'adhésion plaquettaire et la formation d'un thrombus en cas de lésion vasculaire.

La vitesse du flux peut moduler la libération, le dépôt et la structure de protéines plasmatiques impliquées dans le recrutement et l'activation plaquettaire. Par exemple, des forces de cisaillement élevées déplient les molécules de FW globulaires capturées au niveau d'une lésion, augmentant la densité locale de sites de liaison et leurs capacités à interagir avec la GPIb α (**Siedlecki et al. 1996**).

Les paramètres rhéologiques peuvent également avoir des effets sur les récepteurs plaquettaires impliqués dans l'adhésion. En présence de flux faibles, comme celles rencontrées dans les veines, les plaquettes interagissent et adhèrent au sous-endothélium exposé grâce à leurs récepteurs incluant la GPVI et les intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Bennett 2005; Nieswandt and Watson 2003; Savage et al. 1998**). En présence de flux élevés, ces récepteurs ne sont pas capables d'induire l'attachement des plaquettes en liant le FW. Cette interaction est transitoire mais permet aux intégrines ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$) d'interagir avec leurs ligands et d'induire une adhésion stable (**Nesbitt et al. 2006**). La sous-unité GPIb α du complexe pourrait aussi subir un changement de conformation à flux élevés qui favorise sa liaison au FW (**Huizinga et al. 2002**).

1.3.3. Modifications de la composition de la paroi artérielle au cours de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie évolutive de la paroi des artères de gros et moyen calibres caractérisée par la formation de plaques fibreuses et calcifiées conduisant à un

épaississement de la paroi et à une réduction progressive de la lumière artérielle (**Libby 2002; Lusis 2000**) (Figure 13). Les lésions d'athérosclérose se forment sur les gros troncs artériels, essentiellement au niveau des zones de flux perturbés (embranchement vasculaires, crosse de l'aorte,...). La croissance de la plaque d'athérome est un processus complexe lié à une infiltration lipidique (LDL principalement), suivie de leur oxydation dans l'intima. Des monocytes sont recrutés dans la paroi vasculaire et subissent alors une maturation en macrophages, qui vont phagocyter les LDL oxydés pour former des cellules spumeuses. Ces dernières s'accumulent dans la paroi et constituent les premières lésions d'athérosclérose appelées stries lipidiques. Parallèlement, un remodelage vasculaire dû à la prolifération des CML amplifie la sténose de l'artère, qui renforce localement les forces de cisaillement (**Faxon et al. 2004**). Ce processus va aboutir à la constitution d'une plaque fibreuse caractérisée par une chape fibro-musculaire isolant un centre lipidique et par une destruction progressive de la LEI (Figure 13). Les plaquettes pourraient contribuer au processus inflammatoire induisant la formation de lésions d'athérosclérose (**Cayatte et al. 2000; Kobayashi et al. 2004; Massberg et al. 2002; Massberg et al. 2005; Methia et al. 2001**). D'autre part, des études ont montré une corrélation entre les conditions hémodynamiques locales et la formation de la plaque d'athérosclérose (**Wootton and Ku 1999**). Les mécanismes précis par lesquels les changements rhéologiques accélèrent le processus athérosclérotique restent peu connus.

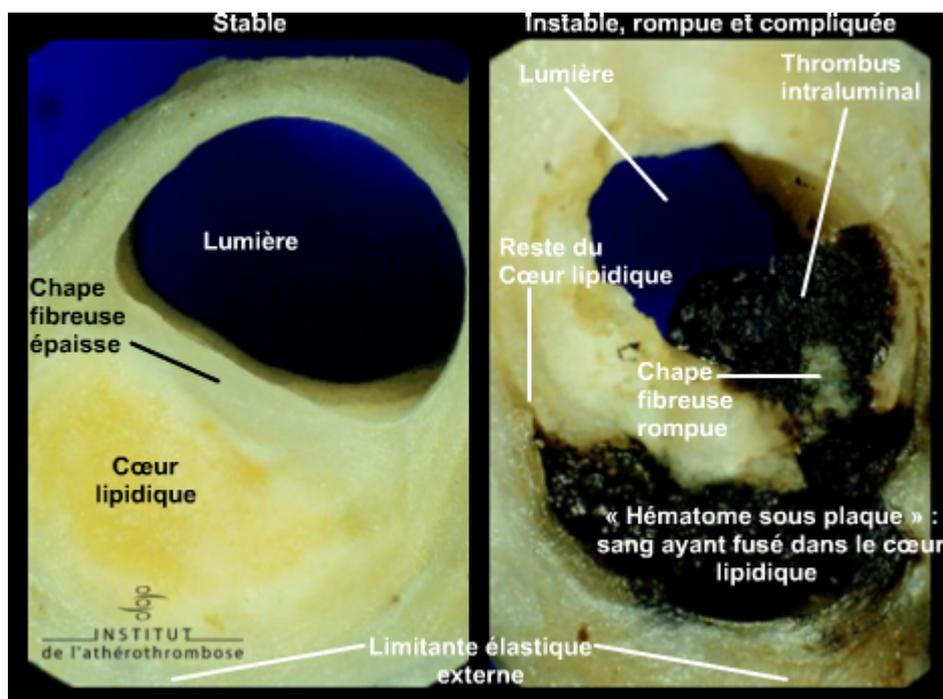


Figure 13 : Plaque d'athérosclérose. A gauche, plaque d'athérosclérose stable avec un cœur lipidique et une chape fibreuse. Après rupture de la chape fibreuse, formation d'un thrombus s'incorporant dans la plaque d'athérosclérose dite « compliquée » (Institut de l'Athérotrombose 2005).

Par rapport à un vaisseau sain, le matériel sous-endothélial exposé au niveau d'une plaque d'athérome a un potentiel thrombotique bien supérieur en raison de sa composition excessive en collagènes (60% de la plaque), en FT et en substances lipidiques qui activent les plaquettes comme l'acide lysophosphatidique (**McCullagh et al. 1980; Penz et al. 2007; Rekhter 1999; van Zanten et al. 1994**). Les plaques d'athérosclérose humaines contiennent des collagènes interstitiels principalement de type I (2/3 des collagènes) et III. Des dépôts de collagène de type IV sont aussi retrouvés au niveau de la chape fibreuse. Les collagènes dans les plaques ont une fonction structurale car leur dégradation par les métalloprotéinases contribue à l'instabilité de la plaque. Ils ont aussi un rôle dans la réaction thrombogénique lors de la rupture de plaque car les plaquettes adhèrent et sont activées par ces collagènes (voir paragraphes 1.2.3.a) et 2.2.3.).

Des nombreuses données indiquent que le FT a un rôle clef dans la thrombogénicité de la plaque (**Mackman 2004**). Des études d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont montré que le TF est localisé sur l'endothélium et dans l'intima, au niveau des CML, des cellules spumeuses, des monocytes et de la MEC des vaisseaux présentant des plaques d'athérosclérose chez l'homme (**Thiruvikraman et al. 1996; Wilcox et al. 1989**) et dans les modèles animaux d'athérosclérose (**Kato et al. 1996; Marmur et al. 1993**). Certaines études montrent une augmentation des concentrations plasmatiques de microparticules FT positives dans l'athérosclérose et une corrélation entre les niveaux de ces microparticules et l'infarctus du myocarde (**Mackman 2004**). Bien qu'étant capables d'induire la formation d'un caillot *in vitro*, la participation du FT de ces microparticules à la formation d'un thrombus *in vivo* n'est pas clairement établie (**Chou et al. 2004; Day et al. 2005**).

1.3.4. Rhéologie sanguine et athérombose

Quand les artères présentent des plaques d'athérosclérose compliquées, la lumière du vaisseau diminue (Figure 13). Pour une sténose d'environ 50% (Figure 14), d'intenses turbulences et des taux de cisaillement élevés à la paroi de l'ordre de $5\ 000\ s^{-1}$ sont observés en amont de la sténose. Au centre de la sténose, les pressions sont faibles et peuvent collapser les artères. En aval de la sténose, une zone dite de recirculation du sang est observée avec des taux de cisaillement faibles voir négatifs. (**Wootton and Ku 1999**).

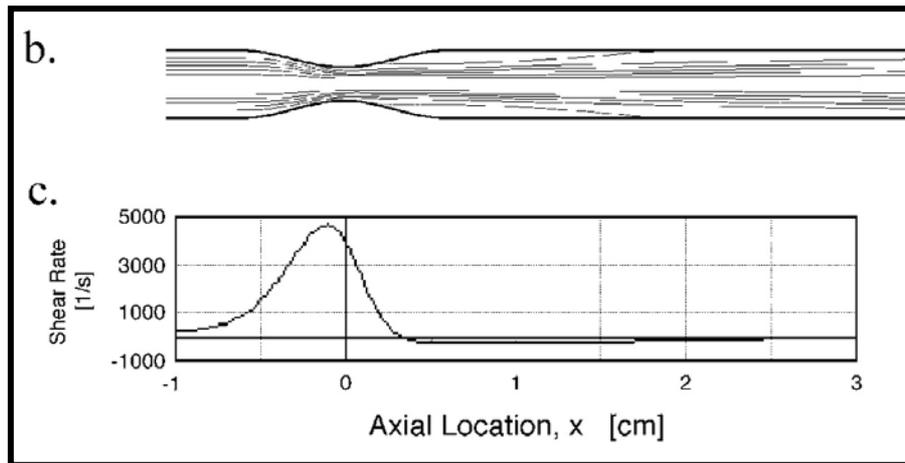


Figure 14 : Flux sanguin dans un vaisseau sténosé (réduction du diamètre de 50%). A. Représentation schématique de la sténose du vaisseau montrant des régions de flux complexes en amont et en aval de la sténose. B. Taux de cisaillement en fonction de la localisation dans le vaisseau sténosé. Le taux de cisaillement augmente progressivement pour atteindre un maximum en amont de la sténose. Le taux de cisaillement est faible ou négatif en aval de la sténose (Wootton and Ku 1999).

La composition et la taille du thrombus dépendent des conditions de flux (**Wootton and Ku 1999**). Dans la zone de stase ou de faible circulation, le thrombus est enrichi en globules rouges entourés de fibrine. A des taux de cisaillements supérieurs à $1\ 000\ s^{-1}$, le thrombus va s'enrichir en plaquettes dont l'adhésion et l'accumulation sont conditionnées par le flux. A des taux de cisaillement élevés ($5\ 000-20\ 000\ s^{-1}$) les plaquettes circulantes peuvent s'activer et agréger (**Nesbitt et al. 2006**). Les mécanismes de l'activation des plaquettes par le flux sont mal connus mais semblent impliquer la liaison du FW plasmatique au complexe GPIIb-V-IX initiant une signalisation menant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Kroll et al. 1991**). Les récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ à l'ADP jouent également un rôle important dans cette agrégation plaquettaire flux-dépendante (**Gachet 2006**). Un rôle important du récepteur à l'ATP P2X₁ à flux élevés a également été mis en évidence dans le changement de forme des plaquettes et la centralisation de leurs granules (**Hechler et al. 2003; Mahaut-Smith et al. 2004**).

1.3.5. Conséquences cliniques

Les conséquences cliniques de la rupture, de la fissuration ou de l'érosion de la chape fibreuse peuvent être - ou non - symptomatiques. La majorité des ruptures de plaque sont asymptomatiques (**Burke et al. 2001**). Ces événements répétés participent à la progression des lésions d'athérosclérose, avec l'intégration des thrombi muraux à la plaque sous-jacente.

Les manifestations symptomatiques se font soit à la suite de l'obstruction de l'artère par le thrombus mural, soit après libération d'un embole qui va obstruer la circulation en aval (**Luisis 2000**). L'infarctus du myocarde et l'angor instable sont provoqués par une thrombose des artères coronaires. Dans l'angor instable, la thrombose - associée à une réaction vasomotrice - provoque une réduction brutale du flux sanguin coronaire transitoire. Dans l'infarctus, une période d'occlusion prolongée provoque une ischémie myocardique. L'accident vasculaire cérébral apparaît lorsqu'une artère cérébrale est obstruée par un embole. L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs est généralement provoquée par une thrombose localisée au niveau des artères des membres inférieurs.

2. Mécanismes de l'hémostase et de la thrombose

Après avoir évoqué la structure et la composition d'une artère et la thrombogénicité des différents composants, cette seconde partie s'attachera à décrire la formation d'un thrombus plaquettaire après lésion vasculaire. Plusieurs récepteurs et ligands plaquettaires ont été identifiés comme jouant un rôle clef dans l'hémostase et la thrombose *i)* par l'étude de patients présentant des défauts de l'hémostase, *ii)* par l'action de médicaments antithrombotiques et *iii)* par des études *in vitro* d'agrégation et d'adhésion plaquettaire. L'avènement de souris mutées génétiquement (**Gachet et al. 2004**) a permis de revisiter le rôle de ces acteurs dans les différentes étapes de formation d'un thrombus et de révéler d'autres ligands et voies intracellulaires.

En particulier, une idée plus précise des mécanismes de signalisation et de l'implication de protéines adhésives (FW, collagènes, FN, TSP, LN) et de leurs récepteurs plaquettaires (complexe GPIb-V-IX, GPVI, intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_6\beta_1$) dans la thrombogénèse est en train d'émerger (**Gachet et al. 2006b; Jackson et al. 2003**). En conditions de taux de cisaillement à la paroi élevés, la première étape d'adhésion des plaquettes à la paroi lésée est assurée par la liaison réversible du complexe GPIb-V-IX au FW présent dans le sous-endothélium ou capturé à partir du plasma. Une fois ralenties, les plaquettes vont pouvoir adhérer de façon irréversible au collagène et au FW, s'activer et changer de forme. L'interaction plaquettes-plaquettes est permise par deux récepteurs : l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui va lier le fibrinogène et le FW et également le complexe GPIb-V-IX qui lie le FW exposé par les plaquettes adhérentes ayant sécrétées (**Jackson et al. 2003**). L'activation des plaquettes induit la synthèse de thromboxane A_2 (TxA_2) et la sécrétion d'ADP et d'ATP, ce qui va permettre l'activation des plaquettes à proximité et d'amplifier le processus d'agrégation au niveau de la lésion. Dans un premier temps, nous décrirons et

discuterons des rôles respectifs des protéines adhésives et des agonistes solubles dans l'initiation du thrombus et dans sa croissance au regard des données obtenues dans les modèles de thrombose (Tableau 5).

Parallèlement à l'activation plaquettaire, la coagulation est initiée (**Mackman 2004**). La lésion vasculaire si elle suffisamment profonde expose du FT dans la média et l'adventice, qui en liant le facteur VII/VIIa va initier la formation rapide de thrombine. Les phospholipides chargés négativement et des cofacteurs de la coagulation exposés à la surface des plaquettes activées forment une surface catalytique aboutissant à la génération de thrombine. La thrombine ainsi formée va permettre la formation de fibrine, qui va stabiliser le clou plaquettaire. Après formation du thrombus, une phase de consolidation prévient sa désagrégation prématurée et implique l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et d'autres acteurs comme les éphrines. Plus tardivement, le système fibrinolytique va être activé. La plasmine générée à partir du plasminogène circulant permet *in fine* la solubilisation du thrombus fibrineux, conduisant à la réparation complète du vaisseau.

2.1. La plaquette sanguine

Les plaquettes sont des acteurs primordiaux de l'hémostase et sont impliquées dans les maladies thromboemboliques. Ce sont des fragments anucléés de mégacaryocytes, formés dans la moelle osseuse et libérés dans le système vasculaire au niveau des sinusoides. Les plaquettes circulent à l'état non activé sous forme discoïde, avec un diamètre de 2 μm et un volume de 7 à 12 μm^3 chez l'homme et de 5 μm^3 chez la souris. La durée de vie des plaquettes est de 8 à 10 jours chez l'homme et de 3 à 4 jours chez la souris. Les plaquettes les plus âgées sont principalement phagocytées par les macrophages de la rate et du foie (**Tsakiris et al. 1999; White 1987**).

La plaquette peut-être divisée en trois zones (Figure 15) :

La membrane plasmique est constituée d'une bicouche phospholipidique de cholestérol, de protéines et de glycanes (**Simons and Toomre 2000**). Les phospholipides anioniques, et notamment la phosphatidylsérine, sont situés sur le feuillet interne de la membrane plaquettaire au repos et sont externalisés suite à l'activation plaquettaire, recrutant et concentrant les facteurs de la coagulation (**Toti et al. 1996**). Enchâssés dans la bicouche

lipidique se trouvent des récepteurs qui vont permettre l'adhésion et/ou l'activation des plaquettes en réponses à divers ligands.

Le système canaliculaire ouvert (SCO) résulte d'invaginations de la membrane cytoplasmique et participe à l'endocytose de substances plasmatiques et à la libération du contenu des granules (exocytose) suite à l'activation plaquettaire. Le système tubulaire dense, analogue au réticulum endoplasmique, séquestre et permet la mobilisation de calcium et d'enzymes de la voie de synthèse des prostaglandines.

Le maintien de la forme discoïde des plaquettes au repos est assuré par un cytosquelette intracellulaire organisé en un réseau flexible. La régulation dynamique du cytosquelette lors de l'activation entraîne des changements de forme : passage à la forme sphérique, émission de filopodes et de lamellipodes.

Les organelles des plaquettes comprennent des mitochondries, des grains de glycogène et des granules de sécrétion. Ces derniers sont de trois types : les granules denses (granules δ) contiennent de fortes concentrations d'ADP (650 mM) et d'ATP (440 mM), du pyrophosphate (320 mM), ainsi que du calcium (2 M) et de la sérotonine (65 mM). Les granules α contiennent des facteurs plaquettaires spécifiques (PF4, β -thromboglobuline), des glycoprotéines adhésives parmi lesquelles le fibrinogène et le facteur Willebrand, des facteurs de la coagulation (FV, FXI, FXIII), des facteurs de croissance (PDGF, TGF- β , EGF, FEGF...), des inhibiteurs de la fibrinolyse, de l'albumine, des immunoglobulines et de la P-sélectine. Enfin, les lysosomes contiennent des hydrolases acides ainsi que des protéases **(Boneu and Cazenave 1997)**.

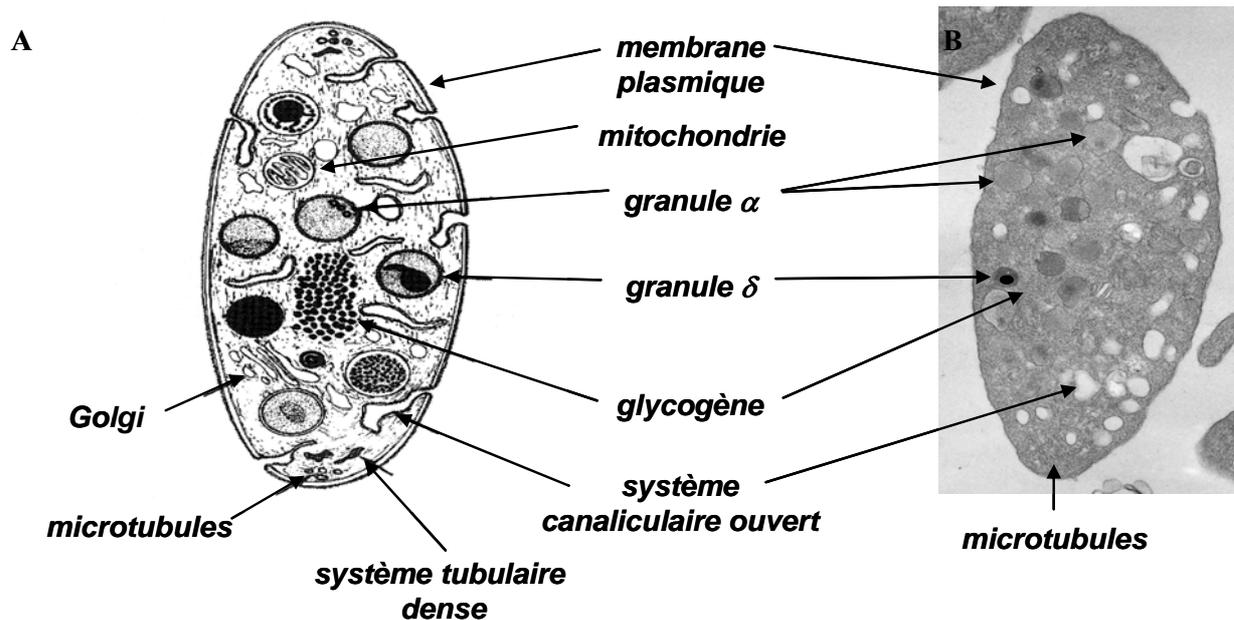


Figure 15 : Morphologie et ultrastructure des plaquettes. A. Résumé des principales caractéristiques ultrastructurales observées sur une coupe longitudinale d'une plaquette discoïde. B. En regard une coupe de plaquette discoïde au repos examinée en microscopie électronique à transmission.

2.2. Interactions des plaquettes avec les protéines adhésives de la paroi vasculaire lésée

2.2.1. Adhésion réversible et initiation de l'activation des plaquettes par la liaison du FW à la GPIb α

Dans des conditions de flux élevés la première étape d'adhésion des plaquettes à la paroi lésée dépend de la liaison de la sous-unité GPIb α du complexe GPIb-V-IX au domaine A1 du FW déjà présent dans le sous-endothélium ou capturé à partir du plasma (**Berndt et al. 2001**). Cette interaction présente une vitesse de dissociation élevée ne permettant qu'un attachement transitoire des plaquettes. Les plaquettes roulent sur la surface vasculaire et leur ralentissement permet d'engager des liaisons via des intégrines avec le FW et d'autres protéines comme le Fg et les collagènes induisant une adhésion stable. En plus d'un rôle d'initiation de l'adhésion, la liaison de la sous-unité GPIb au FW intervient dans l'agrégation et la croissance du thrombus à flux élevés et contribue également à l'activation plaquettaire (**Konstantinides et al. 2006; Mangin et al. 2003; Strassel et al. 2007**).

a) 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 (24 kDa) qui sont liées par un pont disulfure, la GPV (82 kDa) et la GPIX (20 kDa) qui sont associées de manière non covalente (Berndt et al. 2001) (Figure 16). On dénombre environ 25 000 copies du complexe GPIb-IX et 12 000 copies de GPV à la surface de la plaquette (Berndt et al. 2001). Une étude récente qui reste à confirmer suggère la liaison covalente de deux sous-unités GPIb β par GPIb α (Luo et al. 2007). Ces quatre protéines appartiennent à une superfamille de protéines caractérisées par la répétition de motifs riche en leucine (LR) (Kobe and Deisenhofer 1994). La portion N-terminale de la GPIb α constituée de 8 domaines LR est suivie par une région étendue fortement O-glycosylée appelée macroglycopeptide, une section transmembranaire et un domaine intracytoplasmique de 96 acides aminés (Lopez et al. 1988). La GPIb β possède un seul motif LR extracellulaire et un domaine intracytoplasmique de 34 acides aminés (Lopez et al. 1988). La GPIX présente une forte homologie avec la GPIb β au niveau extracellulaire et son domaine intracellulaire ne contient que 6 acides aminés (Hickey et al. 1989). Le domaine extracellulaire de la GPV est composé de 15 motifs LR et son domaine intracellulaire contient 16 résidus (Lanza et al. 1993).

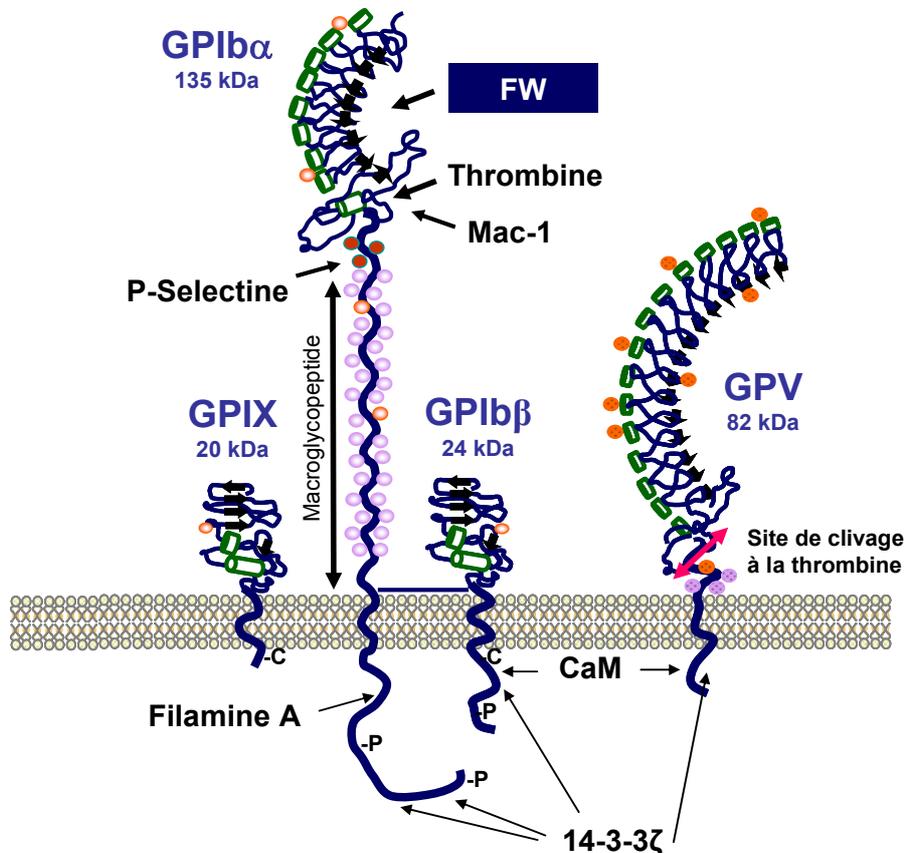


Figure 16 : Représentation schématique du complexe GPIb-V-IX. CaM : calmoduline ; C : cystéine palmytoylée ou myristoylée; \diamond : domaine riche en leucine; \bullet : tyrosine sulfatée; \circ : O-glycosylation; \circ : N-glycosylation; -P: phosphorylation

L'absence ou l'anomalie du complexe GPIb-V-IX est responsable du syndrome de Bernard-Soulier (BS), maladie rare héréditaire caractérisée par un temps de saignement allongé et une diminution du nombre des plaquettes circulantes qui sont de très grande taille (4 à 10 μm de diamètre) (**Lanza 2006; Lopez et al. 1998**).

b) Fonction d'adhésion de la GPIb

L'extrémité extracellulaire N-terminale de la GPIb α porte la fonction d'adhésion du complexe. Elle comporte les sites de liaison pour le domaine A1 du FW mais également des sites de liaison pour la thrombine, la P-sélectine, le domaine I de l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ des monocytes, le facteur XI, le kininogène de haut poids moléculaire (HMWK) et le facteur XII (**Berndt et al. 2001**). Mis à part l'interaction avec le FW, le rôle de ses multiples liaisons n'est pas résolu.

Dans le paragraphe 1.3.2., nous avons décrit l'impact des forces de cisaillement sur la conformation du FW. Le déploiement du FW dans des conditions de flux élevées augmente ses propriétés adhésives. Un modèle dynamique d'association du FW avec le GPIb α a été proposé sur la base de la structure cristallographique de la partie N-terminale de la GPIb α seule ou associée au domaine A1 du FW (**Dumas et al. 2004; Uff et al. 2002**) : la GPIb α enserre à la manière d'une pince la boucle A1 par la partie C-terminale composée d'une double boucle cystéine qui flanque le domaine LR (**Huizinga et al. 2002**). La sous-unité GPIb α subirait un changement de conformation à flux élevés permettant l'ouverture de la pince (**Huizinga et al.**

Des données suggèrent également un rôle de la partie cytoplasmique de la GPIb α dans la régulation des propriétés adhésives du complexe soit par une signalisation de type « inside out », soit par une modification de l'avidité du récepteur modulée par son interaction avec le cytosquelette (**Feng et al. 2003; Williamson et al. 2002**). Parmi les effecteurs potentiels de la signalisation via la GPIb α on trouve la filamine A (**Feng et al. 2003**), protéine de structure qui ancre le complexe au réseau sous-membranaire d'actine, et/ou des molécules de signalisation telles que la 14-3-3 ζ et la calmoduline (**Du et al. 1996**). Un rôle du domaine intracellulaire de la sous-unité GPIb β dans la modulation des propriétés adhésives a également été suggéré dépendant du niveau de phosphorylation PKA-dépendant d'une sérine dans le domaine intracytoplasmique (**Du et al. 1996**).2002).

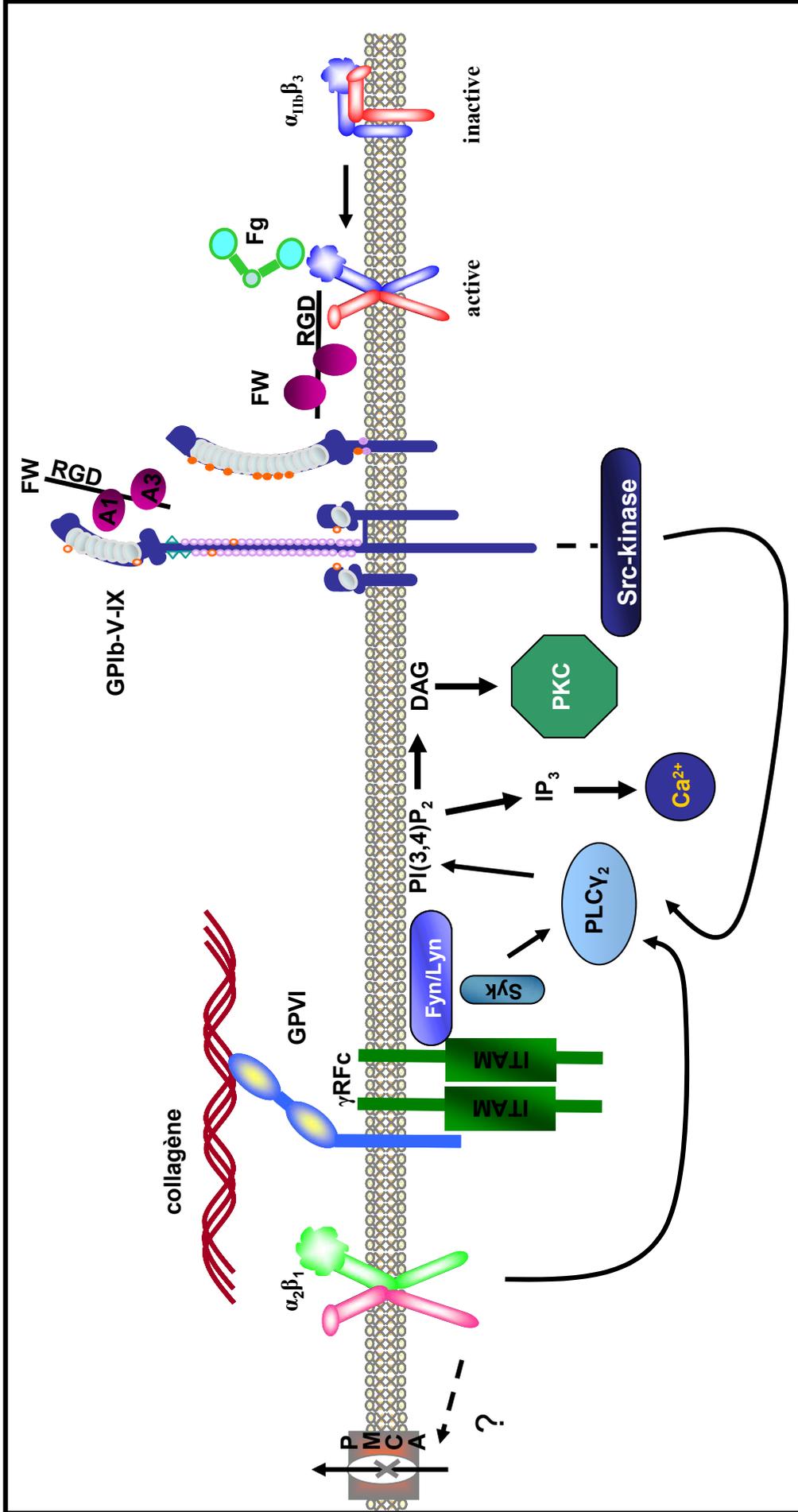


Figure 17 : La signalisation déclenchée par les récepteurs aux protéines adhésives. γ RFC : chaîne γ des récepteurs Fc; PMCA : Plasma Membrane Calcium ATPase; Fg: fibrinogène; FW: facteur Willebrand; DAG : diacyl glycérol; IP3 : inositol (1,4,5)-triphosphate; PKC : Protein Kinase C; PI: phosphoinositide; PLC : phospholipase C; ITAM : Immune Tyrosine-containing Activation Motifs.

c) Fonction de signalisation

Les étapes qui semblent maintenant établies impliquent à une étape précoce une src kinase et les phospholipases $C\gamma_{2/1}$, aboutissant à la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires et à la réorganisation du cytosquelette d'actine (**Mangin et al. 2003; Suzuki-Inoue et al. 2004; Wu et al. 2001; Yuan et al. 1999**). Cette signalisation va aussi contribuer à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Kasirer-Friede et al. 2004**) nécessaire à l'adhésion stable au FW, à l'étalement sur la surface et à l'agrégation des plaquettes. L'activation GPIb-dépendante est indépendante des voies d'amplification par l'ADP et le TXA_2 et par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Figure 17) (**Du et al. 1996; Mangin et al. 2004a**).

Les rôles respectifs des différentes sous-unités dans cette signalisation ne sont pas entièrement connus. Des arguments apparaissent impliquant la sous-unité GPIb β dans cette fonction d'activation. Un peptide perméant correspondant au domaine intracellulaire de la GPIb β couplé à un groupement palmitoyl, a montré une inhibition de l'agrégation des plaquettes en réponse au FW, à la thrombine et au collagène (**Martin et al. 2003**). Enfin, des cellules d'ovaire de hamster (CHO) transfectées exprimant un complexe GPIb-IX dont la GPIb β est délétée ou mutée au niveau intracellulaire a montré une signalisation et une production de filopodes diminuées (**David**, manuscrit en préparation).

d) Rôle dans la thrombose

Plusieurs agents inhibant l'interaction entre la GPIb et le FW ont été évalués dans plusieurs modèles animaux (hamster, chien, singe) parmi lesquels le domaine A1 du FW (**Yao et al. 1994b**), un fragment peptidique VCL (**McGhie et al. 1994**), des Fab de l'anticorps 6B4 bloquant la GPIb α (**Cauwenberghs et al. 2000**) ou par l'anticorps AJvW-2 dirigé contre le FW bloquant la liaison de la GPIb α (**Kageyama et al. 1997; Poletti et al. 1997; Yamamoto et al. 1998**). Pour la majorité d'entre eux une diminution de la thrombose a été observée sans perturbation importante du temps de saignement. La crotaline, une protéase extraite d'un venin de serpent qui clive la GPIb α , et l'acide aurintricarboxylique, inhibiteur de l'agglutination induite par la ristocétine, présentent également des propriétés antithrombotiques *in vivo* mais augmentent le temps de saignement (**Azzam et al. 1996; Ito et al. 1999; Yamamoto et al. 1998**).

Des souris transgéniques exprimant une GPIb α dont le domaine extracellulaire a été remplacé par le récepteur IL-4 humain incapable de lier le FW ont été étudiées dans un modèle de thrombose carotidienne ou d'artères mésentériques induite par du chlorure de fer (FeCl₃). Dans ces modèles, ces souris montrent une quasi-absence de thrombose et leurs plaquettes sont incapables de s'incorporer dans un thrombus en cours de formation (**Bergmeier et al. 2006; Konstantinides et al. 2006**). Des souris déficientes pour le gène de la GPIb β montrent également une capacité réduite à la thrombose dans différents modèles (chimique, laser et thromboembolisme) et reproduisent le syndrome BS (**Strassel et al. 2007**).

En bloquant la capture du FW par le collagène I et III (**Staelens et al. 2006**), l'anticorps monoclonal 82D6A3 induit une diminution de la thrombose dans un modèle de Folts chez le babouin sans effet sur le temps de saignement et le compte plaquettaire (**Wu et al. 2002**). Enfin, les plaquettes de porcs présentant une maladie de Willebrand de type 3 ne s'activent pas au contact de la paroi des coronaires après lésion par ballonnet (**Reddick et al. 1982**). Malgré tout lors de lésions profondes, atteignant la média, la formation du thrombus ne semble pas affectée par l'absence de FW. Chez des souris déficientes en FW, l'adhésion des plaquettes au site de la lésion est ralentie et la thrombose est diminuée dans un modèle de lésion au FeCl₃ qui induit aussi une désendothélialisation (voir paragraphe 3.7.) (**Chauhan et al. 2006; Denis et al. 1998; Ni et al. 2000**).

L'ensemble de ces données est en faveur d'un ciblage du complexe GPIb-V-IX. Cependant il reste à obtenir un composé suffisamment actif et résoudre le problème d'une tendance à la thrombopénie rencontrée notamment avec presque tous les anticorps dirigés contre le GPIb α .

2.2.2. Activation de l'intégrine plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$

Alors que l'interaction FW-GPIb α permet l'adhésion réversible des plaquettes à la paroi ainsi que des interactions plaquettes-plaquettes dans des conditions de flux élevés (**Ruggeri 2000**), l'adhésion et l'agrégation plaquettaire stables nécessitent l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. L'agrégation implique le recrutement de nouvelles plaquettes par la liaison du fibrinogène (Fg) à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, après activation et changement de conformation de cette intégrine (**Kulkarni et al. 2000**). Dans les étapes plus tardives, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ joue un rôle clef dans la persistance de la signalisation et le renforcement des propriétés adhésives des plaquettes

permettant la stabilisation du thrombus et la rétraction du caillot (**Prevost et al. 2003; Shattil et al. 1998; Suzuki-Inoue et al. 2006**).

a) Structure et fonctions

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou GPIIb-IIIa est le récepteur plaquettaire le plus abondant. Les plaquettes possèdent environ 80 000 molécules d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ avec des stocks supplémentaires dans les granules α et dans le système canaliculaire ouvert. Les sous-unités α_{IIb} et β_3 sont constituées par un domaine extracellulaire important et de courts domaines transmembranaire et cytoplasmique (20 et 47 acides aminés respectivement). L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ peut lier le Fg, via principalement le dodécapeptide présent à l'extrémité C-terminale des chaînes γ (**Fuss et al. 2001**), et le FW, mais aussi la fibrine, la fibronectine et la vitronectine par leurs séquences RGD. Cette liaison va promouvoir le regroupement des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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; Romer et al. 2006**). Ainsi sur des matrices de Fg ou FW, cette intégrine est impliquée dans l'adhésion et l'étalement des plaquettes.

La fonction adhésive de la protéine est portée par les domaines extracellulaires de l'hétérodimère et est activation-dépendante (**Du and Ginsberg 1997; Phillips et al. 2001**). 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 et le FW (**Isenberg et al. 1987**). L'activation par un agoniste, qualifiée de signalisation « inside-out », entraîne un changement de conformation de cette intégrine qui la rend apte à lier son ligand (Figure 18). Les techniques de microscopie électronique, de RMN et de cristallographie ont permis de déterminer que la partie extracellulaire de l'intégrine possède une forme repliée au repos et que l'activation entraîne un dépliement du récepteur et également un réarrangement au niveau transmembranaire et intracellulaire (**Beglova et al. 2002; Shattil and Newman 2004; Takagi et al. 2002**).

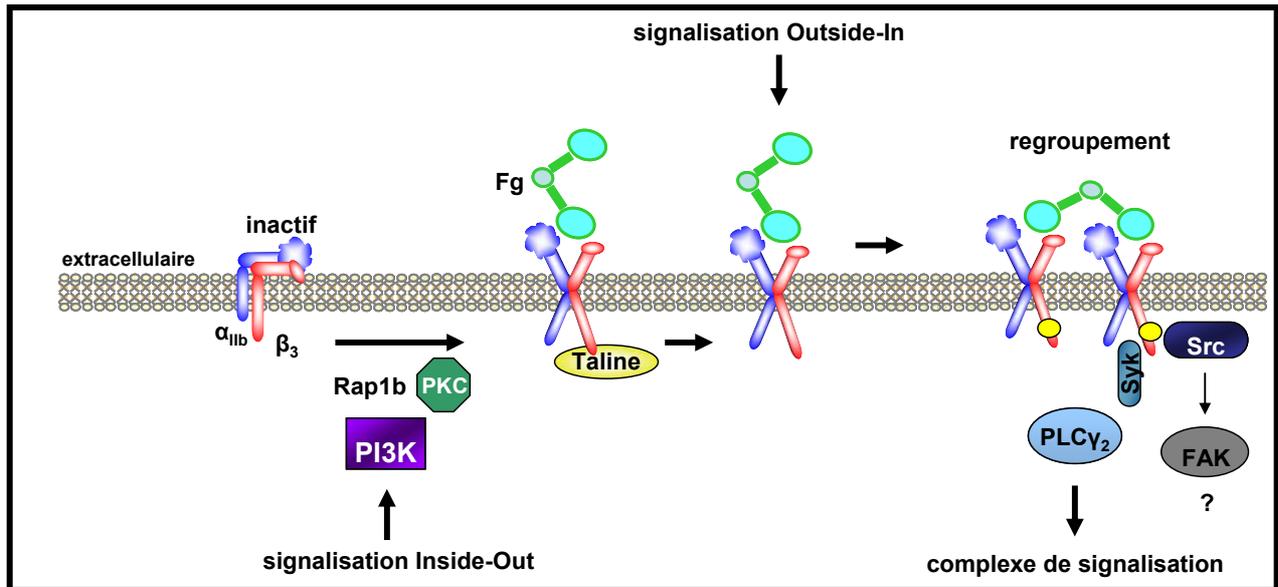


Figure 18 : Mécanisme bidirectionnel de signalisation médié par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (d'après Shattil et al, 2004). ● tyrosines phosphorylées ; FAK : focal adhesion protein ; PI3K : phosphoinositide kinase ; PKC : protein kinase C ; PLC : phospholipase C.

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est activée par des agonistes solubles tels que l'ADP, la thrombine et le thromboxane A_2 , et par des protéines adhésives comme le collagène et le FW et est régulée négativement par la PGI_2 et le NO produits par les cellules endothéliales qui augmentent les taux intracellulaires d'AMPc et de GMP_C respectivement. La protéine kinase C (PKC), la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) et Rap1b et, plus proche du récepteur, la taline sont des effecteurs intracellulaires impliqués dans la signalisation « inside-out » qui reste encore mal connue (Shattil and Newman 2004; Vinogradova et al. 2002).

En retour, l'intégrine est capable de transmettre une signalisation « outside-in » (Figure 18) importante pour stabiliser l'agrégat plaquettaire et pour la réactivité des plaquettes avec la paroi vasculaire (Shattil and Newman 2004). Elle va entraîner la phosphorylation de nombreuses protéines, la libération de calcium intracellulaire, la réorganisation du cytosquelette d'actine menant à la formation de lamellipodes, la génération de thromboxane A_2 et la sécrétion des protéines contenues dans les granules α (Haimovich et al. 1993; Pelletier et al. 1992). Des souris dont deux motifs tyrosine cytoplasmique de la sous-unité β_3 impliqués dans cette signalisation ont été mutés en phénylalanine présentent une diminution de la seconde vague d'agrégation plaquettaire, de la stabilité de l'agrégat plaquettaire et de la rétraction du caillot (Law et al. 1999).

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 de fonction de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Nurden 2005). Des souris déficientes en sous-unité β_3 (absence des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$) reproduisant ce syndrome se caractérisent par l'absence d'agrégation en réponse à l'ensemble des agonistes (Smyth et al. 2001).

b) Rôle dans la thrombose

En raison de son rôle central dans l'agrégation plaquettaire, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ a été la cible du développement d'antagonistes pour traiter les thromboses cardiovasculaires. Trois types d'antagonistes ont été développés : des anticorps ou des fragments d'anticorps (abciximab ou Reopro®), des peptides cycliques basés sur le motif KGD (eptifibatide ou Intégrilin®) et des peptidomimétiques de synthèse qui inhibent de façon compétitive la liaison fibrinogène-GPIIb/IIIa en mimant la charge et la conformation spatiale de la séquence RGD (tirofiban ou Aggrastat®). Dans le milieu des années 1980, l'anticorps monoclonal de souris 7E3, bloquant l'agrégation *in vitro* et la thrombose dans des modèles animaux (chien, singe) (Coller et al. 1989), a été développé sous forme monomérique recombinante (abciximab) et évalué cliniquement (Coller et al. 1995). Ce produit administré par injection intraveineuse a montré son efficacité dans la prévention des complications ischémiques chez les patients ayant subi une angioplastie. Les autres applications cliniques sont la prévention des complications cardiaques ischémiques (chez les patients ayant subis une angioplastie à ballonnet, une artériectomie ou une pose de stent) et la réduction à court terme du risque d'infarctus du myocarde chez des patients souffrant d'angor instable (Brophy and Joseph 2005). Les risques principaux de son administration sont hémorragiques et immunologiques.

Le rôle de ce récepteur a également été montré dans des modèles de thrombose dans le petit animal. La formation du thrombus est aussi abolie ou fortement inhibée par l'injection d'antagonistes $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou d'anticorps bloquants dans de nombreux modèles murins de thrombose *in vivo* (Tableaux 5 et 6) (Gruner et al. 2003; Lynch et al. 1995; Mangin et al. 2006; Nonne et al. 2005; Sturgeon et al. 2006). Par ailleurs, les souris $\beta_3^{-/-}$ ne forment pas de thrombi occlusifs (Smyth et al. 2001).

L'absence du principal ligand de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, le Fg, dans des souris knock-out n'empêche pas la formation de thrombi lors de lésion au FeCl₃ mais augmente la fréquence d'embolisation (Jirouskova et al. 2004; Ni et al. 2000). De manière intéressante, des souris

dont la chaîne γ du Fg, nécessaire à la liaison à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, a été mutée ou inhibée ont un temps d'occlusion des vaisseaux plus prolongé qu'en absence de Fg (**Denis and Wagner 2007; Jirouskova et al. 2004; Ni et al. 2003a**). Ainsi, le défaut en Fg semble avoir un effet antithrombotique moins prononcé que l'absence ou le blocage d' $\alpha_{IIb}\beta_3$.

2.2.3. Adhésion stable et activation par les récepteurs au collagène

Les collagènes exposés lors d'une lésion vasculaire (voir paragraphe 1.2.3.a) vont permettre l'adhésion stable et une activation importante des plaquettes. Le collagène est la protéine adhésive la plus thrombogène des vaisseaux sanguins et un des agonistes plaquettaires les plus puissants avec la thrombine. La structure fibrillaire du collagène est requise pour une activation efficace des plaquettes. L'utilisation de peptides synthétiques en triple hélice mimant ces collagènes ont permis de préciser les mécanismes de liaison et d'activation des plaquettes par le collagène (**Barnes et al. 1996; Farndale et al. 2004**). L'intérêt pour le ciblage de cette voie d'activation s'est récemment accru suite au séquençage en 1999 de la GPVI, un récepteur indispensable à l'activation par le collagène (**Clemetson et al. 1999**). Le ciblage du seul récepteur précédemment caractérisé, l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, n'avait pas montré une grande efficacité antithrombotique (**Saelman et al. 1994; Savage et al. 1998**).

a) L'intégrine $\alpha_2\beta_1$

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est le premier récepteur au collagène des plaquettes à avoir été identifié (**Staatz et al. 1989**). Son expression n'est pas que plaquettaire et se retrouve également sur les cellules musculaires lisses, les lymphocytes et les cellules endothéliales. Comme l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, chaque sous-unité est constituée par un domaine extracellulaire important et de courts domaines transmembranaire et cytoplasmique. Le domaine de liaison au collagène est localisé sur le domaine I de la sous-unité α_2 (**Kamata et al. 1994; Tuckwell et al. 1996**). L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est considérée comme le principal récepteur d'adhésion des plaquettes au collagène (**Clemetson and Clemetson 2001**) et son rôle dans la signalisation est encore discuté. Un peptide GFOGER en triple hélice spécifique d' $\alpha_2\beta_1$ (**Knight et al. 2000**), montre que l'intégrine signalerait par des voies dépendantes (impliquant Syk, SLP-76 et PLC γ 2) ou non (impliquant l'inhibition d'une ATPase membranaire au calcium, PMCA) des tyrosines kinases de la famille Src (Figure 17) (**Inoue et al. 2003**). Comme pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, une signalisation « inside-out » augmente l'affinité de cette intégrine pour le collagène (**Jung and Moroi 1998; 2000**).

Deux cas de déficit en $\alpha_2\beta_1$, probablement hormono-dépendants car disparaissant à la ménopause, couplés à des syndromes hémorragiques modérés ont été décrits (**Kehrel et al. 1988; Nieuwenhuis et al. 1985**). Une étude sur un patient souffrant d'un désordre myéloprolifératif avec une déficience de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, a démontré un défaut d'adhésion et d'agrégation plaquettaire au collagène. Les polymorphismes sur le gène codant α_2 sont à l'origine de variation d'expression en $\alpha_2\beta_1$ ayant un impact sur l'adhésion plaquettaire sur des matrices de collagène (**Kritzik et al. 1998**).

L'importance de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ a été évaluée *in vitro* dans des expériences de perfusion sur des matrices de collagène. Les plaquettes déficientes en intégrine $\alpha_2\beta_1$ n'adhèrent pas au collagène fibrillaire de type I à des flux de 150 s^{-1} (**Chen et al. 2002b; Holtkotter et al. 2002**). Par contre, lors de la perfusion de sang total en concentrations physiologiques en ions divalents aux mêmes flux et à flux plus élevés, les plaquettes de souris déficientes pour la sous-unité β_1 adhèrent normalement au collagène. Les auteurs ont proposé que la GPVI, et pas l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, serait essentielle pour l'adhésion des plaquettes au collagène fibrillaire et que l'affinité de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ pour le collagène serait augmentée par une signalisation « inside-out » déclenchée par la GPVI (**Nieswandt et al. 2001b**). Cependant dans une autre étude, ces mêmes auteurs observent que les thrombi formés par les plaquettes $\beta_1^{-/-}$ sont moins stables et suggèrent que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ soutiendrait la signalisation GPVI en stabilisant l'adhésion au collagène (**Kuijpers et al. 2003**).

Les études de thrombose *in vivo* ont également abouti à des résultats et des conclusions discordants. Dans un modèle de lésion par ligature de la carotide de souris, l'adhésion plaquettaire et la thrombose ne sont pas altérées par la déficience en $\alpha_2\beta_1$ (**Gruner et al. 2003**) suggérant que l'intégrine ne jouerait pas un rôle clef dans la thrombose *in vivo*. Au contraire, dans un modèle de lésion photochimique au Rose de Bengale de la carotide, le temps nécessaire à l'occlusion du vaisseau est prolongé dans les souris $\alpha_2^{-/-}$ (**He et al. 2003**).

b) La GPVI

La GPVI, une glycoprotéine de 62 kDa, a été révélée comme récepteur au collagène par l'identification de patients déficients en GPVI présentant une tendance hémorragique et une agrégation diminuée au collagène (**Arai et al. 1995; Moroi et al. 1989; Takahashi and Moroi 2001; Yagisawa et al. 1994**). Son clonage récent a révélé que la GPVI fait partie de la famille des immunoglobulines et est exprimée spécifiquement dans la lignée

mégacaryocytoplaquettaire (**Clemetson and Clemetson 2001; Jandrot-Perrus et al. 2000**). Elle possède deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline portant sa fonction d'adhésion et un court domaine cytoplasmique (**Clemetson and Clemetson 2001**). La GPVI dimérisée est associée à la chaîne γ des récepteurs Fc (γ RFc), une association nécessaire pour son expression à la surface plaquettaire et pour la signalisation intracellulaire de la GPVI (**Clemetson and Clemetson 2001; Nieswandt et al. 2001a; Tsuji et al. 1997**). L'utilisation d'agonistes spécifiques de la GPVI, comme le peptide CRP (*collagen-related peptide*) ou la convulxine, une protéine extraite d'un venin de serpent, a permis de caractériser cette signalisation (**Jandrot-Perrus et al. 1997; Polgar et al. 1997**). La liaison de collagène (fibrillaire et multimérique), de CRP (répétitions de séquence GPO) ou de convulxine (structure hexamérique) le regroupement des récepteurs et de tyrosine kinases de la famille src générant la phosphorylation des motifs ITAM de la γ RFc (Figure 17) (**Ezumi et al. 1998; Quek et al. 2000**). Ceci conduit au recrutement et à l'autophosphorylation de la tyrosine kinase p72syk, à la formation d'un complexe de signalisation comprenant les protéines adaptatrices LAT, SLP-76 et Gad et à l'activation de la PLC γ 2 (**Asselin et al. 1997; Ichinohe et al. 1995; Poole et al. 1997**). La PLC γ 2 transforme le PtdIns(4,5)P2 en DAG et en InsP3, qui permettent respectivement l'activation d'une PKC et la mobilisation des stocks internes de Ca²⁺. Ces seconds messagers clés vont permettre d'induire des réponses plaquettaires comme le changement de forme, la sécrétion et l'agrégation.

L'étude de plaquettes déficientes en GPVI ou en γ RFc ont montré le rôle clé de ce récepteur dans l'agrégation et l'étalement plaquettaire, la sécrétion, l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et l'activité procoagulante (**Jarvis et al. 2002; Kato et al. 2003; Lecut et al. 2003; Nieswandt et al. 2001b; Poole et al. 1997; Sarratt et al. 2005; Siljander et al. 2004**). Cependant, lorsque les voies d'amplification par l'ADP et le TxA₂ sont bloquées, le changement de forme et la sécrétion des plaquettes au collagène sont inhibés montrant que la signalisation strictement dépendante du collagène est de faible intensité (**Cho et al. 2003; Jarvis et al. 2002; Mangin et al. 2004b; Nieswandt et al. 2002**).

L'inhibition ou la déplétion de la GPVI inhibent la formation du thrombus sur une matrice de collagène en conditions de flux (**Gruner et al. 2003; Kato et al. 2003; Lecut et al. 2003; Massberg et al. 2004b; Nieswandt et al. 2001b; Sarratt et al. 2005**). Ces résultats sont reproduits avec des plaquettes de souris déficientes en GPVI ou en γ RFc (**Kato et al. 2003; Nieswandt et al. 2001b; Sarratt et al. 2005**). Cependant, l'addition de thrombine permet de compenser le défaut des plaquettes de souris déficientes en γ RFc à former des

thrombi sur une matrice de collagène en conditions de flux (500-1800 s⁻¹) (**Mangin et al. 2006**).

Certaines études ont mis en avant un rôle central du récepteur GPVI dans des modèles de thrombose murins. Chez des souris, l'inhibition (dimère de GPVI soluble) ou l'absence de GPVI (par déplétion par JAQ1 ou par déficience génétique) inhibent la thrombose artérielle induite par lésion mécanique (**Massberg et al. 2004b**) ou chimique (**Massberg et al. 2003; Munnix et al. 2005**). D'autres études ont montré au contraire l'absence de défauts dans différents modèles de thrombose dans des artères du mésentère, du crémaster et de la carotide (Folts, lésions électrique, FeCl₃ et induites au laser) pour les souris γ RFc^{-/-} (**Dubois et al. 2006; Mangin et al. 2006**). Les variations de réponse sont difficiles à expliquer mais pourraient provenir de différences dans les modèles de souris utilisés (knock-out, déplétion, GPVI versus γ RFc, ...) et dans les modèles de thrombose (tableau 5) impliquant des territoires vasculaires, des types et des étendues de lésions variés.

L'idée qui semble se dégager est que le blocage unique de la GPVI dans des conditions où le degré d'activation plaquettaire est important notamment en présence de thrombine n'est pas suffisant pour prévenir efficacement la thrombose (**Dubois et al. 2006; Mangin et al. 2006**). Le ciblage de GPVI pourrait être intéressant en association avec d'autres antiplaquettaires ou anticoagulants dans la mesure où il ne semble pas augmenter le temps de saignement (**Kato et al. 2003**) mais potentialiserait leur effet.

D'autres récepteurs plaquettaires au collagène ont été proposés mais leurs rôles dans les réponses plaquettaires n'est pas clairement établi. Des plaquettes de souris déficientes pour la GPV ont une réponse diminuée aux faibles doses de collagène, suggérant que cette glycoprotéine représente un corécepteur au collagène (**Moog et al. 2001**). Des récepteurs spécifiques des collagènes de type I et III ont été décrits mais leur rôle fonctionnel n'a pas été démontré (**Chiang et al. 1997; Chiang and Takayama 2002; Monnet and Fauvel-Lafeve 2000**).

2.2.4. Les récepteurs à la thrombine

La thrombine est la protéase centrale du processus de coagulation et est également le plus puissant activateur des plaquettes.

Le complexe GPIb-V-IX a été le premier récepteur des plaquettes à la thrombine à avoir été proposé. Son absence chez les patients Bernard-Soulier (**Lopez et al. 1998**), le clivage du domaine N-terminal de la GPIb α (**Ward et al. 1996**) ou son blocage par des anticorps (**Mazzucato et al. 1998**) entraînent une réponse diminuée à la thrombine. Quelques études ont montré une activation plaquettaire en réponse à la thrombine dépourvue d'activité enzymatique qui dépendrait de la GPIb α (**Adam et al. 2003; Dubois et al. 2004; Soslau et al. 2001**). Plusieurs mécanismes ont été proposés sans que la voie de signalisation impliquée n'ait été clairement identifiée. La structure 3D de la GPIb α associée à la thrombine a été établie (**Dumas et al. 2003**). La thrombine interagirait avec la boucle cystéine et la région chargée négativement (entre la partie N-terminale et le macroglycopeptide).

Cependant la réponse à la thrombine semble être principalement transmise par la famille des récepteurs PARs (*protease-activated receptor*) couplés aux protéines G. Le premier récepteur identifié PAR1 a mis au jour un mécanisme d'activation tout à fait original (**Vu et al. 1991**). La thrombine clive la partie N terminale extracellulaire du récepteur exposant une nouvelle extrémité N terminale qui va agir à la manière d'un peptide en autoactivant le récepteur (Figure 19). Dans les plaquettes humaines et de souris, d'autres récepteurs PARs, respectivement PAR3 et PAR4, ont été identifiés et les mécanismes d'activation des récepteurs PARs différent entre ces deux espèces (Figure 19) (**Coughlin 2000**). Chez l'homme il semble que PAR1 induise l'activation des plaquettes humaines en réponse aux faibles concentrations de thrombine tandis que PAR4 y contribue seulement en présence de fortes concentrations (**Bernatowicz et al. 1996; Hung et al. 1992; Kahn et al. 1998**). Cette différence est due à une plus grande affinité de la thrombine pour PAR1 qui possède une séquence de type hirudine en aval du site de clivage, absente sur PAR4 (**Kahn et al. 1998; Xu et al. 1998**). Chez la souris, où PAR1 est absent, PAR3 semble fonctionner comme un corécepteur de PAR4 facilitant le clivage et l'activation de PAR4 pour de faibles concentrations de thrombine (**Nakanishi-Matsui et al. 2000**). Les récepteurs PAR1 et PAR4 sont couplés aux protéines G hétérotrimériques G_q et G_{12/13} et dans certains cas aussi à G_i (**Offermanns 2006**) et forment des hétérodimères stables à la surface des plaquettes. Les plaquettes de souris PAR4^{-/-} ne répondent pas à la thrombine et ces animaux sont protégés de la thrombose dans un modèle de lésion au FeCl₃ d'artérioles mésentériques (**Hamilton et al. 2004; Sambrano et al. 2001**) et ont une diminution de la taille des thrombi et de l'expression

de P-sélectine (avec une génération normale de fibrine) dans un modèle de lésion laser d'artérioles du crémaster (Vandendries et al. 2007).

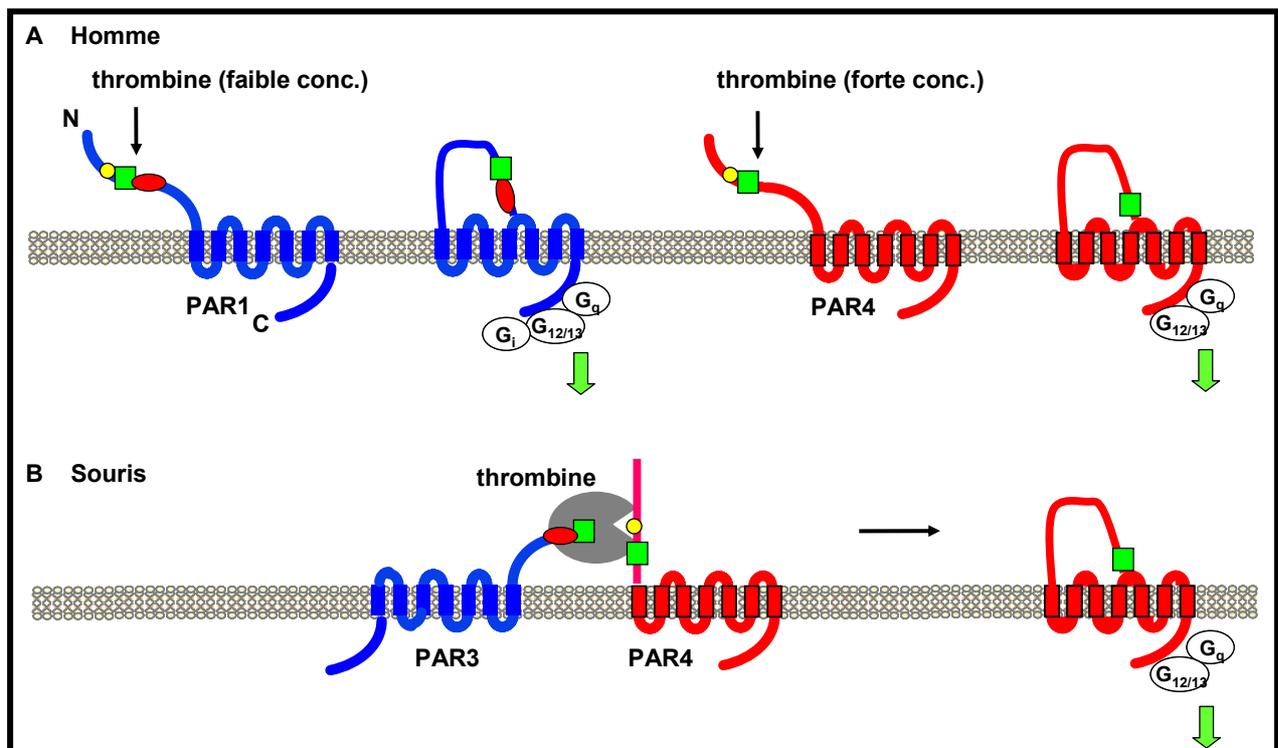


Figure 19 : Signalisation déclenchée par la thrombine. Mécanismes de l'activation par la thrombine des récepteurs plaquettaire PAR humains et murins. A. Les plaquettes humaines expriment les récepteurs PAR1 et PAR4. La thrombine reconnaît le domaine N terminal des récepteurs PARs humains. Elle interagit avec les sites en C terminal de type hirudine et en N terminal du site de clivage à la thrombine. La thrombine clive l'extrémité N terminale des récepteurs PARs et démasque une nouvelle extrémité qui sert de ligand aux récepteurs. Les récepteurs PAR1 et PAR4 peuvent médier de façon indépendante une signalisation déclenchée par la thrombine. B. Les plaquettes de souris expriment les récepteurs PAR3 et PAR4. PAR3 fonctionnerait comme un cofacteur du clivage et de l'activation de PAR4 aux faibles concentrations de thrombine (d'après Coughlin et co. 2000).

Des inhibiteurs ou antagonistes compétitifs dirigés contre les récepteurs PAR1 et PAR4 sont en cours de développement et seront bientôt évalués cliniquement. L'inhibition des hétérodimères PAR1/PAR4 pourrait offrir une protection supérieure contre la thrombose (Leger et al. 2006).

2.3. Rôle de l'ADP et du TxA₂ dans l'amplification de l'activation plaquettaire et la croissance du thrombus

L'adhésion des plaquettes à la paroi lésée s'accompagne d'une activation qui peut entraîner une synthèse de thromboxane A₂ (TxA₂) et la libération d'ADP à partir des granules denses plaquettaires. Ces deux agonistes jouent un rôle amplificateur important permettant

d'assurer une agrégation plaquettaire efficace et une croissance du thrombus au niveau de la brèche vasculaire.

2.3.1. ADP

L'ADP et l'ATP sont présents en fortes concentrations (650 et 440 mM respectivement) dans les granules denses des plaquettes et sont libérés après activation par la thrombine, le collagène ou le TxA₂. Les nucléotides adényliques exercent leurs effets via des récepteurs purinergiques P2 appartenant à deux familles distinctes : les récepteurs P2X, qui sont des canaux ioniques, et les récepteurs P2Y à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Les plaquettes présentent trois récepteurs P2 à leur surface : les récepteurs P2Y₁₂, P2Y₁ et P2X₁ (Figure 20) (**Gachet 2006**).

L'expression du récepteur P2Y₁₂ est restreinte aux plaquettes, aux cellules gliales de certaines régions cérébrales et aux cellules musculaires lisses vasculaires (**Hollopeter et al. 2001; Wihlborg et al. 2004**). P2Y₁₂ est couplé à une protéine G α_{i2} responsable de l'inhibition de l'adénylate cyclase (**Ohlmann et al. 1995**) et aussi à G α_{i3} ou G α_{iz} (**Jantzen et al. 2001**). L'activation de G α_{i2} induit une diminution des taux intracellulaires d'AMPc menant à la déphosphorylation de la protéine VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*), qui lève l'inhibition de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ce récepteur est activé par l'ADP, l'ATP et ses analogues triphosphates étant des antagonistes compétitifs (**Kauffenstein et al. 2004; Park and Hourani 1999**). P2Y₁₂ est la cible des thiénoxydines antiagrégantes plaquettaires (ticlopidine et clopidogrel) (**Gachet et al. 1995; Gachet et al. 1990**). Il est nécessaire à l'activation complète par l'ADP et a également un rôle important dans l'amplification de l'agrégation plaquettaire induite par d'autres agents comme le TxA₂ et la thrombine (**Nieswandt et al. 2002**) P2Y₁₂ est également impliqué dans l'activité procoagulante des plaquettes (**Herault et al. 1999; Leon et al. 2004; Leon et al. 2003**).

Le clopidogrel et les composés de type ARC, qui ciblent P2Y₁₂, sont efficaces dans de nombreux modèles de thrombose chez le chien (**Huang et al. 2000; Wang et al. 2003a; Yao et al. 1994a; Yao et al. 1992**), le singe (**Yao et al. 1993**), le cochon (**Samama et al. 1992**), le lapin (**van Gestel et al. 2003**), le rat (**Bernat et al. 1993; Sturgeon et al. 2006; Umemura et al. 1995**) et la souris (**Nonne et al. 2005; Sturgeon et al. 2006; Wang and Xu 2005**). L'étude *in vivo* des souris déficientes pour le récepteur P2Y₁₂ donne des réponses comparables au traitement clopidogrel (**Andre et al. 2003**).

Le récepteur P2Y₁ est exprimé dans de nombreux tissus dont le cœur, les vaisseaux sanguins, les tissus nerveux, les testicules, les muscles lisses, la prostate et les ovaires (**Janssens et al. 1996; Ralevic and Burnstock 1998**). Ce récepteur est couplé à une protéine G_{αq}, responsable de l'activation de la PLC β et de la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires (**Hechler et al. 1998b; Offermanns et al. 1997**). L'activation de ce récepteur induit un changement de forme et une agrégation transitoire des plaquettes en réponse à l'ADP (**Cattaneo et al. 1992; Hechler et al. 1998a; Hechler et al. 1998b; Nurden et al. 1995**) et il est nécessaire à l'activation normale des plaquettes par l'ADP (**Hechler et al. 1998b; Jin and Kunapuli 1998**).

Les souris traitées par le MRS2179 antagoniste de P2Y₁ ou les souris P2Y₁^{-/-} ont une diminution de la thrombose par rapport aux souris contrôles dans un modèle de lésion au FeCl₃ (**Lenain et al. 2003**). Le traitement de souris par le MRS2500, un antagoniste plus stable et plus puissant que le MRS2179 inhibe fortement la thrombose dans le modèle de lésion artérielle par rayon laser (**Hechler et al. 2006**). La combinaison du MRS2500 et du clopidogrel inhibe totalement la formation du thrombus dans ce même modèle. Ces résultats suggèrent que P2Y₁ pourrait être une cible intéressante en complément des stratégies antiplaquettaires déjà existantes d'autant plus que l'inhibition de P2Y₁ ne prolonge que modérément le temps de saignement.

Le troisième récepteur aux nucléotides des plaquettes est le récepteur P2X₁. Ce récepteur est exprimé au niveau du muscle lisse vasculaire, des plaquettes, du système nerveux et des canaux déférents (**Mahaut-Smith et al. 2000; Ralevic and Burnstock 1998**). Il est très rapidement désensibilisé, en quelques centaines de ms, ce qui rend son étude *in vitro* très délicate (**Vial et al. 1997**). Le récepteur P2X₁ est un récepteur canal activé par l'ATP responsable d'un influx rapide de calcium du milieu extracellulaire dans les plaquettes associé à un changement de forme rapide et transitoire (**Clifford et al. 1998; MacKenzie et al. 1996; Rolf and Mahaut-Smith 2002; Scase et al. 1998; Sun et al. 1998; Vial et al. 1997; Wang et al. 2003b**) dans des conditions proches de l'*in vivo* où les taux d'AMPC intracellulaires sont élevés (**Sage et al. 2000**).

Des souris traités par un antagoniste sélectif NF449 du récepteur P2X₁ ou déficientes pour P2X₁ sont résistantes à la thrombose dans un modèle de lésion localisée induite au laser dans des artérioles mésentériques (**Hechler et al. 2003; Hechler et al. 2005**). Le récepteur P2X₁ pourrait être considéré comme une cible antithrombotique dans des situations où les flux sont élevés tels que les sténoses artérielles.

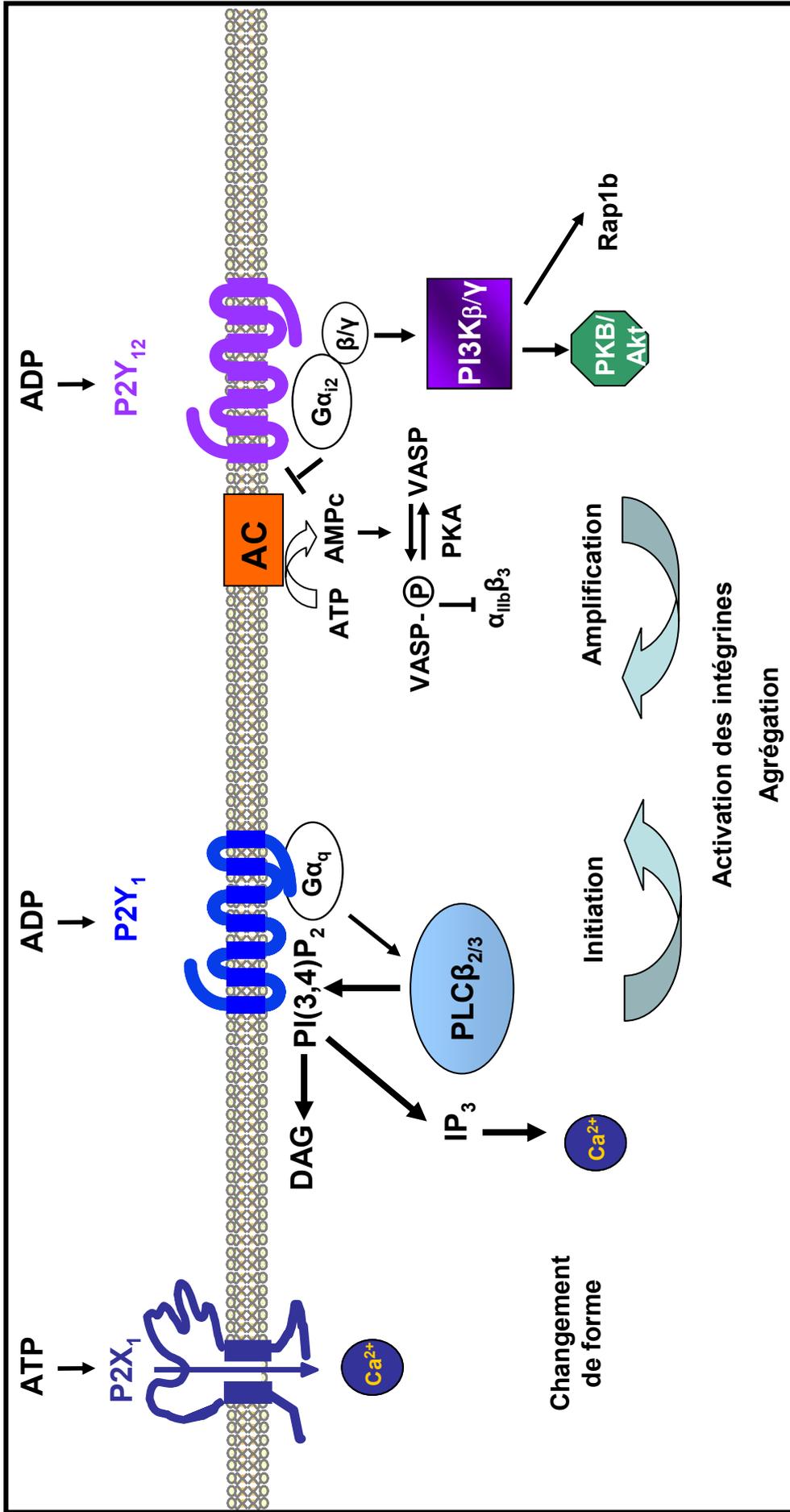


Figure 20 : La signalisation déclenchée par les récepteurs plaquettaires P2. AC : adénylate-cyclase; ADP : adénosine 5'-diphosphate; AMPc: adénosine 3',5'-monophosphate cyclique; ATP : adénosine 5'-triphosphate; DAG : diacyl glycérol; IP3 : inositol (1,4,5)-triphosphate; PK : protein kinase; PI3K : phosphoinositide 3-kinase; PLC : phospholipase C ; VASP : vasodilator-stimulated phosphoprotein (d'aprèsGachet, 2006).

2.3.2. Thromboxane A₂

L'activation des plaquettes par le collagène ou la thrombine, mais pas l'ADP, stimule la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique devient disponible pour la cyclooxygénase-1 (COX-1) puis la thromboxane synthase aboutissant à la production de TxA₂ (Fitzgerald et al. 1987). Le TxA₂ induit l'agrégation irréversible des plaquettes, la vasoconstriction et la prolifération et l'adhésion des CML. L'action du TxA₂ est médiée par les récepteurs TP (récepteur au thromboxane et aux prostanoides) qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Hirata et al. 1991) et qui sont aussi activés par les prostaglandines endopéroxydes PGG₂ et PGH₂. Les récepteurs TP sont exprimés dans de nombreux tissus incluant le thymus, les plaquettes, les poumons, le rein, la rate et le placenta (Namba et al. 1992; Strong et al. 1992). Deux récepteurs TP, α et β , existent et diffèrent par leurs domaines C terminaux. Dans les plaquettes, la forme α du récepteur prédomine et est couplée aux protéines G _{α q} et G _{α 11} (Figure 21) (Habib et al. 1999; Kinsella et al. 1997).

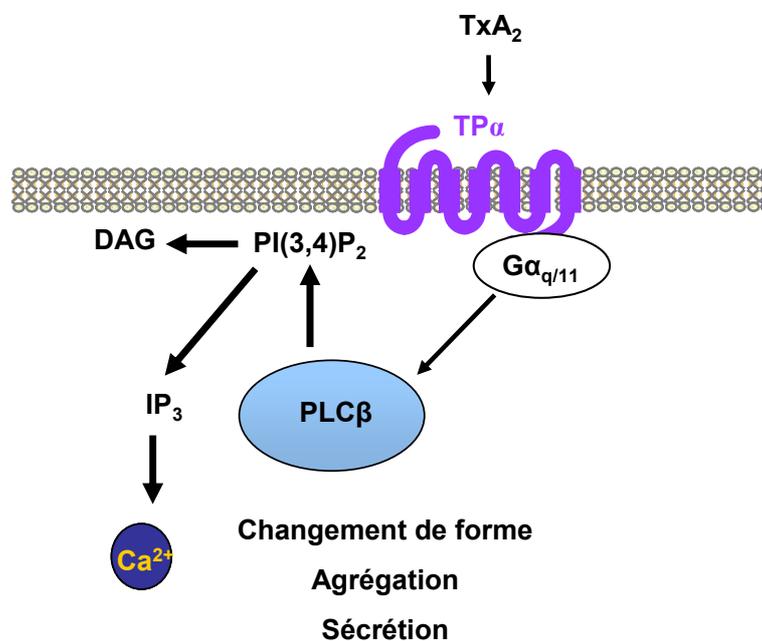


Figure 21 : Signalisation déclenchée par le thromboxane A₂ (TxA₂) via le récepteur TP α prédominant dans les plaquettes. DAG : diacyl glycérol; IP₃ : inositol (1,4,5)-triphosphate; PLC : phospholipase C.

L'action antiplaquettaire de l'aspirine, utilisée dans la prévention des pathologies vasculaires coronaires et cérébrales, est due à l'inhibition irréversible de la COX et par conséquent de la production de TXA₂ (**Fitzgerald et al. 1987**). Dans les modèles animaux, la sensibilité de la thrombose semble varier selon les espèces (la souris est peu sensible) et les modèles utilisés (les CFRs sont généralement inhibés dans le modèle de Folts) (Tableau 6). Des souris déficientes pour le récepteur TP sont résistantes à la thrombose *in vivo* dans un modèle de thromboembolisme systémique intravaculaire par injection d'acide arachidonique ou d'un agoniste spécifique des récepteurs TP, l'U46619 (**Thomas et al. 1998**). Le S18886 (Terutroban®) est un composé actif oralement, antagoniste sélectif et compétitif des récepteurs TP. Les études précliniques du S18886 montrent une inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par l'U46619 ainsi que de la part TxA₂ de l'agrégation induite par d'autres agonistes (**Verbeuren et al. 1999**). Le S18886 a un effet antithrombotique à des doses modérées *in vivo* chez le chien (**Maalej et al. 2005**). D'autres molécules antagonistes du récepteur TP ont aussi montré une certaine efficacité *in vivo* (**Dogne et al. 2004; Tanaka et al. 1998**). Ces molécules, antagonistes aussi des récepteurs TP endothéliaux qui induisent une vasoconstriction et impliqués dans l'athérogenèse (**Kobayashi et al. 2004**), pourraient à la fois bloquer la progression de l'athérosclérose et diminuer la thrombose lors d'une rupture de plaque.

Récepteur ou protéine cible	Traitement	Invalidation génique	Vaisseau	Type de lésion	Observations	Références
GPIIb		<ul style="list-style-type: none"> ▪ GPIIb^{-/-} ▪ GPIIb^{-/-} ▪ GPIIb_α privée de son domaine extracellulaire ▪ GPIIb_α privée de son domaine extracellulaire ▪ GPIIb_α privée de son domaine extracellulaire 	<p>Artériole mésentère</p> <p>Carotide</p> <p>Artériole mésentère</p> <p>Carotide</p> <p>Veinule mésentère</p> <p>Veinule mésentère</p>	<p>Laser superficielle sévère</p> <p>FeCl₃ 20 %</p> <p>FeCl₃ 10 %</p> <p>FeCl₃ 10 %</p> <p>FeCl₃ 10 %</p> <p>Fluorescéine</p> <p>FeCl₃ 20%</p> <p>Ligature</p> <p>FeCl₃ 20%</p> <p>Ligature</p> <p>Laser superficielle sévère</p> <p>Modèle de Folts</p> <p>Modèle électrique</p> <p>Ligature et ressort métallique</p> <p>FeCl₃ 10%</p> <p>Ligature</p> <p>FeCl₃ 5,6 %</p> <p>FeCl₃ 10 %</p> <p>Laser</p>	<p>Taille du thrombus : T</p> <p>Temps d'occlusion : TO</p> <p>Temps formation d'un premier thrombus : T1^{er}</p> <p>Adhésion plaquettaire : Adh</p> <p>T diminué</p> <p>T diminué</p> <p>TO prolongé</p> <p>T diminué</p> <p>Pas d'occlusion</p> <p>TO prolongé</p> <p>TO prolongé</p> <p>TO prolongé</p> <p>Adh inhibée, T diminué</p> <p>TO prolongé</p> <p>Adh inhibée, T diminué</p> <p>T diminué</p> <p>T diminué</p> <p>CFRs inhibés</p> <p>TO prolongé</p> <p>Adh inhibée et T diminué</p> <p>TO prolongé</p> <p>Adh inhibée et T diminué</p> <p>T diminué</p> <p>TO normal, embolisation</p> <p>Pas d'effet</p>	<p>Strassel et al. 2006</p> <p>Strassel et al. 2006</p> <p>Bergmeier et al. 2006</p> <p>Konstantinides et al. 2006</p> <p>Chauthan et al. 2006</p> <p>Yeh et al. 2001</p> <p>Smyth et al. 2001</p> <p>Massberg et al. 2005</p> <p>Smyth et al. 2001</p> <p>Gruner et al. 2003</p> <p>Nonne et al. 2005</p> <p>Nonne et al. 2005</p> <p>Mangin et al. 2006; Sturgeon et al. 2006</p> <p>Mangin et al. 2006; Sturgeon et al. 2006</p> <p>Massberg et al. 2003</p> <p>Massberg et al. 2003</p> <p>Massberg et al. 2004</p> <p>Munnix et al. 2005</p> <p>Konstantinides et al. 2006</p> <p>Dubois et al. 2006</p>
α_{IIb}β₃	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anti-GPIIb (aglistin) ▪ Anti-α_{IIb}β₃ (IB5 fab) ▪ Anti-α_{IIb}β₃ (JON/A F(ab)₂) ▪ Anti-α_{IIb}β₃ (eptifibatide) ▪ Anti-α_{IIb}β₃ (GPI 562) ▪ Anti-α_{IIb}β₃ (GPI 562) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ β₃^{-/-} ▪ α_{IIb}^{-/-} 				
GPVI	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Déplétion de GPVI (JAQ1) ▪ Déplétion de GPVI (JAQ1) ▪ Dimère GPVI sol. ▪ Déplétion de GPVI (JAQ1) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ GPVI^{-/-} ▪ GPVI^{-/-} 				

γRFc		<ul style="list-style-type: none"> ▪ γRFc^{-/-} 	Arrièreole et veinule mésentère Carotide Carotide Artériole mésentère Artériole mésentère Artériole crémaster Artériole mésentère	FeCl ₃ 5,6 % Modèle de Folts Modèle électrique FeCl ₃ 10 % FeCl ₃ 8 % Laser Laser superficielle sévère	T diminué Pas d'effet Pas d'effet T diminué Pas d'effet Pas d'effet T peu diminué Pas de défaut + hirudine : T diminué	Munnix et al. 2005 Mangin et al. 2006 Mangin et al. 2006 Dubois et al. 2006 Dubois et al. 2006 Dubois et al. 2006 Mangin et al. 2006
$\alpha_2\beta_1$		<ul style="list-style-type: none"> ▪ α_2^{+/+} ▪ β_1^{-/-} plaquettes ▪ α_2^{-/-} 	Carotide Carotide Carotide	Ligature Ligature Rose de Bengale	Pas d'effet Pas d'effet TO prolongé	Gruner et al. 2003 Gruner et al. 2003 He et al. 2003
GPV		<ul style="list-style-type: none"> ▪ GPV^{-/-} ▪ GPV^{-/-} 	Artériole mésentère Artériole mésentère	FeCl ₃ 2,8 % FeCl ₃ 2,8 %	Adh diminuée et TO prolongé Thrombose accélérée et embolisation	Moog et al. 2001 Ni et al. 2001
PAR3		<ul style="list-style-type: none"> ▪ PAR3^{-/-} 	Artériole mésentère	FeCl ₃ 2,8 %	TO prolongé	Weiss et al. 2002
PAR4		<ul style="list-style-type: none"> ▪ PAR4^{-/-} ▪ PAR4^{-/-} 	Artériole mésentère Artériole crémaster	FeCl ₃ 2,8 % Laser	TO prolongé T diminué	Sambrano et al. 2001 Vandendries et al. 2007
P2Y₁	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MRS2179 ▪ MRS2500 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ P2Y₁^{-/-} ▪ P2Y₁^{-/-} 	Artériole mésentère Artériole mésentère Artériole mésentère	FeCl ₃ 2,8 % FeCl ₃ 2,8 % Laser superficielle sévère Laser superficielle sévère	T diminué T diminué T diminué, embolisation T diminué, embolisation T diminué, embolisation T diminué, embolisation	Lenain et al. 2003 Hechler et al. 2003 Hechler et al. 2006 Hechler et al. 2006
P2Y₁₂	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Clopidogrel ▪ Clopidogrel ▪ Clopidogrel ▪ Clopidogrel ▪ Clopidogrel ▪ NF449 ▪ Aspirine ▪ Aspirine 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ P2Y₁₂^{-/-} 	Artériole mésentère Artériole mésentère Artériole mésentère Carotide Carotide Carotide Artériole mésentère Artériole mésentère	FeCl ₃ 12,5 % FeCl ₃ 2,8 % Laser superficielle sévère FeCl ₃ 2,5 % et 5 % Modèle de Folts Modèle électrique Laser superficielle Laser superficielle	TI ^{sc} prolongé, embolisation TO prolongé T diminué T diminué TO prolongé CFRs inhibés TO prolongé T diminué T diminué	Andre et al. 2003 Lenain et al. 2003 Nonne et al. 2005 Wang and Xu 2005 Sturgeon et al. 2006 Sturgeon et al. 2000 Hechler et al. 2003 Hechler et al. 2005
TPα			Carotide Artériole mésentère	FeCl ₃ 20 % Laser	Pas d'effet Pas d'effet	Smyth et al. 2001 Nonne et al. 2005
α_2A		<ul style="list-style-type: none"> ▪ α_2A^{-/-} ▪ α_2A^{-/-} 	Artériole mésentère Aorte	FeCl ₃ 20 % Forceps	TO prolongé, embolisation embolisation	Pozgajova et al. 2006 Pozgajova et al. 2006

FW				Artériole mésentère Veinule mésentère	FeCl ₃ 2,8 % FeCl ₃ 10 %	Adh inhibée, T diminué et pas d'occlusion Adh inhibée, T diminué et pas d'occlusion	Denis et al. 1998; Ni et al. 2000 Chauthan et al. 2006
Fg	▪ Anti- Fg		▪ Fg ^{-/-} ▪ Fg ^{-/-} ▪ Chaîne γ mutée en C _t ▪ Chaîne γ mutée en C _t	Artériole mésentère Carotide Carotide Carotide Artériole mésentère	FeCl ₃ 2,8 % FeCl ₃ 20 % FeCl ₃ 20 % FeCl ₃ 20 % FeCl ₃ 2,8 %	T et TO normaux, embolisation TO normal et embolisation TO prolongé, T diminué TO prolongé, T diminué Thrombose accélérée, TO prolongé, embolisation	Ni et al. 2000 Jiroukova et al. 2004 Jiroukova et al. 2004 Jiroukova et al. 2004 Ni et al. 2003
FN			▪ pFN ^{-/-} ▪ pFN ^{+/-} ▪ pFN ^{+/-}	Artériole mésentère Artériole mésentère Veinule mésentère	FeCl ₃ 2,8 % FeCl ₃ 2,8 % FeCl ₃ 2,8 %	TO prolongé, embolisation TO prolongé, embolisation Pas d'effet	Ni et al. 2003 Matuskova et al. 2006 Matuskova et al. 2006
Tsp-I			▪ Tsp-I ^{-/-} ▪ Tsp-I ^{-/-} ▪ Tsp-I ^{-/-} ▪ Tsp-I ^{-/-}	Artériole mésentère Veinule mésentère Veinule mésentère Artériole mésentère	FeCl ₃ 2,8 % A23187 Rose de Bengale Rose de Bengale	Pas d'effet Adh inhibée TO normal, embolisation TO prolongé, embolisation	Ni et al. 2003 Bonnefoy et al. 2006 Bonnefoy et al. 2006 Bonnefoy et al. 2006
P-sélectine /PSGL-1			▪ P-selectine ^{-/-} ▪ PSGL-1 ^{-/-}	Artériole crémaster Artériole crémaster	Laser Laser	Thrombus sans fibrine et FT Thrombus sans fibrine et FT	Falati et al. 2003 Falati et al. 2003

Tableau 5 : Effets de l'inactivation génique ou de l'inhibition pharmacologique de récepteurs plaquettaires et de protéines adhésives dans des modèles de thrombose *in vivo* chez la souris. γRFc: chaîne γ des récepteurs Fe; FW : facteur Willebrand; Fig : fibrinogène; FN: fibronectine; FT : facteur tissulaire; Tsp-I : thrombospondine-1; CFR : *cyclic-flow reduction*; sol : soluble.

2.4. Stabilisation du thrombus, rétraction du caillot et fibrinolyse

Au cours de la formation du clou plaquettaire, une phase de consolidation prévient une désagrégation prématurée. En présence de thrombine complétée par la coagulation, le réseau de fibrine insoluble va permettre de consolider l'agrégat. Le maintien de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans un état activé et la participation de protéines accessoires renforçant la cohésion des agrégats. La rétraction du caillot fibrinoplaquettaire, surtout appréciée *in vitro*, pourrait ensuite intervenir pour stabiliser le thrombus et dans un second temps participerait à la résorption du thrombus résiduel en conjonction avec la fibrinolyse qui entraîne la destruction enzymatique du thrombus fibrinoplaquettaire à des temps plus tardifs.

2.4.1. Activation de la coagulation et stabilisation du thrombus

La stabilisation des agrégats nécessite de maintenir l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans un état activé. Les mécanismes y contribuant ont été évalués essentiellement dans des études *in vitro* et ne sont pas complètement caractérisés (**Prevost et al. 2003**). L'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ peut-être régulée positivement par l'action d'agonistes forts comme la thrombine induisant une agrégation irréversible (à la différence de l'ADP) et négativement par l'augmentation des taux d'AMPc et de GMPc par des substances telles que la PGI₂ et le NO (**Shattil and Newman 2004**). Les agents pharmacologiques et les mutations génétiques chez les souris qui déstabilisent l'agrégation affectent généralement la rétraction du caillot (**Law et al. 1999; Suzuki-Inoue et al. 2006**). Les tétraspanines, des protéines membranaires exprimées à la surface des plaquettes, peuvent se lier aux intégrines et moduler leurs activations. CD151 et TSSC6, membres de la famille des tétraspanines, soutiendraient la signalisation outside-in de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, stabilisant les agrégats (**Goschnick et al. 2006; Lau et al. 2004**). Des souris déficientes en CD151 ou TSSC6 ont une augmentation de l'embolisation et une diminution de la stabilité du thrombus suite à une lésion au FeCl₃.

Lors d'une lésion vasculaire profonde ou lors de l'érosion ou la rupture d'une plaque d'athérosclérose, les mécanismes d'activation des plaquettes et de coagulation sont sollicités simultanément. La coagulation est initiée par le contact du sang avec le FT et la thrombine en est l'enzyme finale (**Boneu and Cazenave 1997**). L'exposition de FT est une étape prépondérante. Celui-ci est présent dans l'adventice d'artère saine, dans la média à la surface

des CML activées ou dans l'ensemble de la paroi des artères athéromateuses. Des données récentes suggèrent qu'une source circulante de FT provenant des plaquettes et de monocytes activés ou de microparticules dérivant de plaquettes et de monocytes pourrait contribuer à la thrombose (Falati et al. 2003; Mackman 2004). Les plaquettes contiendraient l'ARN messager du FT sous forme de précurseur qui serait transcrit et traduit lors de l'activation par des agonistes forts (Camera et al. 2003; Panes et al. 2007; Schwertz et al. 2006) et selon certaines études du FT préformé (Muller et al. 2003; Panes et al. 2007). Le FT se lie aux traces de facteur VIIa circulant et initie le processus de génération de thrombine par une cascade de réactions enzymatiques autoamplifiées. Au final, l'activation du facteur X en Xa assure le clivage de la prothrombine en thrombine au site de la lésion vasculaire. La thrombine catalyse sa propre formation en activant les plaquettes (voir paragraphe 2.3.3.) et les cofacteurs V et VIII. Elle clive les chaînes α et β du fibrinogène libérant les fibrinopeptides A et B et produisant des monomères de fibrine qui se polymérisent et sont stabilisés par le XIIIa (Ariens et al. 2002). La thrombine active également d'autres facteurs de la coagulation comme les facteurs VII et XI, stimule la cellule endothéliale (voir paragraphe 1.2.1), induit la synthèse et l'expression du FT par les CML et les fibroblastes de la paroi (Mackman 1997). La génération de thrombine est contrôlée par le flux sanguin qui empêche son accumulation locale et par des systèmes inhibiteurs comme l'antithrombine, le système protéine C-protéine S-thrombomoduline et le TFPI (inhibiteur de la voie du facteur tissulaire) (Stearns-Kurosawa et al. 1996; Weiler and Isermann 2003)

De nouvelles protéines plaquettaires récemment identifiées pourraient également contribuer à la stabilisation des agrégats plaquettaires.

Gas6 (*growth arrest-specific gene 6*) est exprimée dans de nombreux tissus et est libérée des granules α lors de l'activation des plaquettes. Gas 6 est le ligand des récepteurs à tyrosine kinase Axl, Sky et Mer. La sécrétion de Gas6 et sa liaison aux récepteurs plaquettaires induirait une signalisation menant à l'agrégation irréversible et à la rétraction du caillot (Chen et al. 2004; Gould et al. 2005; Saller et al. 2006). Les souris Gas6^{-/-} ont une diminution de la thrombose par rapport aux souris contrôles suite à une lésion photochimique de la carotide (Angelillo-Scherrer et al. 2001). Les souris déficientes en Gas6 ou en récepteurs Axl, Sky ou Mer sont protégées contre la thrombose dans un modèle de thromboembolisme généralisé par injection de collagène et d'adrénaline et dans un modèle de thrombose veineuse (Angelillo-Scherrer et al. 2005).

Le CD40 ligand (CD40L) est une protéine transmembranaire exprimée à la surface des plaquettes dont l'exodomaine de 18 kDa (sCD40L) est graduellement libéré lors de l'activation plaquettaire. Après activation, le CD40L de surface ou soluble se lierait à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et renforcerait sa signalisation « outside-in ». Les souris déficientes en CD40L soumises à un modèle de thrombose au FeCl₃ ont des défauts de formation et de stabilité du thrombus corrigés par l'injection de sCD40L (**Andre et al. 2002**).

Les Eph kinases appartiennent à la famille des récepteurs à tyrosine kinase et les éphrines sont des protéines de surface. Les plaquettes humaines expriment EphA4 et EphB1 et au moins un ligand, éphrine B1, qui peut lier ces deux récepteurs. Les plaquettes de souris n'expriment pas les Eph kinases et les éphrines. L'interaction des Eph kinases et de leurs ligands membranaires, les Ephrines, a lieu lors de l'agrégation et pourrait soutenir la signalisation « inside-out » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, en activant Rap1B et en phosphorylant la sous-unité β_3 , ce qui stabiliserait le thrombus et contribuerait à sa croissance (**Prevost et al. 2003**). Les contacts Eph-éphrine inhiberaient aussi la rétraction du caillot.

2.4.2. Rétraction du caillot et désagrégation

Tout comme la croissance et la stabilité des agrégats, le processus de désagrégation a surtout été étudié *in vitro* dans l'agrégomètre ou dans des systèmes de perfusion. L'augmentation des taux d'AMPc, la désactivation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, l'action de métalloprotéinases, la désensibilisation des récepteurs aux agonistes solubles ont été proposés comme des mécanismes participant à ce processus (**Shattil et al. 1998**). Les mécanismes qui contrôlent la résorption du thrombus, notamment au niveau artériel, sont très mal connus. Les études dans des modèles de thrombose utilisant la microscopie intravitale commencent à apporter un nouvel éclairage (**Law et al. 1999**). L'observation par microscopie électronique d'un modèle de lésion laser montre que contrairement aux conditions de l'agrégation en présence d'un agoniste où les plaquettes semblent activées de façon homogène, les thrombi formés *in vivo* au contact de la paroi sont hétérogènes avec des zones où les plaquettes sont peu activées et dégranulées et pourraient faciliter l'embolisation/désagrégation du thrombus (**Nonne et al. manuscrit en préparation**). A l'appui de cette observation, dans un modèle de perforation d'artères mésentériques de lapin (**van Gestel et al. 2003**), les thrombi formés au niveau de la paroi sont composés de plaquettes ayant changé de forme et dégranulé. Par contre, les plaquettes composant les emboles ont peu changé de forme et ne sont pas dégranulées.

Le rôle du flux dans les mécanismes de désagrégation du thrombus est également important. Les forces de cisaillement, inversement proportionnelle au diamètre du vaisseau, s'exerçant sur un thrombus seraient plus importantes dans la zone où le thrombus rétrécit la lumière du vaisseau ce qui favoriserait le détachement des plaquettes (**Nesbitt et al. 2006**).

La rétraction du caillot de fibrine implique l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui assure un lien entre le réseau de fibrine et le cytosquelette d'actine (**Shattil et al. 1998; Suzuki-Inoue et al. 2006**). Les mécanismes de rétraction du caillot font intervenir dans une première phase la liaison de la fibrine à l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ puis la signalisation « outside-in » initiant la phosphorylation/déphosphorylation de tyrosines dont celles de la partie cytoplasmique de β_3 et finalement l'activation de l'appareil contractile (actine-myosine) plaquettaire. Des souris dont les deux tyrosines de la partie cytoplasmique de β_3 ont été mutées en phénylalanines ont une rétraction du caillot diminuée et ont tendance à resaigner lors de la mesure du temps de saignement à la queue (**Law et al. 1999**). La rétraction du caillot *in vivo* pourrait donc intervenir dans un premier temps dans la stabilisation du thrombus et participerait également au processus réparatoire.

2.4.3. Fibrinolyse et réparation vasculaire

La fibrinolyse participe à la résorption du thrombus fibrinoplaquettaire par destruction enzymatique du réseau de fibrine et aboutit à la réparation du vaisseau lésé. Ce processus fait intervenir la plasmine qui provient d'un précurseur inactif, le plasminogène. Le t-PA, activateur tissulaire du plasminogène, adsorbé sur le thrombus convertit le plasminogène en plasmine. La plasmine générée au contact du thrombus est dans un premier temps neutralisée par l' α_2 -antiplasmine fixée à la fibrine de façon covalente. Ce phénomène évite une lyse trop précoce du clou hémostatique. Lorsque les capacités d'inhibition de la plasmine par l' α_2 -antiplasmine liée au thrombus sont saturées, l'excès de plasmine protéolyse le fibrinogène et la fibrine (**Booth and Bennett 1994**).

3. Modèles animaux de thrombose artérielle

L'étude des mécanismes impliqués dans le développement des thromboses et l'évaluation de l'efficacité de substances antithrombotiques nécessitent d'établir des modèles expérimentaux dans l'animal. Les études chez l'homme utilisent des échantillons de tissus (vaisseaux) ou des marqueurs biologiques mais il n'est pas possible de manipuler, de modifier génétiquement ou d'examiner *in vivo* les mécanismes biologiques. *i*) des facteurs matériels et techniques *ii*) la pertinence du modèle vis à vis de la pathologie thrombotique chez l'homme *iii*) l'espèce animale utilisée *iv*) le lit vasculaire considéré et les conditions hémodynamiques *v*) la nature et la sévérité de la lésion vasculaire peuvent influencer l'interprétation des résultats.

Les grands animaux (porc, chien, singe) ont été les premiers à être utilisés pour évaluer l'efficacité de nouvelles substances antithrombotique (**Leadley et al. 2000**). Ils présentent comme avantage une grande taille permettant d'opérer sur des vaisseaux tels que les artères coronaires ayant des caractéristiques proches des vaisseaux humains. De plus, le porc et les primates sont des animaux susceptibles de développer spontanément des lésions d'athérosclérose, contrairement aux rongeurs. Cependant, le coût et l'infrastructure nécessaires pour élever ces animaux et la difficulté à les manipuler génétiquement sont des inconvénients à leur utilisation. Aujourd'hui, ces animaux sont utilisés dans les essais précliniques lorsque les essais préliminaires sur rongeurs donnent des résultats concluants (**Johnson et al. 1999**).

Ce dernier chapitre traitera plus particulièrement des modèles de thrombose artérielle développés dans la souris. Les modèles seront décrits ainsi que leur sensibilité aux traitements antiplaquettaires (aspirine, ticlopidine, clopidogrel et inhibiteur de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$) et anticoagulants (héparines, hirudine) (Tableau 6) (**Bhatt and Topol 2003; Gachet et al. 2006b**).

Modèle de thrombose	Vaisseau	Animal	Traitement	Effet CFR : <i>cyclic-flow reduction</i> Taille du thrombus : T Temps d'occlusion : TO Temps formation d'un premier thrombus : T1 ^{er} Adhésion plaquettaire : Adh	Références
Folts	Carotide	Souris	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$ ▪ Clopidogrel 	CFRs inhibés	Sturgeon et al. 2006
	Carotide	Rat	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Clopidogrel 	CFRs inhibés	Sturgeon et al. 2006
	Carotide	Lapin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Clopidogrel ▪ Aspirine 	CFRs inhibés	Sturgeon et al. 2006
	Carotide	Hamster	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$ 	CFRs inhibés	Coller et al. 1986
	Carotide	Cobaye	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Héparine ▪ Hirudine ▪ Aspirine 	CFRs légèrement diminués (10 %) CFRs légèrement diminués (20 %)	Roux et al. 1994 Roux et al. 1994
	Coronaire	Chien	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aspirine ▪ Abciximab ▪ Tirofiban ▪ Héparine 	CFRs inhibés CFRs inhibés CFRs légèrement diminués à sans effet	Roux et al. 1994 Coller et al. 1986 Lynch et al. 1995
	Fémorale	Cochon	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Enoxaparine ▪ Aspirine ▪ Clopidogrel 	CFRs inhibés CFRs inhibés CFRs inhibés	Folts et al. 1976 ; Leadley et al. 1998 Leadley et al. 1998
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aspirine ▪ Clopidogrel 	Pas d'effet	Folts et al. 1976 Yao et al. 1992
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aspirine ▪ Clopidogrel 	CFRs inhibés	Samama et al. 1992 Samama et al. 1992
	Fémorale	Singe	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$ 	CFRs inhibés	Wu et al. 2002
	Carotide	Singe	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Abciximab 	CFRs inhibés	Coller et al. 1986
Lésion mécanique - ligature - ballonnet - ressort métallique - perforation de la paroi	Carotide	Souris	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$ 	Adh inhibée, T diminué et pas d'occlusion	Gruner et al. 2003
	Carotide	Lapin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Clopidogrel ▪ Clopidogrel +aspirine 	T diminué Inhibition de la thrombose	Herbert et al. 1998 Herbert et al. 1998
	Coronaire	Chien	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Héparine ▪ Aspirine 	TO prolongé Pas d'effet	Bush and Shebuski 1990 Bush and Shebuski 1990
	Carotide	Chien	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Héparine 	TO prolongé	Kordenat et al. 1972
	Artériole mésentère	Lapin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Clopidogrel 	T diminué, embolisation	van Gestel et al. 2003
Lésion électrique	Carotide	Souris	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$ ▪ Clopidogrel 	TO prolongé TO prolongé	Sturgeon et al. 2006 Sturgeon et al. 2006
	Carotide	Rat	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aspirine ▪ Hirudine 	Pas d'effet TO prolongé	Bernat et al. 1993 Bernat et al. 1993
	Coronaire	Chien	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Clopidogrel ▪ Ibuprofène 	TO prolongé T diminué et arythmie cardiaque diminuée	Bernat et al. 1993 Romson et al. 1980
	Coronaire	Cochon	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aspirine 	Pas d'effet	van der Giessen et al. 1988
Lésion photoinduite					

- Bleu Evans		Artériole mésentère	Rat	▪ Aspirine	Augmentation du nombre de tirs	Nagamatsu et al. 1999
- Rose de Bengale		Artère fémorale	Souris	▪ Aspirine	TO prolongé	Kondo et al. 2002
		Artère cérébrale moyenne	Rat	▪ Clopidogrel	Zone ischémisée diminuée	Umemura et al. 1995
		Artère fémorale	Rat	▪ Héparine	TO prolongé	57 Matsuno et al. 1991
Lésion au FeCl₃	20 %	Carotide	Souris	▪ Anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$	TO prolongé	Smyth et al. 2001
	20 %	Carotide	Souris	▪ Aspirine	Pas d'effet	Smyth et al. 2001
	2,5-5 %	Carotide	Souris	▪ Héparine	TO prolongé	Wang and Xu 2005
	2,5-5 %	Carotide	Souris	▪ Clopidogrel	TO prolongé	Wang and Xu 2005
	8 %	Artériole mésentère	Souris	▪ Hirudine	T ^{1er} prolongé	Dubois et al. 2006
	5 %	Carotide	Rat	▪ Héparine	TO faiblement prolongé	Broersma et al. 1991
Lésion au laser		Artériole mésentère	Souris	▪ Anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ ▪ Hirudine ▪ Aspirine ▪ Clopidogrel ▪ Hirudine	T diminué T diminué pour la lésion sévère Pas effet T diminué T diminué	Nonne et al. 2005 Nonne et al. 2005 Nonne et al. 2005 Nonne et al. 2005 Dubois et al. 2006
		Artériole crémaster	Souris	▪ Aspirine ▪ Aspirine ▪ Dipyridamole ▪ Ticlopidine	Pas effet Nombre d'embolies diminué T diminué T diminué	Weichert et al. 1983 Aguejof et al. 2000 Weichert et al. 1983 Weichert et al. 1983
		Artériole mésentère	Rat	▪ Aspirine ▪ Aspirine ▪ Dipyridamole ▪ Ticlopidine	Pas effet Nombre d'embolies diminué T diminué T diminué	Weichert et al. 1983 Aguejof et al. 2000 Weichert et al. 1983 Weichert et al. 1983

Tableau 6 : Caractérisation pharmacologique des modèles de thrombose artérielle dans différentes espèces animales.

3.1. Intérêts et limites des modèles murins, précautions dans l'interprétation des résultats

L'utilisation de rongeurs et notamment de la souris présentent certains avantages. La petite taille de ces animaux est un atout pour des expérimentateurs étudiant l'effet *in vivo* d'un composé cher ou difficile à produire en quantité. La souris se reproduit rapidement, produit une descendance nombreuse et les principales lignées sont très bien caractérisées génétiquement. Cependant, sa taille réduite impose des difficultés techniques pour reproduire des modèles mimant des pathologies vasculaires humaines.

L'obtention maintenant bien maîtrisée et en nombre croissant de souris génétiquement modifiées va permettre de manipuler et d'évaluer de manière quasi exhaustive le rôle des différents acteurs de l'hémostase. Ces progrès ont stimulé le développement de modèles expérimentaux de thrombose dans cette espèce (**Denis and Wagner 2007; Jackson and Schoenwaelder 2003; Ware 2004**). Les analyses histologiques existantes ont révélé que la structure des thrombi dans la souris était similaire à celle des thrombi formés chez l'homme (**Farrehi et al. 1998**). L'inactivation dans la souris de gènes pour lesquels une pathologie existe chez l'homme (thrombasthénie de Glanzmann, syndrome de Bernard Soulier, afibrinogénémie...) a permis de reproduire les principaux phénotypes attachés à ces pathologies. De plus, les médicaments antiplaquettaires et anticoagulants utilisés couramment en clinique inhibent également la thrombose dans la souris. Ces résultats indiquent que l'hémostase et la thrombose dans les modèles murins présentent des similitudes avec l'homme et légitime leur utilisation pour étudier les mécanismes d'initiation et de croissance du thrombus.

Malgré tout, des différences d'espèces homme/souris sont à considérer dans l'interprétation des résultats et doivent mettre en garde contre l'extension à la pathologie humaine (**Tsakiris et al. 1999**). Le compte plaquettaire dans la souris est 4 fois plus élevé ($1\ 100 \cdot 10^3$ plaquettes/ μl) que celui de l'homme alors que le volume plaquettaire ($5\ \mu\text{m}^3$) correspond à la moitié du volume plaquettaire humain. La durée de vie des plaquettes est plus courte chez la souris (3 à 4 jours) que chez l'homme (8 à 10 jours) et les paramètres cardiovasculaires sont différents entre les deux espèces (fréquence cardiaque moyenne de 550 battements/min au lieu de 70 chez l'homme). La réactivité des plaquettes de souris à certains agonistes, comme la sérotonine, est réduite par comparaison aux plaquettes humaines et la

combinaison de récepteurs PAR à la thrombine ainsi que leur fonctionnement différent entre la souris et l'homme (voir paragraphe 2.3.3.).

La taille réduite de la souris impose des difficultés pour reproduire des lésions vasculaires en pathologie humaine ou lésion des artères coronaires.

Ensuite, les modèles classiquement utilisés mettent en jeu la formation d'un thrombus dans un vaisseau sain alors qu'il survient en pathologie dans un vaisseau « malade » au niveau de lésions d'athérosclérose. Les rongeurs ne développent pas spontanément de lésions d'athérosclérose (**Dorffler-Melly et al. 2000; Johnson et al. 1999**). Cet inconvénient a toutefois été pallié en utilisant des souris déficientes pour l'apolipoprotéine E (apoE) ou en récepteur des lipoprotéines de faible densité (rLDL). Ces souris développent spontanément des lésions d'athérosclérose, un processus qui peut-être amplifié et accéléré par administration d'un régime enrichi en graisses (**Ishibashi et al. 1993; Zhang et al. 1992**). Les souris rLDL^{-/-} présentent des lésions intimaux fibro-cellulaires tandis que les souris apoE^{-/-} ont des lésions plus hétérogènes et riches en lipides dont la composition est proche de celles qui se développent chez l'homme (**Ishibashi et al. 1993; Nakashima et al. 1994**).

Une autre difficulté à considérer dans les modèles de souris, source potentielle de variabilité et de difficulté d'interpréter les résultats, concerne les variabilités entre différents fonds génétiques de souris. Des différences de numération plaquettaire, de nombre de récepteurs plaquettaires, de réponse aux tests de coagulation et réponses thrombotiques existent entre souris provenant de différents fonds génétiques (**Li et al. 2004; Peters et al. 2002; Tsakiris et al. 1999**). Des différences en terme de réponse thrombotique ont été observées pour un même défaut génétique dans différents laboratoires (**Jirouskova et al. 2004; Moog et al. 2001; Ni et al. 2000; Ni et al. 2003a; Ni et al. 2001**). Hors, ces lignées étaient sur des fonds mixtes suggérant que les différences observées pouvaient être sans lien avec les mutations examinées. Ces résultats devraient imposer le recours systématique aux croisements en retour (backcross) pour obtenir des souris ayant un fond génétique quasiment pur.

D'autres causes de variabilité comme le sexe, l'âge, l'état sanitaire, les méthodes d'anesthésie et les modifications des constantes cardiovasculaires, de température corporelle ou de niveau d'oxygénation peuvent perturber les réponses et fausser les interprétations (**Lindenblatt et al. 2005; Martini 2007; Shimokawa et al. 2003**).

Dans les faits, la majorité des modèles publiés et couramment utilisés ne remplissent pas toutes les conditions d'un modèle « idéal » énumérées plus haut.

3.2. Modèle de type Folts

En 1976, Folts et al. décrivent un modèle reproduisant un angor instable sur une artère coronaire de chien anesthésié à thorax ouvert (Folts et al. 1976). Ce modèle a ensuite été adapté à d'autres espèces animales (singe, cochon, cobaye, hamster, lapin, rat) et sur d'autres territoires vasculaires (artères fémorales, carotides) (Bevilacqua et al. 1991; Coller et al. 1986; Golino et al. 1998; Roux et al. 1994; Samama et al. 1992; Sturgeon et al. 2006; Wu et al. 2002).

Dans ce modèle, un segment d'artère est clampé afin d'endommager la paroi vasculaire. Un cylindre constricteur est ensuite placé autour du vaisseau au niveau de la lésion afin de provoquer une sténose correspondant à au moins 50% de réduction du diamètre de l'artère (Figure 22). Une diminution rapide du flux sanguin, correspondant à la formation d'un thrombus plaquettaire, est mise en évidence à l'aide d'un débitmètre placé en aval. Le flux est ensuite rétabli soit par évacuation spontanée du thrombus, soit par son délogement manuel. Des cycles de diminution/restauration du flux (CFR : *Cyclic Flow Reduction*) peuvent ainsi être observés durant plusieurs heures. Les paramètres évalués sont l'occurrence de la restauration spontanée du flux, et l'obtention et le nombre de réapparitions des CFRs.

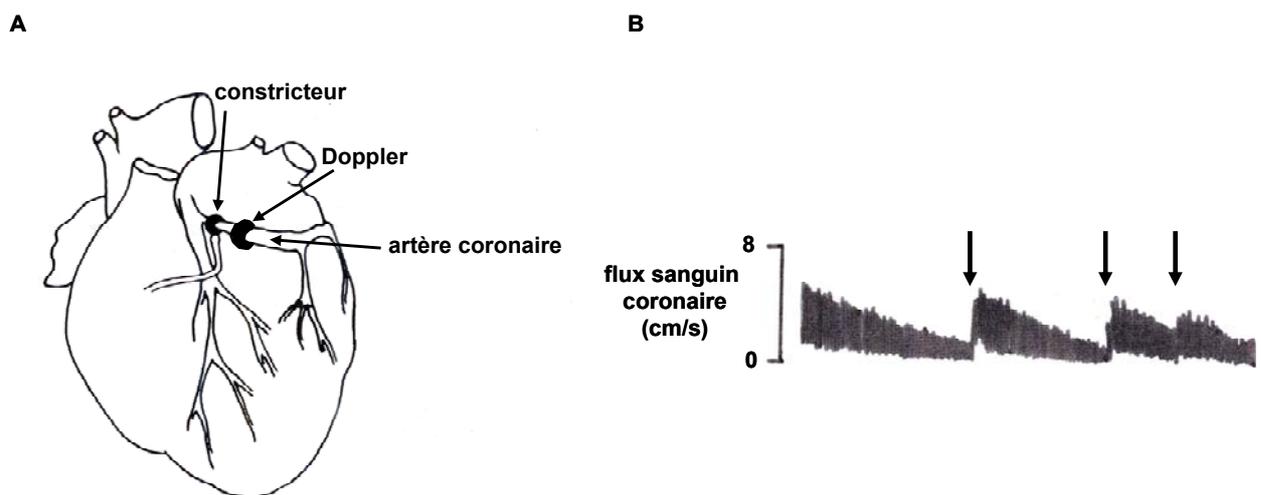


Figure 22 : Modèle de Folts. A. Un segment d'artère est clampé afin d'endommager la paroi de l'artère coronaire. Un cylindre constricteur est ensuite placé autour du vaisseau au niveau de la lésion afin de provoquer une sténose correspondant à au moins 50% de réduction du diamètre de l'artère. Un débitmètre Doppler placé en aval de la lésion permet de mesurer les variations de flux sanguin. B. Le flux diminue dans l'artère au fur et à mesure que le thrombus se développe. Lorsqu'il est délogé ou qu'il embolise, le flux sanguin est restauré (flèches) (d'après Golino, 2002).

L'analyse histologique des artères coronaires de chien soumises à ce modèle montre une lésion de l'intima avec des zones de désendothélialisation et la présence de thrombi riches en plaquettes (**Aiken et al. 1981; Bush and Shebuski 1990; Folts et al. 1976**).

En général les médicaments antiplaquettaires empêchent ou diminuent les CFRs (Tableau 6). L'aspirine a un effet variable selon les études et les doses administrées (**Aiken et al. 1981; Folts et al. 1976; Golino et al. 1992; Roux et al. 1994; Samama et al. 1992; Sturgeon et al. 2006**). Les anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ (**Coller et al. 1986; Lynch et al. 1995; Mousa et al. 1996; Wu et al. 2002**) et le clopidogrel (**Samama et al. 1992; Yao et al. 1992**) inhibent les CFRs dans ce modèle dans différentes espèces animales. Les anticoagulants (héparine, hirudine) diminuent faiblement les CFRs (**Folts et al. 1976; Leadley et al. 1998; Roux et al. 1994**).

Bien que techniquement délicat chez un petit animal, ce modèle est applicable à la souris (**Sturgeon et al. 2006**) avec une inhibition des CFRs par un anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le clopidogrel (**Mangin et al. 2006; Sturgeon et al. 2006**).

3.3. Modèles de lésion mécanique

Plusieurs modèles de lésion vasculaire mécanique ont été décrits. Il s'agit de modèles d'écrasement du vaisseau à l'aide de clamps (**Bagdy et al. 1992**) et de forceps chirurgicaux (**McBane et al. 1995**) ou compression par ballonnets (**Herbert et al. 1998; Lin et al. 2003; Reddick et al. 1982; Suarez and Jacobson 1961; van Erven et al. 1992**) ou de ressorts métalliques passés à l'intérieur du vaisseau (**Bergmann et al. 1983; Blair et al. 1964; Cercek et al. 1986; Fay et al. 1996; Kordenat et al. 1972; Leidy et al. 1990; Van de Werf et al. 1987**). L'artère fémorale et la carotide de nombreuses espèces animales (rats, lapin, cochon, primate) sont généralement les vaisseaux utilisés dans ces modèles. Un autre modèle de lésion mécanique par perforation de la paroi d'artères mésentériques de lapin à l'aide d'une micropipette en verre a également été décrit (**oude Egbrink et al. 1988; van Gestel et al. 2003**).

Le paramètre généralement évalué est le temps d'occlusion de l'artère par la mesure de la température ou du flux sanguin grâce à un débitmètre Doppler en aval de la lésion. Une analyse histologique de la paroi du vaisseau par microscopie électronique permet d'analyser l'adhésion plaquettaire au site de lésion (**Lin et al. 2003; van Erven et al. 1992**). L'analyse histologique des artères fémorales de chien lésées par le passage d'un ressort métallique

montre un thrombus riche en plaquettes contenant des globules rouges et de la fibrine (**Bush and Shebuski 1990**). La taille du thrombus a été évaluée indirectement par quantification de la radioactivité au site de lésion de plaquettes marquées à l'indium (^{111}In) (**Herbert et al. 1998; McBane et al. 1995**). Dans la perforation de la paroi artérielle chez le lapin, les paramètres évalués par microscopie intravitale sont le temps de saignement, la hauteur du thrombus formé, le nombre d'embolies formés, l'occlusion de l'artère et la durée d'embolisation (**oude Egbrink et al. 1988; van Gestel et al. 2003**).

Les lésions mécaniques sont difficiles à calibrer et hétérogènes en profondeur causant par endroits une lésion superficielle par dénudation de l'endothélium ou une lésion plus profonde atteignant la média (**Reddick et al. 1982**).

L'héparine prolonge le temps d'occlusion des coronaires et carotides de chien lésées par le passage d'un ressort métallique tandis que l'aspirine n'a pas d'effet sur la thrombose coronarienne (**Bush and Shebuski 1990; Kordenat et al. 1972**). Le clopidogrel induit une diminution de la taille du thrombus formé suite à une lésion par ballonnet dans une carotide de lapin. L'association clopidogrel/aspirine amplifie l'effet du clopidogrel et inhibe la thrombose dans ce modèle (**Herbert et al. 1998**). Le clopidogrel induit une inhibition significative de la taille des thrombi formés et de leur embolisation dans le modèle de perforation de paroi artérielle chez le lapin (**van Gestel et al. 2003**).

Dans la souris, une lésion mécanique de la carotide peut-être induite par passage d'un ressort métallique ou par une ligature externe temporaire et induit une dénudation de l'endothélium (**Gruner et al. 2003; Massberg et al. 2003; Massberg et al. 2004a; Moers et al. 2003**). L'aorte peut aussi être lésée par des forceps chirurgicaux (**Pozgajova et al. 2006**). L'utilisation de sondes fluorescentes permet d'évaluer le nombre de plaquettes et d'agrégats qui adhèrent au site de lésion. L'adhésion des plaquettes et la formation d'un thrombus au site de lésion induite par une ligature vive de la carotide sont inhibées par un anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (**Gruner et al. 2003**).

3.4. Modèle électrolytique

En 1961, Salazar et al. mettent au point une technique pour induire une thrombose coronarienne dans laquelle un courant est délivré dans la lumière d'une artère coronaire de chien par une électrode en acier inoxydable, placée sous fluoroscopie sans ouvrir l'animal (Figure 23) (**Salazar 1961**).

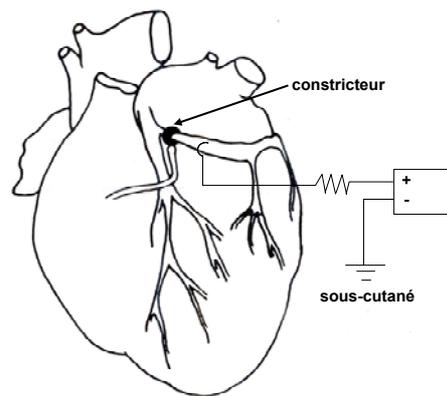


Figure 23 : Modèle de lésion électrique. La cathode est placée dans la lumière du vaisseau et l'anode en position hypodermique. Un constricteur peut en plus être placé sur le trajet de l'artère afin de créer une sténose.

La procédure est simplifiée par Romson et al. qui placent directement l'électrode dans l'artère coronaire d'un chien anesthésié et au thorax ouvert (**Romson et al. 1980**). L'électrode peut-être aussi placée à la surface du vaisseau et est alors associée à une sténose (**Schumacher et al. 1985**). Le modèle de thrombose électrolytique a été aussi appliqué aux artères fémorale (**McClanahan et al. 2000**) et carotidienne (**Markland et al. 1994; Mousa et al. 1999**) de chien, aux coronaires de cochon (**van der Giessen et al. 1988**) et à la carotide de rat (**Guarini et al. 1996; Schumacher et al. 1993**). Pour la lésion coronarienne, l'arythmie cardiaque est évaluée par suivi télémétrique et la taille et la composition du thrombus par étude histologique (**Bush and Shebuski 1990; Romson et al. 1980**). Pour la carotide, le temps d'occlusion peut-être évalué grâce à la mesure de la température de l'artère ou du débit artériel en aval du site de lésion (**Guarini et al. 1996; Schumacher et al. 1993**).

Le stimulus électrique crée une lésion sévère avec dénudation de l'endothélium et destruction des CML de la média chez le chien et le rat (**Bernat et al. 1993; Bush and Shebuski 1990; Romson et al. 1980**). Le thrombus formé est composé de plaquettes dégranulées, de globules rouges et de fibrine.

Chez le chien, l'ibuprofène diminue la taille du thrombus et l'arythmie causée par la thrombose des artères coronaires (**Romson et al. 1980**). L'aspirine n'a pas d'effet sur la thrombose coronarienne chez le cochon (**van der Giessen et al. 1988**). Le clopidogrel et l'hirudine mais pas l'aspirine inhibent l'occlusion de carotides de rat (**Herbert et al. 1998**).

La technique de lésion électrolytique a été étendue à la carotide de souris (**Mangin et al. 2006; Sturgeon et al. 2006**). La formation d'un thrombus mural, riche en plaquettes, est inhibée par un traitement clopidogrel ou anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$.

3.5. Modèle de lésion photoinduite

Dans ce modèle, un colorant (Rose de Bengale, fluorescéine ou bleu Evans) est injecté dans la circulation et un rayon laser ou un faisceau de lumière fluorescente (λ_{ex} 620 nm pour le bleu Evans, 540 nm pour le Rose de Bengale et 520 nm pour la fluorescéine) est focalisé sur le vaisseau et va induire une réaction photochimique (**Angelillo-Scherrer et al. 2001; He et al. 2003; Kawasaki et al. 1999; Lindenblatt et al. 2003; Matsuno et al. 1991; Saniabadi et al. 1995; Sato and Ohshima 1984; Umemura et al. 1995; Yamashita et al. 1997; Yeh et al. 2001; Zhu et al. 2003**). Ce modèle n'est appliqué qu'aux rongeurs car il est réalisé sous microscope et sur des vaisseaux laissant passer le rayon laser ou fluorescent. Les vaisseaux concernés sont la carotide, les artères fémorales, cérébrales et les vaisseaux du mésentère et du crémaster.

Les paramètres mesurés varient en fonction du territoire vasculaire lésé. Pour la carotide, le temps d'occlusion est déterminé par suivi du débit artériel grâce à un débitmètre Doppler (**Angelillo-Scherrer et al. 2001; Zhu et al. 2003**). Pour les artérioles du mésentère ou du muscle crémaster, la thrombose est suivie par microscopie intravitale, permettant de déterminer le temps de formation d'un premier thrombus et le temps d'occlusion (**Lindenblatt et al. 2003; Sato and Ohshima 1984**). L'utilisation de sondes fluorescentes permet de suivre l'évolution de la thrombose et de mesurer la surface des thrombi (**Kawasaki et al. 1999**). Pour une artère cérébrale, l'adhésion plaquettaire et le temps d'occlusion sont suivis par microscopie intravitale et la taille de la zone cérébrale ischémisée peut être évaluée par histologie assimilant ce modèle à un modèle d'accident vasculaire cérébral (**Rosenblum et al. 1994; Umemura et al. 1995**).

La photoactivation du Rose de Bengale induit, par transfert d'énergie, la formation d'une molécule de dioxygène singulet 1O_2 qui s'accumule dans les bicouches lipidiques des cellules ou de radicaux libres endommageant l'endothélium. Ces réactions n'expliquent pas complètement les dommages vasculaires observés par les études histologiques (**Saniabadi et al. 1995; Vandeplassche et al. 1990**). L'analyse histologique d'artère fémorale de cobaye ou de rat montre une destruction de l'endothélium avec le Rose de Bengale correspondant à la

surface d'illumination. Le thrombus est composé de plaquettes, de globules rouges et de fibrine (**Matsuno et al. 1991; Saniabadi et al. 1995; Sato and Ohshima 1984**).

Les modèles de lésion photoinduite ont été très peu caractérisés pharmacologiquement et l'ont été principalement chez le rat. Pour le Rose de Bengale, le clopidogrel induit une diminution significative de la taille de la zone cérébrale ischémisée (**Umemura et al. 1995**), l'héparine diminue la taille du thrombus formé dans l'artère fémorale (**Matsuno et al. 1991**). Pour le bleu Evans, le traitement par l'aspirine a un effet antithrombotique dans les artérioles mésentériques (**Nagamatsu et al. 1999**). Chez la souris, le temps d'occlusion de l'artère fémorale est prolongé par l'aspirine (**Kondo et al. 2002**).

3.6. Modèle au FeCl₃

Ce modèle est le plus utilisé chez les rongeurs, car il est simple à mettre en œuvre sur des animaux de petite taille. Il a permis de mettre en évidence le rôle de nombreuses protéines et récepteurs impliqués dans les mécanismes d'hémostase et de thrombose (Tableau 5). Les artères ciblées peuvent être de diamètre important (artères carotides, fémorales), auquel cas le FeCl₃ est appliqué à l'aide d'un papier filtre imbibé de la substance chimique (Figure 24) (**Farrehi et al. 1998**). Une sonde Doppler ou la mesure de température de l'artère permettent d'évaluer l'arrêt du flux sanguin et de déterminer le temps d'occlusion (**Jirouskova et al. 2004; Smyth et al. 2001**). Après sacrifice de l'animal, le thrombus formé peut aussi être recueilli, son poids pouvant être mesuré et sa structure histologique examinée (**Kurz et al. 1990; Zhu et al. 1999**). Pour les artérioles (mésentère, crémaster), la lésion vasculaire peut être par superfusion d'une solution de FeCl₃ (Figure 25) (**Denis et al. 1998**) ou à l'aide d'un papier filtre imbibé (**Dubois et al. 2006; Pozgajova et al. 2006**). La thrombose peut être suivie par microscopie après injection de plaquettes fluorescentes, et des paramètres tels que le temps d'occlusion, le temps de formation du premier thrombus, l'embolisation ou la taille du thrombus peuvent être appréciés (**Andre et al. 2003; Denis et al. 1998**).

L'utilisation du FeCl₃ dérive en fait du modèle par application d'un courant électrique, utilisant des électrodes en fer. Dans ce dernier, la formation d'un thrombus dépend d'espèces réactives de fer générées par les électrodes appliquées sur la surface externe de la carotide de rat (**Kurz et al. 1990**). Il est probable que l'application de FeCl₃ induise la lésion vasculaire par des mécanismes similaires (**Farrehi et al. 1998**). Ceux-ci ne sont pas bien connus mais feraient intervenir la formation d'espèces réactives oxydantes qui endommageraient les



Figure 24 : Thrombose carotidienne induite par le FeCl_3 dans la souris. La carotide d'une souris anesthésiée est disséquée et isolée du tissu environnant par un morceau plastique noir. Un morceau de papier filtre imbibé de FeCl_3 est appliqué sur l'adventice afin d'induire la formation d'un thrombus. Un débitmètre est placé autour du vaisseau en amont du site de lésion.

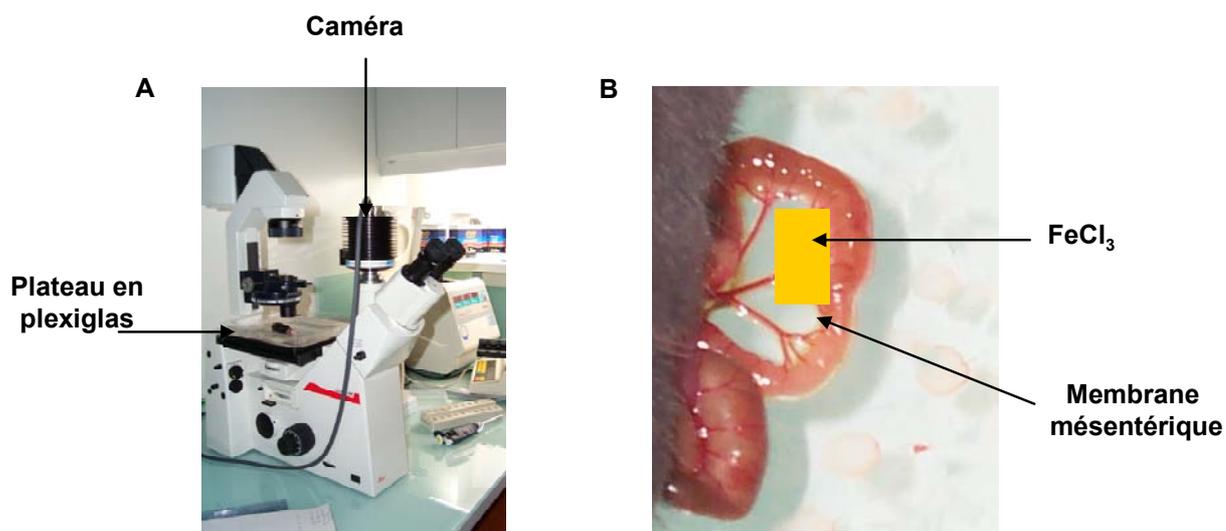


Figure 25 : Modèle de lésion au Chlorure de Fer sur artères mésentériques de souris. A. L'animal anesthésié est placé directement sous le microscope sur un plateau en plexiglas. B. La membrane mésentérique est transparente et richement vascularisée. Une goutte de FeCl_3 est déposée sur la membrane mésentérique. Les vaisseaux sont observés au microscope. Une caméra permet d'enregistrer le déroulement de la thrombose en temps réel.

cellules (**Balla et al. 1990**). Selon les vaisseaux et les concentrations de FeCl₃ utilisées, les lésions de la paroi peuvent induire la desquamation de l'endothélium ou également affecter les CML de la média (**Konstantinides et al. 2001; Ni et al. 2000; Tseng et al. 2006**). Des variations de réponses thrombotiques ont été observées dans différents laboratoires qui pourraient être dues à des différences de concentrations de FeCl₃ ou de temps de lésion aboutissant à l'exposition de matrices de nature différentes (**Wang and Xu 2005**).

Ce modèle a été peu caractérisé histologiquement et les modifications chimiques des protéines de la paroi ayant été en contact avec le FeCl₃ ne sont pas connues et seraient susceptibles de modifier leur potentiel thrombogène. L'étude de carotides de souris lésées au FeCl₃ montre la présence de particules opaques en microscopie électronique à transmission dans les cellules endothéliales, au niveau de la limitante élastique interne et dans les CML qui se révèlent être riches en oxyde de fer. Ceci semble indiquer que les ions ferreux et ferriques traversent la paroi par des mécanismes encore non déterminés et viennent léser les couches internes du vaisseau (**Tseng et al. 2006**). Une étude récente (**Dubois et al. 2006**) montre que le collagène I de la paroi des artérioles mésentériques ou du crémaster serait exposé lors de l'application de fortes concentrations de FeCl₃ (10%) pendant un temps prolongé (5 minutes).

La nature du thrombus formé dans ce modèle n'a été déterminée que pour la carotide, vaisseau plus facile à analyser histologiquement que des artérioles (mésentère, crémaster) de plus petits diamètres. Dans la carotide, le thrombus occlusif est riche en plaquettes et fibrine et en globules rouges en aval de la lésion aux fortes concentrations de FeCl₃ (10 et 20%) (**Konstantinides et al. 2001; Smyth et al. 2001**).

Ce modèle bien que très utilisé n'a été que peu caractérisé pharmacologiquement (Tableau 6). L'héparine prolonge faiblement le temps d'occlusion de la carotide exposée au FeCl₃ (5%) chez le rat (**Broersma et al. 1991**). Chez la souris, l'héparine et le clopidogrel prolongent le temps nécessaire à l'occlusion de la carotide exposée à des concentrations modérées de FeCl₃ (2,5% et 5%) (**Wang and Xu 2005**). A des concentrations plus élevées (20%), un anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ prolonge le temps d'occlusion de la carotide (**Smyth et al. 2001**). Sur des artérioles mésentériques à des concentrations modérées de FeCl₃ (8%), l'hirudine prolonge le temps de formation d'un premier thrombus (**Dubois et al. 2006**).

Une grande majorité de souris génétiquement modifiées ont été évaluées dans ce type de modèle (Tableau 5, voir paragraphe 2.) (**Denis and Wagner 2007**).

3.7. Modèle de lésion induite au laser

Ce type de modèle s'est développé depuis peu principalement dans la souris et est limité pour l'instant aux petits vaisseaux possédant une transparence suffisante pour laisser passer le rayon laser. Il présente certains avantages par rapport au FeCl_3 : la lésion est ponctuelle, reproductible, calibrée et plusieurs vaisseaux indépendants peuvent être lésés sur un même animal. Le laser est focalisé au travers de l'objectif d'un microscope et permet de réaliser des lésions ponctuelles et d'intensité contrôlée de la paroi interne de petits vaisseaux (Arfors et al. 1968a; Arfors et al. 1968b; Gachet et al. 2006a; Kovacs and Gorog 1979; Nonne et al. 2005). Ce modèle a été décrit pour la première fois en 1968 par Arfors et al. au niveau de l'oreille de lapin (Arfors et al. 1968a; Arfors et al. 1968b), avant d'être modifié et adapté au mésentère de rat (Vesvres et al. 1993; Weichert et al. 1983). Dans la souris, le modèle a été appliqué aux veinules de l'oreille (Rosen et al. 2001), puis aux artérioles mésentériques et du muscle crémaster (Falati et al. 2002; Hechler et al. 2003; McCarty et al. 2005; Nonne et al. 2005).

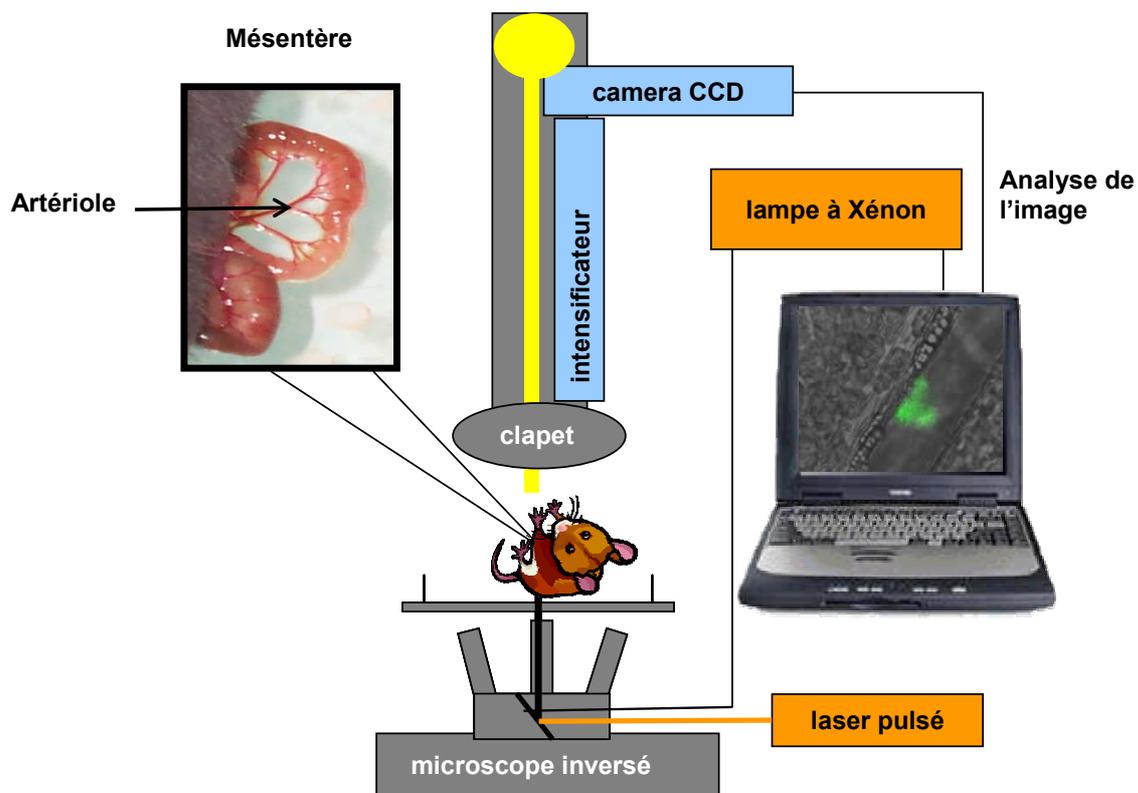


Figure 26 : Modèle de thrombose induite au laser. L'animal anesthésié est placé directement sous le microscope, et le territoire vasculaire choisi est observé par transparence (ici le mésentère). Le laser pulsé est focalisé au travers de l'objectif du microscope et permet de faire une lésion ponctuelle du vaisseau observé. L'évolution de la thrombose peut être suivie en temps réel grâce à une caméra. Le thrombus peut-être visualisé en fluorescence et le système peut-être piloté par ordinateur.

L'évolution des thrombi est observée en temps réel par microscopie intravitale (Figure 26). La taille des thrombi et des embolies peut être évaluée (**Falati et al. 2002; McCarty et al. 2005; Vesvres et al. 1993; Weichert et al. 1983**). Des lésions de niveaux de sévérité différents peuvent être induites (**Nonne et al. 2005**).

Dans l'oreille de souris, une lésion ponctuelle de la veine est induite (**Rosen et al. 2001**). L'analyse histologique montre que la lésion est localisée avec des zones de la paroi où l'endothélium lésé reste attaché au sous-endothélium et des zones désendothélialisées. Le thrombus est composé de plaquettes à différents stades d'activation et de quelques neutrophiles. Le groupe de B. Furie a adapté ce modèle aux artérioles du crémaster de souris (**Falati et al. 2002**). Parallèlement, ce laboratoire a développé un système intégré de microscopie intravitale qui permet de déterminer en temps réel, par l'injection d'anticorps fluorescents, la composition et la (co)localisation des éléments (plaquettes, fibrine, FT...) qui constituent le thrombus (**Celi et al. 2003**). Dans ce modèle, les plaquettes adhèrent rapidement au site de lésion pour former un thrombus qui atteint un maximum autour de 30 s pour disparaître au bout d'une à deux minutes. Le FT et la fibrine apparaissent plus tardivement que les plaquettes au site de lésion et se propagent ensuite à l'intérieur du thrombus. Ce modèle est élaboré au niveau des techniques microscopiques utilisées mais les lésions laser semblent difficiles à calibrer, probablement du fait du muscle crémaster, induisant une grande variabilité dans la taille des thrombi formés (**Dubois et al. 2006**). Un autre modèle, développé au laboratoire sur des artérioles mésentériques, présente l'avantage d'être plus aisé à calibrer en permettant d'obtenir différents niveaux de sévérité (lésion superficielle et sévère) (**Nonne et al. 2005**). L'analyse par microscopie intravitale du thrombus formé dans les artérioles du crémaster révèle la présence de FT au site de lésion (**Falati et al. 2002**). Cependant, l'effet du tir laser sur la paroi des artérioles (mésentère, crémaster) n'a pas encore été observé par histologie classique ou par microscopie électronique.

La thrombose dans le modèle par lésion laser est sensible aux antiplaquettaires (clopidogrel, ticlopidine, inhibiteur de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$) (**Nonne et al. 2005; Weichert et al. 1983**) mais pas à l'aspirine (**Nonne et al. 2005; Weichert et al. 1983**). La sensibilité à l'hirudine dépend de la sévérité de la lésion (Tableau 6) (**Dubois et al. 2006; Nonne et al. 2005**)

3.8. Modèle de thromboembolisme généralisé

Ce modèle n'est pas à proprement parler un modèle de thrombose artérielle cependant il a été largement utilisé pour évaluer la tendance thrombotique de souris génétiquement modifiées. Il correspondrait au niveau physiopathologique à une coagulation intravasculaire disséminée. Une forte composante plaquettaire est obtenue par l'injection d'un mélange d'agonistes comme collagène / ADP ou collagène/adrénaline (**Beviglia et al. 1993; DiMinno and Silver 1983; Farrehi et al. 1998; Hechler et al. 2003; Leon et al. 1999**). En réponse à ce traitement, des agrégats plaquettaires se forment dans la circulation aboutissant à l'obstruction de la microcirculation pulmonaire, ce qui aboutit à la mort de l'animal. La mortalité ou la survie des animaux est évaluée. L'observation histologique des poumons permet de quantifier le nombre de vaisseaux occlus à un instant donné après l'induction de la thrombose. La détermination de la consommation plaquettaire est une autre méthode de quantification. Concernant sa caractérisation pharmacologique, ce modèle est sensible au clopidogrel (**Leon et al. 2001**).

C) RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. Caractérisation pharmacologique d'un modèle de thrombose localisée induite au laser sur artérioles mésentériques de souris

PUBLICATION 1

Importance of platelet phospholipase Cgamma2 signaling in arterial thrombosis as a function of lesion severity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jun;25(6):1293-8.

Nonne C, Lenain N, Hechler B, Mangin P, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F.

1.1. Introduction

L'étude des mécanismes impliqués dans le développement des thromboses et l'évaluation de l'efficacité de substances antithrombotiques nécessitent d'établir des modèles expérimentaux dans l'animal. L'obtention ces dernières années de souris génétiquement modifiées, permettant de manipuler et d'évaluer l'implication de différents acteurs de l'hémostase, a stimulé le développement de modèles de thrombose dans cette espèce. Les modèles les plus couramment utilisés comme ceux basés sur la lésion au FeCl₃, présentent des limites en termes de sensibilité, de reproductibilité et de quantification. Mon projet a donc été de développer et de valider un nouveau modèle de thrombose localisée induite par un rayon laser sur artérioles mésentériques de souris.

Au début de ce travail, le modèle de thrombose localisée induite au laser, adapté du modèle décrit par E.D. Rosen et al. (**Rosen et al. 2001**) et par l'équipe de B. Furie (**Falati et al. 2002**), était dans sa première étape de développement. Les conditions de tir laser avaient été établies pour induire une lésion superficielle et l'analyse de la hauteur du thrombus se faisait à posteriori toutes les 10 secondes. La réponse aux principaux médicaments antithrombotiques n'avait pas encore été évaluée dans ce modèle.

Dans cette première version du modèle, des souris sont anesthésiées et leur mésentère extériorisé. Le mésentère est une membrane transparente richement vascularisée, ce qui permet d'observer les vaisseaux directement au microscope en lumière transmise. Les souris utilisées sont jeunes et pèsent de 12 à 15 g car leurs vaisseaux mésentériques sont encore dépourvus de graisse, gênante pour l'induction et l'observation de la thrombose. L'artériole choisie, d'un diamètre d'environ 75 µm, est observée en lumière transmise. Un laser à azote pulsé d'une longueur d'onde de 440 nm est focalisé au travers de l'objectif à air du microscope inversé (x40) au niveau de la face luminale de la paroi vasculaire. L'intensité du laser est fixée à 18 unités arbitraires, sur une échelle allant de 1 à 24 unités. La durée du tir est ajustée jusqu'à obtention d'une desquamation de la paroi du vaisseau visible en lumière transmise. Les lésions étant très ponctuelles, 3 à 7 artérioles distinctes peuvent être lésées successivement sur chaque animal. Le développement du thrombus est visualisé au microscope en lumière transmise et enregistré sur un support DVD via une caméra CCD analogique pendant 3 minutes. Le thrombus atteint sa taille maximale en 30 à 40 secondes et occupe alors environ 30 % de la lumière vasculaire. Le thrombus se résorbe ensuite progressivement jusqu'à disparaître au bout de 2 minutes (**Hechler et al. 2003**). Ce modèle

présente plusieurs avantages : la lésion est ponctuelle, reproductible et plusieurs vaisseaux indépendants peuvent être observés sur un même animal. Toutefois, l'appréciation de la hauteur du thrombus ne rendait pas forcément compte de la taille globale du thrombus formé.

L'objet de la publication était d'évaluer l'importance respective des voies passant par PLC β et γ 2 dans le déclenchement et le développement d'une thrombose artérielle.

Deux grandes familles de récepteurs sont impliqués dans les étapes initiales d'adhésion et d'activation plaquettaire *i*) des récepteurs d'adhésion au collagène et au FW *ii*) des récepteurs aux agonistes solubles. Ces deux familles de récepteurs sont couplées à deux grandes voies de signalisation menant à l'activation de phospholipases C. Le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX, la GPVI et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, via l'induction de tyrosines kinases, aboutissent à l'activation de la PLC γ 2 (**Nieswandt and Watson 2003**), tandis que les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques G α_q activent la PLC β (**Offermanns et al. 1997**). Les PLCs hydrolysent le phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG), deux seconds messagers induisant, respectivement, la mobilisation du calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (**Williams 1999**). Le développement de souris modifiées pour les gènes codant pour la PLC γ 2 et la protéine G trimérique α_q et l'étude de leurs plaquettes ont apporté des arguments clés en faveur du rôle de ces voies de signalisation, respectivement, dans les réponses aux récepteurs d'adhésion et aux agonistes solubles (**Kuijpers et al. 2003; Suzuki-Inoue et al. 2003**).

Par contre, restaient à étudier l'importance respective des étapes d'initiation passant par PLC γ 2 et PLC β dans le développement et l'extension des thromboses artérielles et comme cible antithrombotique potentielle. Dans cette étude, un modèle de perfusion de sang sur une matrice de collagène et le modèle de thrombose artérielle induite au laser ont été mis à contribution afin de répondre à ces questions.

Plusieurs développements par rapport au système initial ont été apportés au modèle de lésion laser qui sont présentés dans une première partie de ce manuscrit. Un deuxième type de lésion a été mis au point qui a été qualifié de « sévère » par opposition à la lésion existante qualifiée de « superficielle ». Pour induire la lésion sévère, l'intensité du laser est augmentée à 22 unités et le rayon laser est focalisé au fond du vaisseau à l'interface intima/lumière

vasculaire. La durée de tir est ajustée jusqu'à obtenir une ouverture de la paroi sans saignement visualisée aux oculaires du microscope. Cette lésion est réalisée sur des vaisseaux d'environ 95 μm de diamètre dont la paroi plus épaisse permet d'éviter une hémorragie lors du tir. Les thrombi obtenus occupent toute la lumière du vaisseau sans qu'il y ait un arrêt total du flux. Ils atteignent un pic à 90 secondes et sont stables pendant le temps d'observation de 3 minutes.

Afin de permettre une analyse plus fine et plus quantitative de l'évolution de la thrombose, le système initial de vidéomicroscopie a été remplacé par un système informatisé partiellement automatisé permettant une observation de la thrombose alternativement en lumière transmise et en fluorescence, ainsi qu'une analyse automatisée toutes les 300 ms de la surface occupée par les thrombi (figure 26 de l'Introduction générale).

Les lésions superficielle et sévère ont été caractérisées pharmacologiquement en utilisant des médicaments antiplaquettaires (aspirine, clopidogrel, eptifibatide) et anticoagulants (hirudine).

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

Importance of Platelet Phospholipase C2 Signaling in Arterial Thrombosis as a Function of Lesion Severity

Christelle Nonne; Nadège Lenain; Béatrice Hechler; Pierre Mangin; Jean-Pierre Cazenave; Christian Gachet; François Lanza

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005, Vol. 25, Pages 1293-1298

Pages 1293 à 1298 :

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://atvb.ahajournals.org/cgi/content/full/25/6/1293>

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

Conclusion

Dans une première partie, cette étude a permis de mettre en place et de caractériser pharmacologiquement un modèle comprenant deux types de lésions laser, superficielle et sévère, aboutissant à des thromboses distinctes au niveau de leur taille et de leur cinétique. Dans la lésion superficielle, les plaquettes adhèrent rapidement au site de lésion et forment un thrombus pariétal de taille modérée qui atteint son maximum à 50 s. Le thrombus formé après une lésion sévère atteint à 90 s sa taille maximale qui correspond à 12 fois celle du thrombus en lésion superficielle. Le thrombus formé ne régresse pas pendant les 3 premières minutes d'observation.

La sensibilité pharmacologique de ces deux modèles a été ensuite évaluée. L'aspirine, un antiplaquettaire utilisé à titre préventif et qui agit en empêchant la production de thromboxane A₂, n'a aucune incidence sur la formation du thrombus quel que soit le type de lésion. L'analyse de la littérature révèle que l'effet de l'aspirine dans différents modèles animaux de thrombose est très variable allant d'une absence d'effet à un effet inhibiteur (Tableau 6 de l'introduction générale). Par ailleurs, l'administration d'aspirine à l'homme a un effet protecteur en prévention des maladies cardiovasculaires mais un faible effet antithrombotique en situation aiguë (**Jackson and Schoenwaelder 2003**). Ces résultats indiquent que le rôle amplificateur du TxA₂ dans le développement du thrombus *in vivo* est modéré comparativement aux effets inhibiteurs observés dans l'agrégométrie.

Au contraire, le clopidogrel, antagoniste du récepteur à l'ADP P2Y₁₂, ou l'éptifibatide, un inhibiteur de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, deux médicaments utilisés en clinique interventionnelle et en prévention (clopidogrel), diminuent fortement la taille des thrombi après lésions superficielles ou sévères. Dans les modèles de thrombose développés dans plusieurs espèces animales, le clopidogrel ou l'inhibition d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ a des effets antithrombotiques plus importants que l'aspirine (Tableau 6 de l'introduction générale). Ces résultats confirment que le mécanisme amplificateur par l'ADP et l'étape d'agrégation dépendant de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ jouent un rôle clef dans le développement du thrombus *in vivo*.

L'hirudine, un inhibiteur puissant et sélectif de la thrombine, entraîne une forte diminution de la thrombose suite à une lésion sévère (indiquant la formation de thrombine), mais n'a pas ou peu d'effet à la suite d'une lésion superficielle. Cette observation indique clairement que les deux types de lésion sont distincts et génèrent des thrombi par des mécanismes qui diffèrent par leur dépendance vis-à-vis de la thrombine.

Le modèle de lésion sévère développé dans les artérioles mésentériques présente des similitudes avec le modèle de lésion laser dans des artérioles du muscle crémaster (**Dubois et al. 2006; Falati et al. 2002; Falati et al. 2004**), où la thrombose est également sensible à l'hirudine (**Dubois et al. 2006**). Dans ce même modèle, le marquage en microscopie intravitale montre l'accumulation de facteur tissulaire et la génération de fibrine au site de lésion et à l'intérieur du thrombus (**Falati et al. 2002**). Cependant ce modèle n'a pas été caractérisé au niveau histologique et ultrastructural et la nature des matrices exposées n'est pas clairement connue.

Le modèle de lésion vasculaire au FeCl₃, couramment utilisé dans la littérature, semble être également un modèle qui dépend de la thrombine, en effet l'hirudine prolonge le temps de formation d'un premier thrombus sur des artérioles mésentériques à des concentrations modérées de FeCl₃ (8%), (**Dubois et al. 2006**). Des variations d'étendue et de profondeur des lésions et de réponses thrombotiques ont été observées dans différents laboratoires avec ce modèle (**Konstantinides et al. 2001; Ni et al. 2000; Tseng et al. 2006; Wang and Xu 2005**) rendant difficile la comparaison avec le modèle laser.

Le modèle de lésion laser mis au point et caractérisé dans cette étude nous a permis dans un second temps d'évaluer le rôle des voies de signalisation plaquettaires passant par les PLC γ 2 et PLC β dans la formation et l'extension des thromboses artérielles.

La taille du thrombus est diminuée pour les souris PLC γ 2^{-/-} et G α q^{-/-} dans la lésion superficielle et uniquement pour les souris déficientes en G α q dans la lésion sévère. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus sur des souris présentant un défaut en récepteur GPVI au collagène (**Mangin et al. 2006**) ou traitées par un antagoniste de P2Y₁ (**Hechler et al. 2006**). Ces résultats montrent l'importance à la fois des récepteurs au FW et au collagène et de l'ADP dans le modèle de lésion superficielle. Lors de la lésion sévère, la thrombine générée localement et la sécrétion d'ADP semblent prédominer dans l'activation plaquettaire et à la formation du thrombus, l'activation PLC γ 2 dépendante par les récepteurs aux protéines adhésives jouant un rôle mineur dans cette thrombose.

Par ailleurs, la formation d'agrégats dans un modèle de perfusion de sang sur une surface de collagène est affectée à la fois dans les souris PLC γ 2^{-/-} et G α q^{-/-}, mais avec un impact plus important pour PLC γ 2. Dans ce système indépendant de la thrombine, l'étape d'activation initiale passant par les récepteurs d'adhésion joue un rôle clef.

En conclusion, cette étude a montré que le modèle de lésion laser avec deux degrés de sévérité présente des caractéristiques intéressantes. La lésion laser est ponctuelle, reproductible et plusieurs vaisseaux indépendants peuvent être observés sur un même animal. Les deux types de thrombose ont une sensibilité pharmacologique différente et bien caractérisée. Cependant à ce stade du projet, ce modèle n'était pas caractérisé histologiquement au regard de la profondeur et de l'étendue des lésions et de l'exposition et de la nature des protéines thrombogènes.

2. Caractérisation histologique

PUBLICATION 2

2.1. Introduction

L'étude des mécanismes impliqués dans la survenue des thromboses artérielles et l'évaluation d'agents antithrombotiques nécessitent d'établir des modèles expérimentaux dans l'animal. Ces modèles doivent être caractérisés au niveau pharmacologique pour leur réponse aux médicaments connus et au niveau histologique. Notamment, la connaissance sur la nature des surfaces exposées lors des lésions vasculaires va permettre d'apprécier la réactivité vis-à-vis des plaquettes et la capacité à activer la coagulation.

Les artères sont composées de trois tuniques. La tunique la plus proche de la lumière du vaisseau est l'intima qui est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales, d'une membrane basale et d'un sous-endothélium. La tunique médiane, la média, comprend des cellules musculaires lisses (CML) entourées d'une matrice extracellulaire (MEC). La tunique la plus externe, l'adventice, est composée essentiellement de fibroblastes dans une MEC. Les lames élastiques qui séparent l'intima de la média et la média de l'adventice sont respectivement la lame élastique interne (LEI) et externe (LEE). A l'état normal, le sang circule au contact de l'endothélium vasculaire qui constitue une surface non thrombogène. Lors d'une brèche vasculaire, la formation d'un thrombus plaquettaire dépend *i)* de la structure *ii)* de la composition en protéines adhésives ou activatrices de plaquettes *iii)* et de la composition en facteur tissulaire (FT) de la paroi lésée *iv)* et de l'étendue et de la profondeur des lésions. L'activation ou la destruction des cellules endothéliales aboutit à la libération de facteur Willebrand (FW) multimérique et à l'externalisation de la P-sélectine. Le FW et la P-sélectine participent alors aux interactions plaquettes-paroi lésée. Le sous-endothélium contient des protéines adhésives et/ou activatrices pour les plaquettes dont le FW sécrété par l'endothélium et capturé à partir du plasma, et les collagènes III, IV et VI [1-5]. La média et l'adventice, contiennent des glycoprotéines de la MEC et des collagènes I, III et IV interstitiels. Les collagènes fibrillaires I et III sont de puissants activateurs plaquettaires [6] et les collagènes IV et VI permettent l'adhésion des plaquettes [7-11]. Certaines glycoprotéines de structure composant la MEC sont aussi susceptibles d'activer les plaquettes [12]. Enfin, le FT, sécrété par les fibroblastes dans l'adventice de vaisseaux sains, permet d'initier la cascade de la coagulation [13-15].

Au laboratoire, nous avons développé un modèle de thrombose induite au laser sur artérioles mésentériques de souris qui présente deux niveaux de sévérité [16]. Pour la lésion dite superficielle, l'intensité du laser est fixée à 18 unités arbitraires et la durée du tir est ajustée jusqu'à obtention d'une desquamation de la cellule endothéliale visible en lumière transmise. Pour la lésion sévère, l'intensité du laser est fixée à 22 et la durée du tir est ajustée jusqu'à obtention d'une rupture de la paroi constatée visuellement en lumière transmise sans saignement. La surface du thrombus suite à une lésion sévère est 10 fois plus importante que celle obtenue après une lésion superficielle. Les deux types de thrombose montrent une sensibilité pharmacologique et des réponses chez des souris modifiées génétiquement qui diffèrent [16-18] (publication 4). La thrombose déclenchée par une lésion superficielle est indépendante de la génération de thrombine, est sensible aux substances antiplaquettaires connues (eptifibatide, clopidogrel) mais pas à l'aspirine [16] et est diminuée chez des souris présentant des défauts de réponses plaquettaires au collagène (γ RFc^{-/-}, PLC γ 2^{-/-}) [16, 17]. La thrombose déclenchée par une lésion sévère est dépendante de la génération de thrombine, est sensible aux substances antiplaquettaires connues (eptifibatide, clopidogrel) et n'est pas modifiée dans les souris γ RFc^{-/-} [16]. L'étude initiale a donc permis d'établir des modèles calibrés et reproductibles caractérisés pharmacologiquement. Cependant, les lésions vasculaires induites par le laser (de type superficielle ou sévère) n'ont pas été différenciées et caractérisées histologiquement au regard de la profondeur, de l'étendue de la lésion et de l'exposition en protéines de matrice et en facteur tissulaire.

Le but de cette étude a été de caractériser histologiquement et au niveau ultrastructural les dommages subis par les artérioles dans ces deux types de lésions et d'identifier les matrices et cellules exposées. Par ailleurs, la composition et l'ultrastructure du thrombus ont été analysées. Nous avons observé, par microscopie électronique et immunomarquage à l'or, des artérioles mésentériques de souris intactes ou après lésion laser. Cette analyse révèle clairement deux degrés de lésions bien distincts de la paroi. La lésion superficielle expose un sous-endothélium riche en collagène sans atteinte des couches plus profondes, tandis que la lésion sévère est plus étendue, altère la média et l'adventice en son centre exposant les collagènes I et III et générant de la fibrine. Ces résultats sont en accord avec la sensibilité de ce modèle aux traitements médicamenteux et avec les réponses thrombotiques des différentes souris génétiquement modifiées [16].

2.2. Matériels et méthodes

Animaux

Les souris mâles de fond génétique C57BL6/J (Charles River, St Germain sur l'Abresle, France) sont élevées à l'animalerie de l'EFS-Alsace où les expériences sont réalisées. Tous les protocoles d'expérimentation animale sont conformes aux procédures éthiques de soins et d'utilisation des animaux de laboratoire définies par les lois européennes.

Modèle de thrombose in vivo

Le modèle de thrombose artérielle induite par lésion laser a été réalisé selon la méthode décrite [16]. Une lésion localisée de la paroi d'artéριοles mésentériques a été réalisée dans des souris d'environ 12 à 15 g. Elle est induite par un rayon laser (440 nm) produit par un appareil laser Micropoint (Photonics Instruments, St Charles, IL) focalisé au travers d'un objectif à air de grandissement 40x d'un microscope DMIRB (Leica Microsystems SAS, France). Des lésions calibrées superficielle provoquant un thrombus pariétal réversible ou sévère induisant un thrombus occlusif sont réalisées en ajustant la durée du tir et l'intensité du rayon laser.

Analyse par microscopie électronique à transmission (MET) après inclusion en Epon

Afin d'évaluer l'étendue et la profondeur des lésions, les artéριοles sont fixées en glutaraldéhyde et incluses en Epon.

Les artéριοles mésentériques sont fixées *in vivo*, par injection intracardiaque d'une solution de glutaraldéhyde à 2,5% en tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,4. Les artéριοles sont disséquées sous microscope puis plongées 1h dans la même solution de fixation. Elles sont ensuite postfixées pendant 1h avec du tétrοxide d'osmium, lavées, traitées pendant 1h avec une solution d'acétate d'uranyle à 2%, déshydratées dans de l'éthanol en concentrations croissantes puis incluses en Epon. Des séries de sections transversales sont réalisées le long du vaisseau au niveau de la lésion : des coupes semi-fines (épaisseur : 0,3 μm) suivies de séries de sections ultra-fines (épaisseur : 100 nm) sont réalisées en alternance. Lors de cette procédure, on note la distance parcourue le long du vaisseau. Les sections semi-fines sont colorées avec du bleu de toluidine et observées par microscopie à lumière transmise afin de repérer précisément la lésion et de déterminer l'étendue des dommages causés par le tir laser. Les sections ultra-fines, contrastées avec du citrate de plomb et de l'acétate d'uranyle, sont examinées sous un MET CM120 Bio Twin (FEI, Eindhoven, Les Pays-Bas).

Analyse par MET et immunomarquage aux billes d'or après inclusion en Lowicryl

Afin d'identifier les protéines adhésives composant ces vaisseaux, des artérioles non lésées sont fixées en paraformaldéhyde et incluses en Lowicryl en vue de faire des immunomarquages avec des anticorps couplés à des billes d'or (10 nm).

Les artérioles sont fixées par injection intracardiaque d'une solution de paraformaldéhyde à 2,5% en tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,4. Puis elle sont disséquées et fixées par immersion pendant 1h dans la solution de fixation. Les échantillons sont lavés une fois en tampon cacodylate 0,1M et inclus en résine hydrophile Lowicryl K4M, à -30°C sous une lampe UV. Ils sont ensuite coupés en sections ultra-fines (100 nm).

Les sections en Lowicryl sont traitées pendant 15 min par de la glycine 0.05M afin de bloquer les fonctions aldéhydes puis incubées pendant 30 min avec du PBS contenant 5% de BSA et 0,1% de gélatine de poisson. Elles sont ensuite incubées pendant 1h avec une solution d'anticorps primaires en tampon PBS contenant 0,1% de BSA. Les anticorps utilisés sont des polyclonaux de lapin dirigés contre le collagène I souris (Chemicon, Temecula, CA) à 5 µg/ml, le collagène III humain (Novus Biological, Littelton, CO) à 10 µg/ml, le collagène IV souris (Chemicon, Temecula, CA) à 5 µg/ml et le FW humain (Dako, France) à 20 µg/ml. Puis, les sections sont lavées en PBS et incubées pendant 20 min avec de la protéine A couplée à des billes d'or de 10 nm à la dilution 1:65. Après lavage, les sections sont post-fixées pendant 10 min avec du glutaraldéhyde 1% en PBS. Finalement, les sections sont lavées et sont contrastées en acétate d'uracile 1,8%/méthylcellulose 0,2%. Elles sont ensuite observées sous un MET CM120 (120 kV). Les immunomarquages contrôles sont réalisés en utilisant l'anticorps non immun de lapin à la place de l'anticorps primaire.

Immunomarquage in vivo

La cinétique d'apparition de la fibrine au niveau du site de lésion a été étudiée *in vivo* avec un anticorps fluorescent. Les images sont acquises avec un objectif à air 20x pour visualiser la totalité de la zone lésée. Un anticorps monoclonal de souris anti-chaîne II β de la fibrine humaine (Accurate Chemical, Westbury, New York) ou un IgG_{1 κ} contrôle (Sigma-Aldrich Chimie, France) ont été couplés au fluorochrome Alexa-660 (kit Molecular Probes Alexa Fluor 660, Interchim, France). Les anticorps couplés ont été injectés dans la veine jugulaire 5 min avant la lésion à la concentration de 2 mg/kg. Pour visualiser les plaquettes, du DIOC₆ (0,5 µmoles/g de souris) est ensuite injecté à la souris et observé à 488 nm. Une caméra CCD Sensicam (Auburn Hills, Michigan) permet l'acquisition des images à la fois en lumière transmise, à 488 nm et à 647 nm.

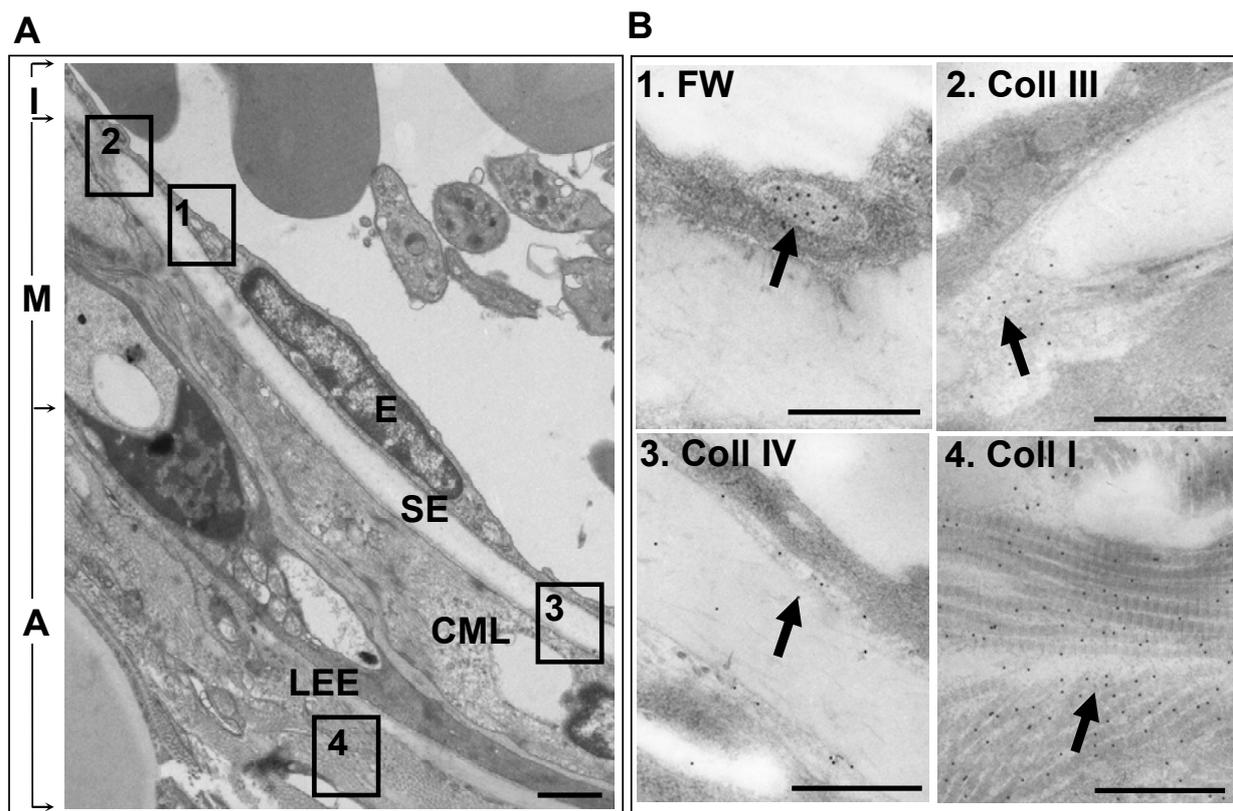


Figure 1 : Ultrastructure et composition en protéines adhésives de la paroi d'une artériole mésentérique de souris. A. Cliché de microscopie électronique à transmission de la paroi d'une artériole mésentérique intacte. La lumière vasculaire est en haut de l'image. E : endothélium; SE : sous-endothélium; I : intima; M : média; A : adventice; CML : cellule musculaire lisse; LEE : limitante élastique externe. Les cadres numérotés correspondent aux sections immunomarquées du panneau B. B. Localisation par immunomarquage du facteur Willebrand, FW, (1) dans les corps de Weibel-palade endothéliaux, des fibres de collagène de type III (2) dans le sous-endothélium, du collagène de type IV (3) dans la membrane basale sous l'endothélium et des fibres de collagène de type I (4) dans l'adventice. Barre, 1 μ m.

Pour visualiser les plaquettes et la fibrine dans plusieurs plans, les images sont acquises avec un scanner confocal Yokogawa CSU-10 (PerkinElmer, France). Des sections sont obtenues en faisant varier la distance entre l'objectif du microscope et l'artériole mésentérique de la souris permettant la reconstruction en 3 dimensions du thrombus. Un objectif à huile 40x a été utilisé afin d'obtenir un plus fort grossissement et une meilleure qualité d'image. Le rayon laser diffusant mieux dans l'huile, les intensités de laser ont dû être recalibrées pour reproduire les deux niveaux de lésion. Les images ont été acquises au maximum de la thrombose (270 s) après une lésion sévère, quand le thrombus est stable. Les images sont acquises avec une caméra CCD CoolSnap HQ (Roper, Tucson, AZ) à 647 nm ou à 488 nm et 647 nm. La section est réalisée par paliers de 3 μm pour le simple marquage et de 5 μm pour un double marquage.

L'acquisition et l'analyse des images se font grâce au logiciel Slidebook (Intelligent Imaging innovations, Denver, CO).

2.3. Résultats et discussion

Ultrastructure et composition en protéines adhésives de la paroi d'artériole mésentérique de souris

L'analyse en microscopie électronique à transmission et immunomarquage de vaisseaux intacts inclus dans le Lowicryl ont permis de déterminer la structure de la paroi d'artérioles mésentériques de souris C57BL6/J et la localisation des protéines adhésives qui la composent. Les artérioles ont été choisies sur les mêmes critères que ceux utilisées pour le tir laser (même taille, éloignées d'une bifurcation). La paroi est composée d'une couche de cellules endothéliales jointives suivie d'un sous-endothélium (figure 1A), d'une média composée de deux couches de CML et d'un adventice. La figure 1B présente l'immunomarquage par billes d'or du FW et de trois types de collagène. Le FW a été détecté dans les corps de Weibel Palade des cellules endothéliales (insert 1) mais n'est pas révélé dans le sous-endothélium. Il est possible que la sensibilité du marquage ne soit pas suffisante dans nos conditions car d'autres études de microscopie électronique et d'immunofluorescence ont montré la présence de FW dans le sous-endothélium de vaisseaux humains sains [4]. Les fibres de collagène de type III sont visibles dans le sous-endothélium (insert 2) et dans la MEC de la média (non illustré). Le collagène de type IV est visible dans la membrane basale supportant les cellules endothéliales (insert 3). Les faisceaux de fibres de collagène I sont

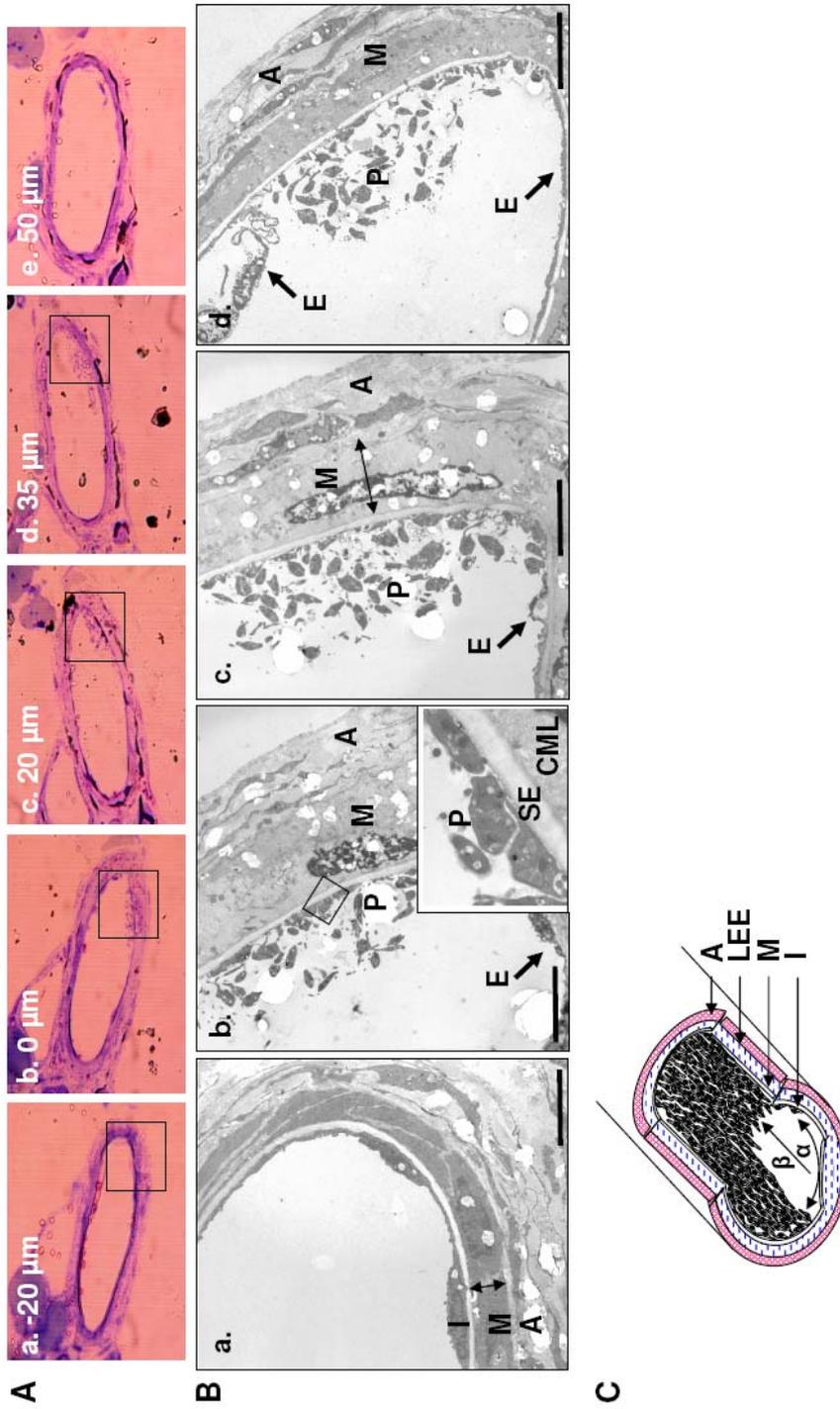


Figure 2 : Caractérisation histologique d'une lésion superficielle de la paroi d'artériole mésentérique. A et B. Modifications histologiques de la paroi par le rayon laser lors d'une lésion superficielle. La distance, en μm , entre le début et la fin de la lésion est indiquée sur les images de sections vasculaires. Les photographies de microscopie électronique à transmission (B) correspondent aux encadrements des portions de paroi des sections semi-fines (A) de même numérotation. Elles sont ordonnées selon le sens du flux sanguin. C. Schéma de la lésion superficielle d'une artériole mésentérique. Les dimensions de la lésion sont $\alpha = 45 \pm 1 \mu\text{m}$ ($n=2$) pour la circonférence et $\beta = 65 \pm 15 \mu\text{m}$ ($n=3$) pour la longueur de paroi lésée. E : endothélium; SE : sous-endothélium; I : Intima; M : média; A : adventice; CML : cellule musculaire lisse; LEE : limitante élastique externe; P : plaque. Barre = 5 μm .

clairement visualisés dans l'adventice (insert 4). Ces observations sont en accord avec les études de localisation des collagènes dans des artères humaines [19-23].

Caractérisation histologique d'une lésion superficielle de la paroi d'artériole mésentérique.

Une lésion superficielle est induite par focalisation du rayon laser sur la face luminale de la paroi d'une artériole et la durée du tir est ajustée pour obtenir une desquamation de l'endothélium visible en lumière transmise. L'artériole est fixée *in vivo* environ 2 minutes après lésion, prélevée et incluse en Epon. L'échantillon est ensuite coupé et coloré avec du bleu de toluidine qui permet de repérer la lésion et de déterminer son étendue. La zone ainsi sélectionnée est alors analysée par microscopie électronique.

La figure 2A-B rassemble les images des sections colorées au bleu de toluidine et les photographies de microscopie électronique qui couvrent la zone en amont de la lésion (a), couvrent la zone lésée (b à d) et la zone en aval (e). L'observation en microscopie électronique (a) révèle une structure intacte en amont de la lésion comparable à celle d'une artériole non lésée (Figure 1A). La zone lésée (b à d) montre une modification superficielle de la paroi avec le détachement des cellules endothéliales de l'intima (E signalé par une flèche). L'absence d'endothélium est observée sur une circonférence de 44 μm (α , Figure 2C). Les couches suivantes (sous-endothélium, média et adventice) sont intactes. Ces modifications histologiques de la paroi sont visibles sur une étendue vasculaire de 45 μm (β , Figure 2C). Pour cet échantillon, la paroi de l'artère est à nouveau intacte 50 μm après le début de la lésion (e). On peut aussi cependant noter la formation d'un œdème caractérisé par un épaissement de la média (b et c).

Cette expérience a été reproduite trois fois (dont une fois après superfusion de fixateur sur le mésentère) et a abouti aux mêmes observations. La figure 2C récapitule schématiquement les modifications de la paroi de l'artériole induites par l'impact du tir laser lors d'une lésion superficielle.

Caractérisation histologique d'une lésion sévère de la paroi d'artériole mésentérique.

Une lésion sévère est induite par focalisation du rayon laser sur la face luminale de la paroi d'une artériole et la durée du tir est ajustée pour obtenir une ouverture de la paroi sans saignement. Pour cet échantillon, l'artériole mésentérique a été fixée environ 2 minutes après la lésion. A ce temps, le thrombus est dans sa phase de croissance et n'est pas occlusif. La section colorée et la microscopie électronique (Figure 3A-B) montrent une paroi vasculaire intacte en amont de la lésion (a). Sur la section colorée suivante (b), on note une légère

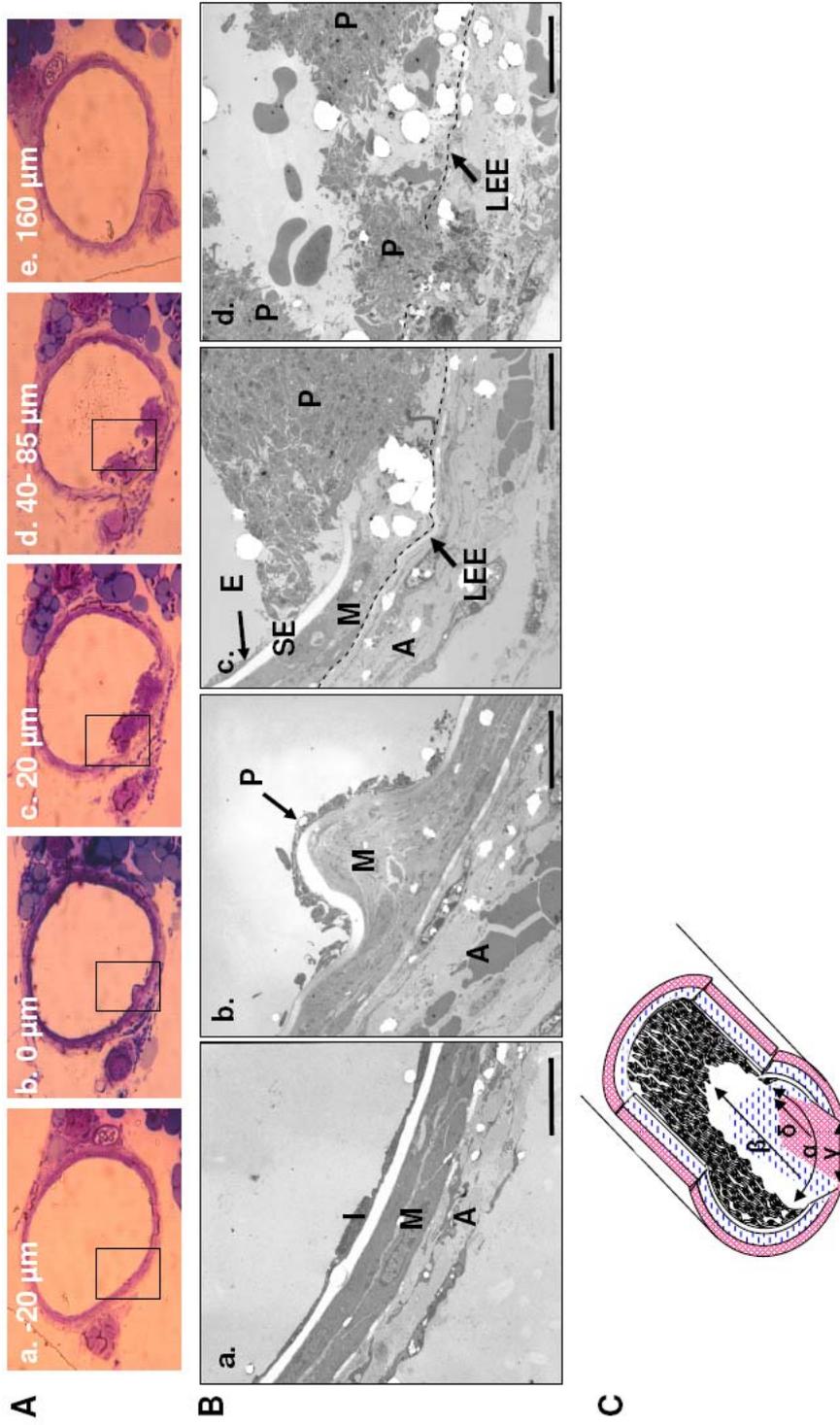


Figure 3 : Caractérisation histologique d'une lésion sévère de la paroi d'artériole mésentérique. A et B. Modifications histologiques de la paroi par le rayon laser lors d'une lésion sévère. La distance, en μm , entre le début et la fin de la lésion est indiquée sur les images de sections vasculaires. Les photographies de microscopie électronique à transmission (B) correspondent aux encadrements des sections semi-fines (A) de même numérotation. Elles sont ordonnées selon le sens du flux sanguin. C. Schéma de la lésion sévère d'une artériole mésentérique. Les dimensions de la lésion sont $\alpha = 54,5 \pm 1 \mu\text{m}$ ($n=2$) circonférence et $\beta = 158 \pm 6,5 \mu\text{m}$ ($n=3$) longueur de paroi lésée et $\gamma = 11,2 \pm 3,2 \mu\text{m}$ circonférence et $\delta = 40 \pm 5 \mu\text{m}$ longueur de la perforation de la limite élastique externe. E : endothélium; SE : sous-endothélium; I : intima; M : média; A : adventice; CML : cellule musculaire lisse; LEE : limite élastique externe; P : plaque. Barre, $5 \mu\text{m}$.

déformation de la paroi de l'artériole et une desquamation de l'endothélium sur une circonférence de 54 μm (α , Figure 3C). A ce niveau, le sous-endothélium et les tuniques suivantes (médias et adventice) sont intactes. En s'éloignant de 20 μm en aval (c), le sous-endothélium et la média sont rompus et en contact avec un thrombus. De 40 à 85 μm (d), la limitante élastique externe est brisée et on observe un thrombus au contact de l'adventice. Au niveau de cette section, l'impact du tir est le plus important. Les sections suivantes (non illustré) jusque 150 μm montrent une structure sensiblement similaire à celle décrite pour les sections de 0 à 40 μm . Pour cet échantillon, la paroi de l'artère est à nouveau intacte 160 μm après le début de la lésion (e).

Cette expérience a été reproduite trois fois (dont une fois après superfusion de fixateur) et aboutit aux mêmes observations. La figure 3C récapitule les modifications de la paroi de l'artériole induites par le tir laser lors d'une lésion sévère. La lésion est localisée sur $158 \pm 6,5$ μm de longueur de vaisseau (β) et sur une circonférence vasculaire (α) de 54 ± 1 μm (1/5 du périmètre de l'artère). Le rayon laser endommage la paroi en profondeur jusqu'à atteindre l'adventice, l'exposant à la lumière du vaisseau sur une surface de 1 400 μm^2 ($\gamma \cdot \delta \cdot \pi$).

Ces résultats démontrent clairement la génération de lésions localisées et reproductibles présentant deux niveaux de sévérité distincts en termes de surface lésée et de profondeur de lésion.

La lésion superficielle induit le détachement et la destruction sélective de la couche endothéliale. L'immunomarquage montre que le sous-endothélium exposé contient des collagènes de type III et IV. Ces collagènes sont capables d'adsorber le FW plasmatique [24] et de présenter une surface adhésive mixte composée de FW et de collagène. Ces données sont en accord avec la thrombose diminuée des souris knock-out affectant la voie GPIb-V-IX [18] et la voie GPVI ($\gamma\text{RFc}^{-/-}$, $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$) [16, 17].

La lésion profonde entraîne l'exposition de toutes les couches de la paroi et notamment les collagène de type IV, III et I capables d'adsorber le FW plasmatique. Une différence majeure par rapport au modèle de lésion superficielle est l'exposition de l'adventice qui contient du FT susceptibles de déclencher la production de thrombine. Ici également, l'analyse histologique est en accord avec la sensibilité du modèle aux différents agents pharmacologiques et notamment l'inhibition de la thrombose par l'hirudine.

Structure et composition du thrombus

Dans la lésion superficielle, le thrombus est rapidement réversible [16] et l'analyse ultrastructurale ne permet pas du fait des délais de fixation de l'observer dans sa phase

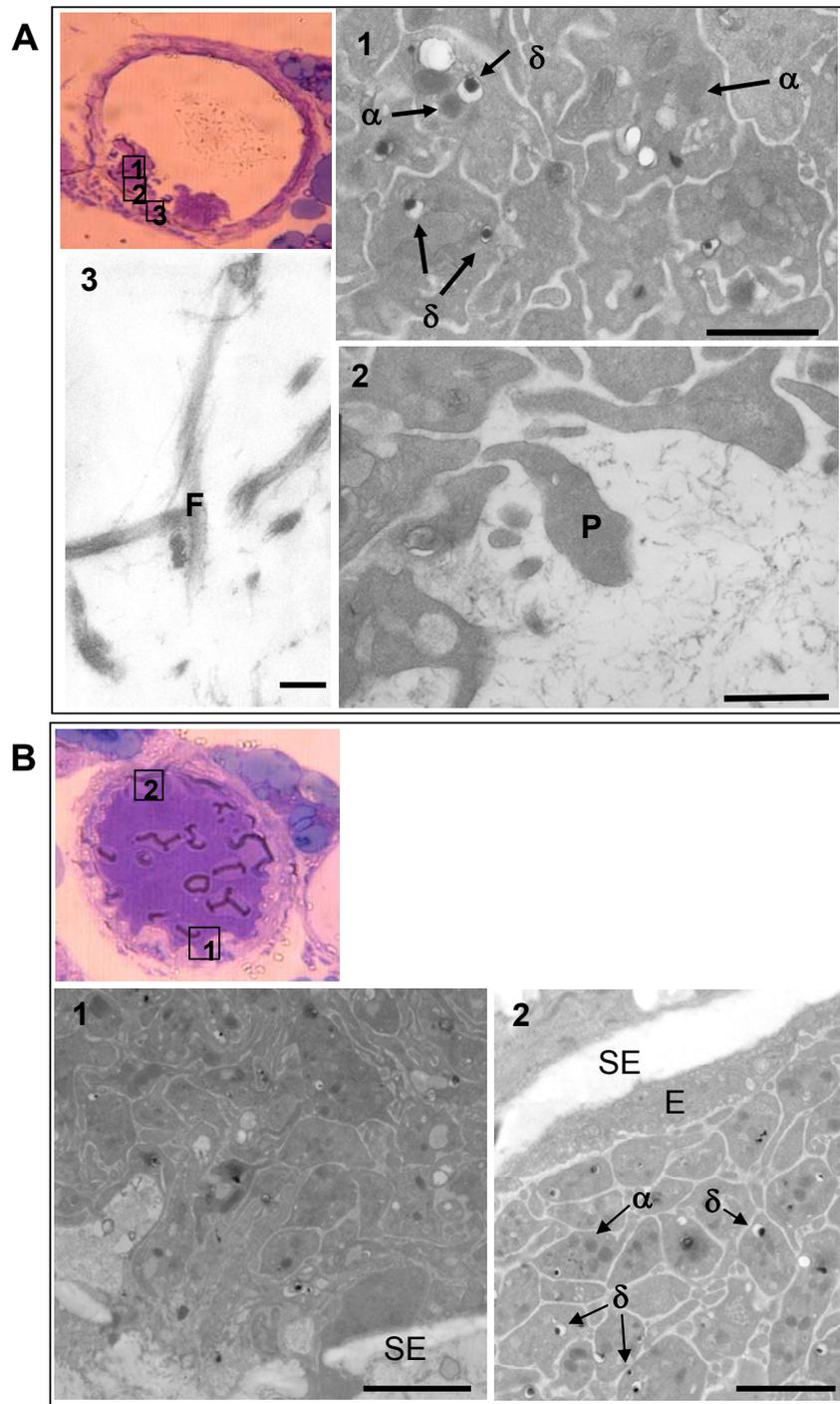


Figure 4 : Structure et composition du thrombus formé après une lésion sévère. A et B. En haut à gauche, section semi-fine de l'artère lésée et observation en microscopie électronique à transmission des portions encadrées. **A. Thrombus en cours de croissance observé 2 minutes après lésion.** 1. Plaquettes au sein du thrombus. 2. Plaquettes au contact de la lésion. 3. Fibres de fibrine au niveau de l'adventice exposé par le tir laser. **B. Thrombus occlusif observé 7 minutes après lésion.** 1. Plaquettes au contact de la lésion. 2. Plaquettes à l'opposé de la zone lésée. E : endothélium; SE : sous-endothélium; F : fibrine ; P : plaquette; α : granules α ; δ : granules denses. Barre = 1 μ m.

maximale mais uniquement au cours de sa régression (Figure 2B, agrandissement de b). On observe cependant encore des plaquettes en contact avec la zone lésée qui présentent un changement de forme mais pas de signe de dégranulation. Le niveau d'activation est donc moindre que celui observé en présence d'agonistes puissants comme la thrombine. De plus, on ne note pas de formation de fibres de fibrine. Malgré l'absence de dégranulation, l'inhibition de la thrombose par des antagonistes des récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ [16, 25] suggère une libération locale d'ADP dans ce modèle. La forte dépendance de ce modèle à l'ADP, l' $\alpha_{IIb}\beta_3$, la GPIIb et aux récepteurs au collagène [16-18, 25] et l'absence d'effet de l'hirudine sur la thrombose [16] en font un modèle sensible aux agents antiplaquettaires. Physiologiquement, ce modèle se rapprocherait de situations où l'endothélium est activé ou érodé (zone aux taux de cisaillement élevés, inflammation...).

L'analyse du thrombus de la lésion sévère est facilitée par une cinétique plus lente et par une plus grande stabilité qui permettent la fixation sans trop modifier sa structure.

La figure 4A correspond à un thrombus à un temps précoce, 2 minutes post-lésion, correspondant à la Figure 3, montrant des détails ultrastructuraux dans différentes régions. On note une hétérogénéité selon la zone analysée. Les plaquettes localisées au centre du thrombus (1) possèdent encore leurs granules alors que celles qui sont en périphérie du thrombus (non illustré) et le plus en contact avec l'adventice (2) sont vidées de leurs granules. A proximité de l'adventice à la base du thrombus, on observe des structures fibrillaires correspondant à de la fibrine (3).

Aux temps plus tardifs, 7 minutes post-lésion, le thrombus occupe quasiment toute la lumière du vaisseau. On note à nouveau deux populations de plaquettes. A l'endroit où la paroi est profondément endommagée (1) de nombreuses plaquettes sont dégranulées. Dans la lumière du vaisseau (non illustré) et au niveau de la paroi intacte opposée à la lésion (2), les plaquettes possèdent encore des granules. Le thrombus s'étend sur 705 μm (bien au delà et en aval de la zone lésée).

Analyse de la génération de fibrine in vivo par microscopie confocale

La production de fibrine au site de la lésion sévère et sa cinétique d'apparition ont été analysées par microscopie intravitale à fluorescence (Figure 5) selon une méthode déjà décrite [26].

La fibrine est révélée par un anticorps fluorescent dirigé contre la chaîne II β de la fibrine humaine qui reconnaît aussi la fibrine de souris et les plaquettes sont visualisées avec

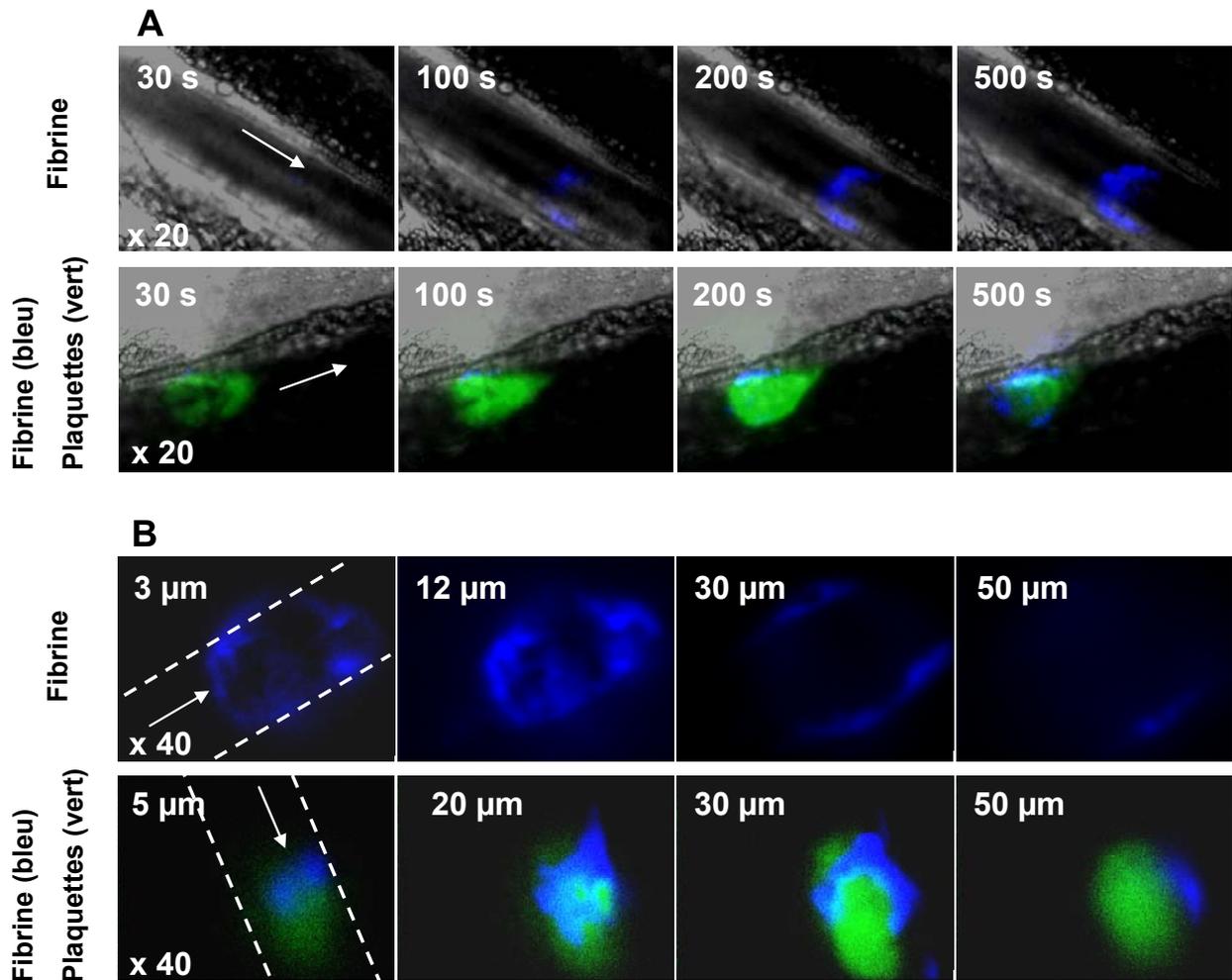


Figure 5 : Cinétique d'apparition et distribution de la fibrine par microscopie intravitale à fluorescence lors d'une lésion sévère. Le sens du flux est indiqué par la flèche. Un anticorps anti-chaîne II β de la fibrine couplé Alexa-647 (2 $\mu\text{g/g}$ de souris) est injecté i.v. seul (panneaux supérieurs) ou avec du DIOC6 (0,5 $\mu\text{moles/g}$ de souris) qui marque les plaquettes (panneaux inférieurs). **A. Cinétique d'apparition de la fibrine et des plaquettes.** L'écart de temps, en secondes, entre le tir laser et l'acquisition de l'image est indiqué sur l'image. Ces images ont été obtenues une fois en simple marquage (panneau supérieur) et dans 3 expériences similaires en double marquage (panneau inférieur). Elles ont été acquises avec un objectif à air x20.

B. Distribution de la fibrine (bleu) et des plaquettes (vert) dans le thrombus occlusif par microscopie à balayage confocal. Les images sont acquises 270 s après le tir laser et représentent des sections transversales du thrombus en balayant à partir de la base du vaisseau sur toute sa hauteur 50 μm . Les pointillés indiquent les parois de l'artériole. Ces images ont été obtenues une fois en simple marquage (panneau supérieur) et dans 2 expériences en double marquage (panneau inférieur). Elles ont été acquises avec un objectif à huile x40.

la sonde DIOC₆. Suite à une lésion superficielle nous n'avons pas observé de fibrine par cette méthode (non illustré). Après lésion sévère (Figure 5A), les plaquettes s'accumulent rapidement tandis que la fibrine apparaît plus tardivement (100 s). Elle se forme à la base du thrombus et à l'interface paroi lésée-lumière vasculaire, où elle est encore présente quand le thrombus a régressé (500 s). Elle est peu ou pas visible à l'intérieur même du thrombus. Quand l'anticorps contrôle IgG_{1κ} de souris couplé Alexa-660 est injecté, il n'y a pas de fluorescence dans le vaisseau.

Pour évaluer la distribution de la fibrine dans le thrombus en 3D, une analyse confocale a été réalisée à 270 s à un stade où le thrombus est occlusif (Figure 5B). Deux types de marquage ont été réalisés, un simple marquage de la fibrine ou un double marquage avec les plaquettes. Les coupes au fond du vaisseau (3 ou 5 μm) montrent un marquage important pour la fibrine qui est détectée jusqu'à une hauteur de 50 μm à l'intérieur de la lumière du vaisseau. Un aspect en forme de fer à cheval est observé qui en double marquage enserre le thrombus mais à nouveau la fibrine n'est pas observée au sein même du thrombus.

La présence de fibrine établit de manière claire que cette lésion s'accompagne d'une génération de thrombine. Cette thrombine entraîne une fibrinofomation qui reste localisée au niveau de la paroi vasculaire lésée/exposée et va permettre une activation importante des plaquettes mises en contact avec cette paroi. Les observations en microscopie intravitale sont similaires à celles décrites dans des artérioles du muscle crémaster [26, 27] où cependant les auteurs observent également de la fibrine à l'intérieur du thrombus.

Une observation intéressante est l'hétérogénéité du thrombus en terme de degré d'activation des plaquettes avec apparemment un gradient d'activation au fur et à mesure que l'on s'approche de la zone la plus profondément lésée. Ces résultats contrastent avec les agrégats formés dans un agrégomètre en présence par exemple de thrombine où l'ensemble du thrombus présente des plaquettes ayant changé de forme et dégranulé.

D'autres immunomarquages (facteur tissulaire, P-sélectine...) sur coupes d'artérioles mésentériques pour la microscopie électronique et *in vivo* pour la microscopie intravitale restent à réaliser pour compléter la caractérisation de ce modèle.

- 1 Ruggeri ZM. Role of von Willebrand factor in platelet thrombus formation. *Ann Med* 2000; **32 Suppl 1**: p. 2-9.
- 2 Cambien B and Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med* 2004; **10**(4): p. 179-86.
- 3 van Mourik JA, Romani de Wit T and Voorberg J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol* 2002; **117**(2): p. 113-22.
- 4 Rand JH, Sussman, II, Gordon RE, Chu SV and Solomon V. Localization of factor-VIII-related antigen in human vascular subendothelium. *Blood* 1980; **55**(5): p. 752-6.
- 5 Rand JH, Wu XX, Potter BJ, Uson RR and Gordon RE. Co-localization of von Willebrand factor and type VI collagen in human vascular subendothelium. *Am J Pathol* 1993; **142**(3): p. 843-50.
- 6 Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ and de Groot PG. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* 2004; **2**(4): p. 561-73.
- 7 Ross JM, McIntire LV, Moake JL and Rand JH. Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under physiological flow conditions. *Blood* 1995; **85**(7): p. 1826-35.
- 8 Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HF, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR and Sixma JJ. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood* 1994; **83**(5): p. 1244-50.
- 9 Henrita van Zanten G, Saelman EU, Schut-Hese KM, Wu YP, Slootweg PJ, Nieuwenhuis HK, de Groot PG and Sixma JJ. Platelet adhesion to collagen type IV under flow conditions. *Blood* 1996; **88**(10): p. 3862-71.
- 10 Parsons TJ, Haycraft DL, Hoak JC and Sage H. Interaction of platelets and purified collagens in a laminar flow model. *Thromb Res* 1986; **43**(4): p. 435-43.
- 11 Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG and Santoro SA. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol* 1989; **108**(5): p. 1917-24.
- 12 Bou-Gharios G, Ponticos M, Rajkumar V and Abraham D. Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell Prolif* 2004; **37**(3): p. 207-20.
- 13 Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM and Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(8): p. 2839-43.
- 14 Drake TA, Morrissey JH and Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; **134**(5): p. 1087-97.
- 15 Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**(6): p. 1015-22.
- 16 Nonne C, Lenain N, Hechler B, Mangin P, Cazenave JP, Gachet C and Lanza F. Importance of platelet phospholipase Cgamma2 signaling in arterial thrombosis as a function of lesion severity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**(6): p. 1293-8.
- 17 Mangin P, Yap CL, Nonne C, Sturgeon SA, Goncalves I, Yuan Y, Schoenwaelder SM, Wright CE, Lanza F and Jackson SP. Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcRgamma deficiency. *Blood* 2006; **107**(11): p. 4346-53.
- 18 Strassel C, Nonne C, Eckly A, David T, Leon C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C and Lanza F. Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**(1): p. 241-7.

- 19 Gay S, Balleisen L, Remberger K, Fietzek PP, Adelman BC and Kuhn K. Immunohistochemical evidence for the presence of collagen type III in human arterial walls, arterial thrombi, and in leukocytes, incubated with collagen in vitro. *Klin Wochenschr* 1975; **53**(19): p. 899-902.
- 20 Legrand Y, Courillon A, Fauvel F and Bariety J. [Arterial subendothelial structures: anatomy, biochemistry, functions]. *Nouv Rev Fr Hematol* 1979; **21**(4): p. 403-17.
- 21 Madri JA, Dreyer B, Pitlick FA and Furthmayr H. The collagenous components of the subendothelium. Correlation of structure and function. *Lab Invest* 1980; **43**(4): p. 303-15.
- 22 Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y and Mayer U. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 2004; **131**(7): p. 1619-28.
- 23 Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**(5): p. 618-24.
- 24 Hoylaerts MF, Yamamoto H, Nuyts K, Vreys I, Deckmyn H and Vermylen J. von Willebrand factor binds to native collagen VI primarily via its A1 domain. *Biochem J* 1997; **324** (Pt 1): p. 185-91.
- 25 Hechler B, Nonne C, Roh EJ, Cattaneo M, Cazenave JP, Lanza F, Jacobson KA and Gachet C. MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **316**(2): p. 556-63.
- 26 Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC and Furie B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med* 2002; **8**(10): p. 1175-81.
- 27 Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B and Furie BC. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* 2006; **107**(10): p. 3902-6.

3. Rôle du complexe GPIb-V-IX et des récepteurs au collagène dans la thrombose artérielle

3.1. Le complexe GPIb-V-IX

3.1.1. Evaluation d'une lignée de souris Bernard-Soulier présentant une inactivation du gène de la sous-unité GPIb β

PUBLICATION 3

Decreased Thrombotic Tendency in Mouse Models of the Bernard-Soulier Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jan;27(1):241-7.

Strassel C, Nonne C, Eckly A, David T, Leon C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F.

a) Introduction

La formation d'un thrombus au site d'une lésion vasculaire requiert la capture des plaquettes à partir du sang circulant. Cette étape est assurée par le complexe GPIb-V-IX plaquettaire. Ce récepteur est formé par l'assemblage de quatre sous-unités, GPIb α , GPIb β , GPV et GPIX, codés par des gènes distincts. Le syndrome de Bernard-Soulier (BS) est une pathologie hémorragique grave provoquée par l'absence ou l'anomalie du complexe GPIb-V-IX. Elle est caractérisée par un temps de saignement allongé, une diminution du nombre des plaquettes circulantes, dont la taille est anormalement élevée (4 à 10 μ m de diamètre) (**Lanza 2006; Lopez et al. 1998**).

Un rôle de ce complexe dans la thrombose et son intérêt comme cible antithrombotique ont été fréquemment avancés au vu de son importance dans l'hémostase primaire. Des études *in vitro* ont montré une diminution de la thrombose lors de la perfusion de sang de patients BS sur des matrices de collagènes ou des portions de vaisseaux extériorisés (**Sakariassen et al. 1986; Weiss et al. 1986**). Cependant, la description d'un patient BS présentant un angor instable a remis en question le rôle protecteur d'un déficit en complexe GPIb-V-IX contre la survenue d'une thrombose (**Humphries et al. 1992**).

Pour évaluer de manière plus complète le niveau de protection contre la thrombose en absence de complexe, nous avons utilisé des modèles de souris reproduisant la pathologie BS. Deux lignées de souris ont été générées au laboratoire par recombinaison homologe ciblant la GPIb β : des souris qui n'expriment pas de complexe à la surface des plaquettes (GPIb $\beta^{-/-}$), reproduisant un syndrome de BS classique, et des souris qui expriment 20% de complexe après délétion du domaine intracellulaire (GPIb $\beta\Delta IC^{-/-}$), reproduisant une forme variante de BS. Les souris GPIb $\beta^{-/-}$ présentent des plaquettes de grande taille, une diminution de 75% du nombre de plaquettes circulantes et un temps de saignement prolongé. Les souris GPIb $\beta\Delta IC^{-/-}$ ont également des grandes plaquettes et une diminution de la numération plaquettaire mais ont un temps de saignement moins prolongé que les souris GPIb $\beta^{-/-}$.

Ces souris ont été évaluées dans le modèle de lésion laser sur artérioles mésentériques ou dans le modèle de thrombose au chlorure de fer (FeCl₃) sur carotide. Le mécanisme par lequel le FeCl₃ induit la formation d'un thrombus occlusif riche en plaquettes n'est pas bien connu mais fait probablement intervenir la formation d'espèces réactives oxydantes conduisant à la dénudation de l'endothélium (**Farrehi et al. 1998; Ni et al. 2000; Tseng et al. 2006**). Dans ce modèle, un inhibiteur de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, l'eptifibatide, diminue de 30%

l'occlusion des carotides. Les carotides de souris traitées avec de l'hirudine, inhibiteur puissant et sélectif de la thrombine, ne présentent pas de thrombose occlusive (Figure 27).

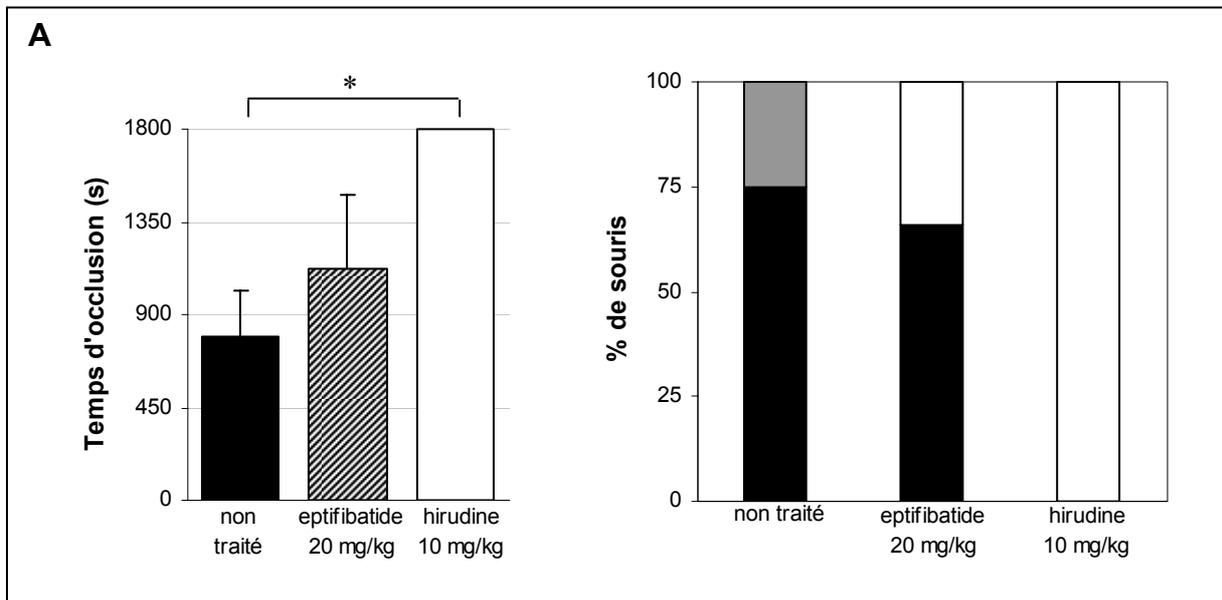


Figure 27 : Caractérisation pharmacologique du modèle de thrombose par application localisée de FeCl₃ sur la carotide de souris. La lésion vasculaire est induite par application d'une compresse imbibée d'une solution à 20% de FeCl₃ sur la carotide pendant 3 minutes. Le débit sanguin est enregistré avec une sonde doppler. A. Le temps nécessaire pour un arrêt du débit sanguin est prolongé par un traitement à l'Eptifibatide (n=3) et à l'hirudine (n=4) par rapport à des souris non traitées (n=8). Les données sont des moyennes ± SEM. Test de Mann-Whitney, * p<0.05. B. A la fin de la période d'observation de 30 minutes, les artères sont classées en vaisseaux non occlus (barre blanche), occlus (barre noire) ou développant une occlusion instable (barre grise) caractérisée par un arrêt momentané du débit sanguin.

Ces deux types de modèles ont été mis à profit pour évaluer le profil thrombotique des souris GPIIb/IIIa^{-/-} et GPIIb/IIIa^{ΔIC}^{-/-}. Dans cette étude plusieurs autres paramètres et fonctions plaquettaires ont été évalués. La thrombose a été aussi évaluée dans un modèle de thromboembolie par l'injection d'un mélange collagène/adrenaline et dans un modèle *in vitro* par perfusion de sang sur une matrice de collagène.

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

Decreased Thrombotic Tendency in Mouse Models of the Bernard-Soulier Syndrome

C. Strassel, C. Nonne, A. Eckly, T. David, C. Leon, M. Freund, J.-P. Cazenave, C. Gachet, F. Lanza

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2007, Vol. 27, Pages 241-247

Pages 241 à 247 :

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

a) b) Conclusion

L'objectif de cette étude était de déterminer le profil thrombotique de modèles de souris reproduisant la pathologie BS. Les souris GPIIb β ^{-/-}, dans lesquelles le gène de la sous-unité GPIIb β a été inactivé, n'expriment pas le complexe, présentent des plaquettes de grande taille, une diminution de 75% du nombre de plaquettes circulantes et un temps de saignement prolongé. Les souris GPIIb β Δ IC^{-/-} dans laquelle la partie codante du domaine intracellulaire a été éliminée expriment 20% de complexe à la surface, ont également des grandes plaquettes et une diminution de la numération plaquettaire mais ont un temps de saignement moins prolongé que les souris GPIIb β ^{-/-}. Au niveau ultrastructural, les plaquettes de ces deux lignées de souris ont une densité et une taille de granules α normaux et un nombre de microtubules par plaquette doublé.

En conditions de flux artériel, la perfusion de sang anti coagulé de souris GPIIb β ^{-/-} et GPIIb β Δ IC^{-/-} sur une matrice de collagène montre une forte diminution de l'adhésion plaquettaire et de la formation d'agrégats par rapport au sang de souris contrôles. Ces résultats confirment les défauts observés lors de la perfusion de sang de patients BS sur des matrices de collagènes ou des portions de vaisseaux extériorisés (**Sakariassen et al. 1986; Weiss et al. 1986**) ou de souris invalidées pour le gène de la GPIIb α et exprimant un transgène incapable de lier le FW sur des matrices de collagène (**Konstantinides et al. 2006**).

Deux modèles de thrombose *in vivo* ont été utilisés pour évaluer le profil thrombotique des souris GPIIb β ^{-/-} et GPIIb β Δ IC^{-/-}. Dans le modèle par lésion de la carotide au FeCl₃, les souris GPIIb β ^{-/-} et GPIIb β Δ IC^{-/-} présentent des temps d'occlusion prolongés avec un défaut plus marqué pour les souris déficientes en GPIIb β . Pour les deux lignées de souris, l'analyse histologique et par microscopie électronique révèle la présence de petits thrombi composés de quelques couches de plaquettes peu activées. Dans le même modèle, des souris n'exprimant pas le domaine extracellulaire de la GPIIb α ont des réponses similaires (**Konstantinides et al. 2006**). La thrombose est fortement diminuée dans les lésions superficielle et sévère induites au laser pour les souris GPIIb β ^{-/-}. Enfin, dans un modèle de thromboembolisme généralisé par injection d'un mélange collagène/adrenaline, les souris GPIIb β ^{-/-} et GPIIb β Δ IC^{-/-} survivent plus longtemps.

Le défaut en FW semble avoir un effet antithrombotique moins prononcé que l'absence de GPIb fonctionnelle suggérant le rôle d'autres ligands se liant à ce récepteur dans l'initiation de la thrombose. En effet, les souris déficientes en FW présentent un défaut d'adhésion plaquettaire et de l'occlusion d'artérioles mésentériques lésées au FeCl₃ mais forment cependant des thrombi importants (**Denis et al. 1998; Ni et al. 2000**). Les données provenant des souris transgéniques exprimant une GPIb α dont le domaine extracellulaire a été remplacé par le récepteur IL-4 humain incapable de lier le FW (**Bergmeier et al. 2006**) confirment que le récepteur GPIb α est impliqué dans la croissance du thrombus dans des conditions de flux élevés. L'ensemble de ces données indiquent que le récepteur GPIb-V-IX est clef dans la formation d'un thrombus artériel et qu'il représente une cible pharmacologique intéressante.

3.1.2. Evaluation d'une lignée de souris présentant une inactivation du gène de la sous-unité GPV

PUBLICATION 4

Reassessment of the pro- or antithrombotic tendency in mice lacking platelet GPV following C57/BL6 backcrossing.

C. Nonne, B. Hechler, M. Freund, S. Moog, C. Meyer, J.-P. Cazenave, C. Gachet, F. Lanza

a) Introduction

Le complexe GPIb-V-IX est constituée de 4 sous-unités parmi lesquelles la GPIb α a été la plus évaluée sur le plan fonctionnel. Son extrémité extracellulaire N-terminale comporte les sites de liaison pour le domaine A1 du FW mais également des sites de liaison pour la thrombine, la P-sélectine et le domaine I de l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ des monocytes (**Berndt et al. 2001**). La GPIb α supporte l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium par son interaction avec le FW, participe à l'activation plaquettaire par la thrombine et joue un rôle clef dans la formation d'un thrombus (**Konstantinides et al. 2006; Strassel et al. 2007**).

Depuis son identification (**Berndt and Phillips 1981**), la fonction de la sous-unité GPV du complexe n'a pas été clairement identifiée. Le clivage de la GPV par la thrombine et par d'autres protéases suggère un rôle régulateur dans la réponse des plaquettes à la thrombine et de l'activité coagulante (**Rabie et al. 2005**).

L'établissement de deux lignées de souris déficientes pour la GPV sur un fond génétique mixte, Sv129 x C57BL6/J a permis récemment d'évaluer son rôle dans les fonctions plaquettaires et dans l'hémostase et la thrombose (**Kahn et al. 1999; Ramakrishnan et al. 1999**). Le phénotype des deux lignées de souris est normal en terme de morphologie et de numération plaquettaire, d'expression de GPIb et d'agrégation en réponses aux agonistes solubles. Cependant, les plaquettes de ces souris ont une réponse diminuée aux faibles doses de collagène et amplifiées aux faibles doses de thrombine (**Moog et al. 2001; Ramakrishnan et al. 1999**). Ces résultats suggèrent que cette protéine agirait comme un corécepteur du collagène et comme modulateur de la réponse plaquettaire à la thrombine.

Des études indépendantes utilisant le modèle de thrombose au FeCl₃ sur des artérioles mésentériques ont montré des réponses divergentes dans ces deux lignées de souris GPV^{-/-}, avec une augmentation (**Ni et al. 2000**) ou une diminution (**Moog et al. 2001**) de la thrombose. Des différences en terme de réponse thrombotique ont également été observées pour un même défaut affectant d'autres gènes comme le fibrinogène, $\alpha_2\beta_1$... (**Gruner et al. 2003; He et al. 2003; Jirouskova et al. 2004; Ni et al. 2003a; Ni et al. 2001**). Une des causes possible à l'origine de ces résultats contradictoires est le fond génétique différent de ces animaux. En effet, des différences de numération plaquettaire, de nombre de récepteurs plaquettaires, de réponse aux tests de coagulation et de réponses thrombotiques ont été

observés dans des souris provenant de fonds génétiques différents (**Li et al. 2004; Peters et al. 2002; Tsakiris et al. 1999**). Afin de réévaluer le rôle de la GPV dans la thrombose en s'affranchissant d'une variabilité liée au fond mixte, les souris déficientes en GPV ont été croisées en retour sur un fond génétique C57BL6/J pur. Le modèle de thrombose au laser a été utilisé pour évaluer à nouveau la réponse thrombotique de ces souris.

Reassessment of the thrombotic responses in mice lacking platelet glycoprotein V.

C. Nonne, B. Hechler, M. Freund, S. Moog, C. Meyer, J.-P.Cazenave, C. Gachet, F. Lanza*.

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

* correspondence: 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

Running title: Role of platelet GPV in thrombosis

Summary:

Background: The exact role of glycoprotein (GP) V, a subunit of the platelet GPIb-V-IX complex, in haemostasis and thrombosis has not yet been clearly defined. Observations of anti- and pro-thrombotic tendencies have been reported in separate strains of GPV knock out mice

Objectives: In an attempt to resolve these conflicting observations, GPV^{-/-} mice were reassessed in several thrombosis models following backcrossing to a C57/BL6 strain.

Methods: GPV^{-/-}BL6 backcrossed mice were analyzed in comparison to C57BL/6J mice in a model of arterial thrombosis induced by laser at two levels of injury and in a model of systemic thrombosis induced by thrombosplastin or collagen+adrenaline.

Results: Thrombus growth and maximal size were not significantly different between GPV^{-/-} and BL6 mice following a severe laser injury of mesenteric arterioles, but the thrombi in GPV^{-/-} displayed an increased stability with a lower tendency to erode. In addition, thrombi were more resistant to clopidogrel treatment in GPV^{-/-} compared to BL6. On the contrary, a tendency to form smaller thrombi was observed in GPV^{-/-} after a milder laser injury. A complex two-sided reactivity was also observed in a model of systemic thromboembolism. Thromboplastin injection resulted in similar mortality rates in GPV^{-/-} and BL6 mice but clopidogrel treatment was less efficient in protecting GPV^{-/-} mice against death compared to BL6 treated mice. On the contrary, an increased survival rate was observed in GPV^{-/-} following injection of a collagen + adrenaline mixture.

Conclusions: These results do not allow to firmly conclude on the role of GPV in thrombosis despite the use of a backcrossed strain. The responses appear to vary according to the model being used, explaining the previous controversy. In models depending on thrombin a

prothrombotic response more resistant to ADP blockade is observed in the absence of GPV, whereas a decreased thrombotic tendency emerges when thrombin is less predominant.

Introduction :

The glycoprotein (GP) Ib-V-IX complex is one of the most abundant platelet surface receptors with an established essential role in primary haemostasis {Berndt, 2001 #158; Andrews, 1999 #163}. Among the four subunits composing GPIb-V-IX (GPIb α , GPIb β , GPIX and GPV), precise functions have mainly been attributed to GPIb α . This subunit serves as a receptor for von Willebrand factor (vWF) and thrombin and also binds P-selectin and integrin $\alpha_m\beta_2$ [1, 2]. vWF and thrombin binding contribute to haemostasis by ensuring adhesion of platelets to the subendothelium and by facilitating their activation by thrombin, respectively [3].

Despite its early biochemical identification [4], the function of the GPV subunit remains unclear. Recent availability of knock out mice has revived interest in exploring its role in haemostasis and thrombosis. Two separate GPV^{-/-} strains have been reported, both on mixed 129/Sv x C57BL/6J backgrounds [5, 6], which displayed normal platelet count, platelet morphology, GPIb-IX expression, vWF-dependent adhesion and aggregation in response to agonists such as ADP and TxA₂. Exceptions to this normal profile were an increased response to low concentrations of thrombin and decreased adhesion and aggregation in response to collagen [7, 8]. Evaluation of these strains in experimental thrombosis models of FeCl₃-induced mesenteric arteriole injury led to divergent observations of decreased [7] or increased [8] thrombosis preventing from concluding on the exact influence of GPV.

In the recent literature, similar variable thrombotic responses have been described following genetic manipulation of other platelet receptors [9-13]. A possible explanation for some of these discrepancies could reside in the use of mixed genetic backgrounds as variations in haemostatic parameters and platelet functions have been reported in different strains of mice [14, 15]. The purpose of this study was to reassess the platelet and thrombotic responses of GPV^{-/-} mice following backcrossing against a C57BL/6J background to reduce

this potential source of variation. The decreased collagen-induced aggregation and adhesion and increased thrombin-induced aggregation were confirmed. These opposed *in vitro* responses translated into pro- and antithrombotic tendencies in GPV^{-/-} mice depending on the type of thrombosis models, most likely in relation to their dependency to thrombin and collagen.

Materials and methods

Materials

Insoluble bovine collagen type I was from Sigma-Aldrich Chemicals (St Louis, MO). Recombinant hirudin was a gift from Dr A. Pavirani (Transgene SA, Strasbourg, France) and 3,3'-dihexylcarbocyanine iodide (DIOC₆) was provided by Molecular Probes (Eugene, OR). Xylasine (Rompun®) and ketamine (Imalgen®) were from Bayer (Puteaux, France) and Merial (Lyon, France), respectively. Aspirin was purchased from Synthelabo (Le Plessis Robinson, France) and thrombin from Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France).

Mouse strains

GPV-deficient (GPV^{-/-}) mice on a mixed 129/Sv x C57BL/6J background had been raised as described previously [5, 7]. After backcrossing randomly to produce a 99% congenic strain at the F7 generation, these mice were used for experiments and compared with a pure C57BL/6J strain (Charles River, France). The mice were maintained in the animal facilities of the Etablissement Français du Sang-Alsace, Strasbourg, France.

Platelet aggregation

Blood (9 vol) was drawn from the abdominal aorta of anesthetized animals into a plastic syringe containing acid-citrate-dextrose anticoagulant (1 vol) and centrifuged at 1,570 g for 10 s per mL of blood. Platelet-rich plasma (PRP) was removed and centrifuged at 1,570 g for 10 min. Washed platelets were prepared as previously described [7] and kept at 37°C throughout all experiments. Aggregation was measured at 37°C by a turbidimetric method in a dual-channel Payton aggregometer (Payton Associates, Scarborough, Ontario, Canada). A 450 µL aliquot of platelet suspension was stirred at 1,100 rpm and activated by addition of collagen (2.5 µg/mL) in the presence of human fibrinogen (0.05 mg/mL) or by addition of

thrombin (0.008 U/mL), in a final volume of 500 μ L. The extent of aggregation was estimated by measuring the maximum curve height above the baseline.

In vitro model of platelet adhesion to immobilized collagen in a flow system

Platelet adhesion under flow was studied as described previously [16]. Whole blood anticoagulated with hirudin (250 U/mL) was perfused at 1,500 s^{-1} or 3,000 s^{-1} through a collagen-coated glass capillary (VitroCom, Mountain Lakes, NJ). The adhesion of DIOC₆-labelled platelets was visualized in real time under an inverted fluorescence microscope (Leica DMIRB; Leica Microsystems SA, Westlar, Germany) (63x objective) coupled to a video camera (DAGE MTI, Michigan City, MI) and images were recorded on DVD-RAM tapes (WDR 200; Matsushita Electric Industrial, Osaka, Japan). Off-line analysis of the surface coverage was performed on single frames obtained from digital photographs of the capillary surface.

In vivo models of thrombosis

Laser-induced arterial thrombosis was studied as described by Nonne et al. [16]. Localized injury of the luminal surface of mesenteric arterioles was induced in mice weighing 15 g using a pulsed nitrogen dye laser (440 nm) applied through the microscope objective of a DMIRB microscope (Leica Microsystems) with a Micropoint laser system (Photonics Instruments, St Charles, IL). Reproducible lesions inducing a reversible parietal or more extensive almost occlusive thrombus were produced by adjusting the firing time and laser intensity. For each type of lesion, 1 to 5 arterioles were targeted over a period of 45 min with only one injury per vessel. To precisely delimit the contours of the thrombi and measure their surface area, DIOC₆ (5 μ L of a 100 μ M solution/g of body weight) was injected into the jugular vein prior to injury. Images were acquired sequentially with wide field and fluorescent

light using a SensiCam CCD camera (2 x 2 binning; Cooke, Auburn Hill, MI) controlled by Slidebook software (Intelligent Imaging Innovations, Denver, CO, USA). For severe lesions, the image acquisition was slightly modified as compared to the published method to visualize the entire thrombus and later time points [11, 16, 17] by using a 20x objective and 15 min acquisition time instead of a 40x objective and 5 min acquisition time. With this modification in image acquisition progressive thrombus regression can be visualized at later time points.

The model of acute systemic vascular thromboembolism induced by infusion of thromboplastin or a mixture of collagen and adrenaline has been described previously [18, 19]. Briefly, mice weighing 20-25 g were anesthetized and the jugular veins were exposed surgically. Thromboplastin (125-150 $\mu\text{L}/\text{kg}$) or a mixture of collagen (0.3 mg/kg) and adrenaline (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was infused for 3-4 s into the right jugular vein. The mice were observed for 30 min and those which recovered were killed subsequently.

The manipulator was unaware of the mouse genotype while performing these experiments.

Statistical analyses

A non parametric Mann-Whitney test of differences was applied to the means or the areas under the curve (laser-induced arterial thrombosis model) for two mouse strains or after treatment. The χ^2 test was used to determine the significance of the differences in survival in the sudden death assay or in occlusion in the FeCl_3 -induced arterial thrombosis model. *P* values of less than 0.05 were considered to be significant and all tests were performed using PrismTM software (GraphPad Software, CA).

Results

Responses of GPV^{-/-}BL6 platelets to collagen and thrombin

Previous observations of an increased response to thrombin and of decreased reactivity to collagen [6, 7] were confirmed in GPV^{-/-} mice backcrossed on a C57BL/6J background (GPV^{-/-}BL6 mice). Increased platelet aggregation was observed in response to a low (0.008 U/mL) (Fig. 1a) but not to higher concentrations of thrombin (data not shown). Delayed shape change and diminished aggregation were observed in response to a low concentration (2.5 µg/mL) of fibrillar collagen (Fig. 1b). Defective interaction of platelets with collagen, suggested by the delayed shape change on the aggregation tracing, was confirmed in experiments in which hirudin-anticoagulated blood was perfused through collagen-coated glass capillaries. Decreased adhesion of individual GPV^{-/-}BL6 platelets was observed at early perfusion times and a shear rate of 1,500 s⁻¹, but not at 3,000 s⁻¹ (Fig. 1c). At later times, the aggregates formed were of similar size for GPV^{-/-}BL6 and control platelets at both shear rates (data not shown).

Variable reactivity of GPV^{-/-}BL6 mice in a laser-induced arterial thrombosis model with two levels of severity

Thrombosis was evaluated *in vivo*, firstly in a model of localized laser injury of mesenteric arterioles [16, 20]. Superficial vessel wall injury induced a reversible platelet-rich thrombus of smaller size in GPV^{-/-} as compared to GPV^{+/+} mice (Fig. 2), although the difference did not reach statistical significance (p = 0.0788, n = 27). A severe laser injury triggered formation of a larger thrombus which grew similarly in both strains (Fig. 3a) but subsequent erosion was slower in GPV^{-/-} mice (40.7 % size decrease at 10 min) than in GPV^{+/+} animals (71.3 % decrease) (** p = 0.0051, n = 22). To evaluate a possible implication of thrombin in the increased thrombus stability in GPV^{-/-}, the same type of lesion was performed in hirudin-treated mice. The size of the thrombus was severely decreased in both strains, but its regression was this time faster in GPV^{-/-} mice (Fig. 3b). On the contrary, in

mice treated with the P2Y₁₂ antagonist clopidogrel, to prevent amplification by ADP, thrombus formation was decreased with less efficiency in GPV^{-/-} mice (** p = 0.0027, n = 8) (Fig. 3c). Overall, GPV^{-/-}BL6 mice behaved differently in this arterial model depending on the degree of vessel wall injury, with a tendency towards more thrombosis when thrombin formation was not prevented.

Resistance of GPV^{-/-}BL6 mice to intravascular thromboembolism

Thrombosis was also evaluated in a model of intravascular platelet aggregation following intravenous injection of a mixture of collagen and adrenaline or thromboplastin. These agents induce mortality through obstruction of the lung microcirculation [18, 19]. Injection of collagen and adrenaline led to death in 77.5 % of GPV^{+/+} mice within 10 min and little additional mortality in the next 20 min (Fig. 4a). By comparison, only 55 % of GPV^{-/-} mice died within 10 min (* p = 0.0131, n = 40) and 65% within 30 min, and their mean survival time was increased (604 ± 98 versus 935 ± 110 s in GPV^{+/+}) (** p = 0.056, n = 40) (Fig. 4b). By contrast, injection of a high dose of thromboplastin (150 µl/kg) led to an identical number of deaths (85% at 30 min) and an equivalent rate of mortality in both strains (p = 0.6415, n = 40) (Fig. 4c). A lower dose of thromboplastin (125 µl/kg) led to a decreased and again a similar number (50 % at 30 min) of deaths in both strains (Fig. 4d). Under this condition, prevention of ADP amplification by clopidogrel administration resulted in 90 % survival in GPV^{+/+} mice at 30 min compared to 65 % in GPV^{-/-} (Fig. 4e). These results again suggested an increased sensitivity of GPV deficient mice to thrombosis in a thrombin-dependent model but a decreased reactivity when the role of collagen predominates.

Discussion

Two previous studies evaluating the role of GPV in thrombosis have led to divergent conclusions of pro- or antithrombotic tendencies in GPV knock out mice [7, 8]. The present work, using GPV-deficient mice backcrossed on a C57/BL6 background, reconciles these differences by showing that both decreased and increased thrombosis can be observed depending on the nature of the lesion and stimuli. A tendency towards decreased thrombosis was observed in models where thrombus formation was less dependent on thrombin responses, such as in a mild laser-induced arterial lesion, a more severe lesion following hirudin administration, or systemic thromboembolism induced by collagen and adrenaline. On the other hand, increased thrombosis occurred when the role of thrombin predominated, with an enhanced thrombus stability after a severe laser-induced arterial lesion and an increased mortality in thromboplastin-induced thromboembolism in clopidogrel treated animals.

GPV^{-/-}BL6 backcrossed mice exhibited aggregation and adhesion defects similar to those originally observed in a mixed GPV^{-/-} strain, with however smaller differences by comparison with the original study [7]. Decreased responses to collagen supported the hypothesis that GPV could serve as an accessory receptor for collagen through a mechanism which remains to be fully elucidated [7]. An increased sensitivity to thrombin was also confirmed in GPV^{-/-}BL6 mice, a defect which like the collagen response was revealed at low agonist concentrations. A possible explanation for this increased response is that more thrombin becomes locally available, in the absence of a major substrate estimated at 12,000 copies per platelet, to activate its platelet receptors (PAR3-4 and GPIb α). An alternative proposal is that lack of GPV could relieve a putative negative regulatory role of GPV on GPIb α -dependent thrombin signalling functions by virtue of its close proximity to GPIb [6]. Confirmatory and complementary experiments are clearly needed to distinguish between these hypotheses.

Evaluation of GPV^{-/-}BL6 mice in models of arterial and systemic thrombosis revealed intricate anti- and prothrombotic tendencies as a function of the type of challenge. Therefore, the opposing responses observed on separate mixed strains [7, 8], are most likely explained by differences in the thrombosis models rather than in genetic backgrounds. Even though the earlier studies used similar FeCl₃-injury methods variations between laboratories would not be surprising due to the difficulties in standardising this type of injury. There is for example recent evidence that the degree of collagen exposure and thrombin activation can vary significantly depending on the concentration of FeCl₃ applied externally to the mesenteric artery [21].

Laser injury offers some advantages over FeCl₃ in terms of reproducibility, since it allows for localized lesions at the inner vascular wall with calibrated levels of severity [16]. In this model, slightly but consistently smaller thrombi developed in GPV^{-/-}BL6 mice following a superficial vascular lesion. This defect is reminiscent of the decreased thrombosis in GPVI/FcR γ -deficient mice after superficial injury [11]. This would be consistent with the decreased collagen response in GPV deficiency but the lack of statistical difference warns against a firm conclusion on a direct link between the *in vitro* and *in vivo* results [7]. On the other hand, an increased stability of GPV^{-/-} thrombi was observed after a severe lesion, a defect which agrees with the greater sensitivity to thrombin observed *in vitro* [16]. Therefore, opposing responses were reproduced in this controlled model, providing a plausible explanation for the conflicting results based on differences in the extent of vascular injury and the relative involvement of thrombin.

The hypothesis that the thrombotic profile of GPV-deficient mice is conditioned by the degree of involvement of thrombin was further sustained by results in a systemic thromboembolism model. GPV^{-/-}BL6 mice displayed a clear resistance to mortality after injection of collagen and adrenaline, a protection resembling that in mice lacking the

GPVI/FcR γ -collagen receptor [22, 23]. On the contrary, no protection was observed after thromboplastin injection and an increased mortality was even observed versus GPV^{+/+} when the ADP stabilizing was prevented by clopidogrel. Interestingly, a similar “resistance” to clopidogrel treatment was also observed in the severe laser-induced arterial lesion. It appears as if the increased thrombin response generated by the lack of GPV could compensate for the absence of amplification by ADP.

In conclusion, this study supports the notion of a dual role of platelet GPV, through mechanisms still to be clarified, resulting in enhanced or decreased thrombosis. This study also exemplifies that the same genetic manipulation of a platelet protein can lead to variable haemostatic and thrombotic responses depending on the nature of the vessel injury. These results should provide an incentive for the systematic evaluation of genetically modified mice in several well characterized thrombosis models. This study does not solve the question of the exact function of GPV but further indicates that its deficiency has clear repercussions in thrombosis. Extension of these results to human pathology is still premature but the observation of GPV cleavage in myocardial infarction and stroke [24, 25] raises the possibility that GPV could play a role in these atherothrombotic events.

Acknowledgments

We thank Juliette Mulvihill for reviewing the English of the manuscript.

Legends to Figures:

Fig. 1. Responses of GPV^{-/-}BL6 platelets to thrombin and collagen. (a, b) Washed platelets were prepared from a C57BL6 strain (+/+) (*upper tracings*) and from GPV^{-/-} mice backcrossed against a BL6 strain (-/-) (*lower tracings*). (a) Enhanced aggregation was observed in GPV^{-/-}BL6 platelets in response to 0.008 U/mL human alpha-thrombin. (b) An increased lag time (bar) and decreased amplitude of aggregation were observed in GPV^{-/-}BL6 platelets in response to 2.5 µg/mL bovine type I fibrillar collagen in the presence of 0.05 mg/mL human fibrinogen. Tracings are representative of three separate experiments. (c) Hirudin-anticoagulated blood from BL6 or GPV^{-/-}BL6 mice was perfused at 1,500 or 3,000 s⁻¹ over type I fibrillar collagen. The number of single adherent platelets at 20 s was decreased in the GPV^{-/-}BL6 strain at 1,500 s⁻¹. Results are the mean values (± SEM) from 3 to 5 independent experiments.

Fig. 2. Effect of GPV deficiency on thrombus formation following superficial laser-induced injury of mesenteric arterioles. Localized injury of the luminal surface of mesenteric arterioles was induced in GPV^{-/-}BL6 and BL6 mice using a pulsed nitrogen dye laser. Superficial lesions leading to formation of a reversible parietal thrombus were produced by adjusting the firing time and laser intensity. Tracings represent the mean thrombus area (± SEM) of the thrombi developing over 180 s. Analyses were performed on 27 vessels in 7 GPV^{-/-}BL6 mice and 25 vessels in 7 BL6 animals.

Fig. 3. Effect of GPV deficiency on thrombus formation following severe laser-induced injury of mesenteric arterioles and its modulation by hirudin or clopidogrel treatment. Severe injury of the luminal surface of mesenteric arterioles was induced in GPV^{-/-}BL6 and BL6 mice by adjusting the firing time and laser intensity. Tracings represent the mean surface area (± SEM) of the thrombi developing over 900 s. (a) Similar thrombosis developed during the first 200 s

in the GPV^{-/-}BL6 (22 vessels in 13 mice) and BL6 strains (25 vessels in 13 mice). The thrombus size decreased over the next 700 s at a slower rate in GPV^{-/-}BL6 as compared to BL6 animals. (b) Mice were treated with hirudin (10 mg/kg s.c.) before vessel injury. Thrombus size reached a maximum at 180 s and was reduced by 65 % in the GPV^{-/-}BL6 (7 vessels in 4 mice) and by 59.5 % in the BL6 strain (7 vessels in 4 mice) as compared to untreated mice. Thrombus regression was accelerated in GPV^{-/-}BL6 as compared to BL6. (c) Mice were treated with clopidogrel (50 mg/kg p.o.) before vessel injury. The maximal size of the thrombus was decreased with less efficiency in the GPV^{-/-}BL6 (8 vessels in 4 mice) than in the BL6 strain (6 vessels in 4 mice) as compared to untreated mice (46 % versus 75.4 % decrease, respectively).

Fig. 4. Effect of GPV deficiency on the mortality induced by systemic thromboembolism. A mixture of collagen (0.3 mg/kg) and adrenaline (60 µg/kg) (a,b) or thromboplastin (150 and 125 µL/kg) without (c,d) or with prior clopidogrel administration (e) was injected i.v. as a bolus into GPV^{-/-}BL6 and BL6 mice and the mortality was monitored for 30 min. (a, c, d, e). Results are expressed as the percentage of mice still alive (survival) as a function of time. (b) The mean survival time (± SEM) was recorded after injection of collagen and adrenaline. Mice still alive at 1800 s were attributed a survival time of 1801 s.

- 1 Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V and Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1998; **91**(12): p. 4397-418.
- 2 Andrews RK and Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* 2004; **114**(5-6): p. 447-53.
- 3 Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; **8**(11): p. 1227-34.
- 4 Phillips DR and Berndt MC. Platelet membrane glycoprotein V purification. *Methods Enzymol* 1992; **215**: p. 176-80.
- 5 Kahn ML, Diacovo TG, Bainton DF, Lanza F, Trejo J and Coughlin SR. Glycoprotein V-deficient platelets have undiminished thrombin responsiveness and Do not exhibit a Bernard-Soulier phenotype. *Blood* 1999; **94**(12): p. 4112-21.
- 6 Ramakrishnan V, Reeves PS, DeGuzman F, Deshpande U, Ministri-Madrid K, DuBridges RB and Phillips DR. Increased thrombin responsiveness in platelets from mice lacking glycoprotein V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(23): p. 13336-41.
- 7 Moog S, Mangin P, Lenain N, Strassel C, Ravanat C, Schuhler S, Freund M, Santer M, Kahn M, Nieswandt B, Gachet C, Cazenave JP and Lanza F. Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood* 2001; **98**(4): p. 1038-46.
- 8 Ni H, Ramakrishnan V, Ruggeri ZM, Papalia JM, Phillips DR and Wagner DD. Increased thrombogenesis and embolus formation in mice lacking glycoprotein V. *Blood* 2001; **98**(2): p. 368-73.
- 9 Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, Heinzmann U and Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 2003; **197**(1): p. 41-9.
- 10 Munnix IC, Strehl A, Kuijpers MJ, Auger JM, van der Meijden PE, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG, Nieswandt B and Heemskerk JW. The glycoprotein VI-phospholipase Cgamma2 signaling pathway controls thrombus formation induced by collagen and tissue factor in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**(12): p. 2673-8.
- 11 Mangin P, Yap CL, Nonne C, Sturgeon SA, Goncalves I, Yuan Y, Schoenwaelder SM, Wright CE, Lanza F and Jackson SP. Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcRgamma deficiency. *Blood* 2006; **107**(11): p. 4346-53.
- 12 He L, Pappan LK, Grenache DG, Li Z, Tollefsen DM, Santoro SA and Zutter MM. The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood* 2003; **102**(10): p. 3652-7.
- 13 Gruner S, Prostredna M, Schulte V, Krieg T, Eckes B, Brakebusch C and Nieswandt B. Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo. *Blood* 2003; **102**(12): p. 4021-7.
- 14 Li TT, Larrucea S, Souza S, Leal SM, Lopez JA, Rubin EM, Nieswandt B and Bray PF. Genetic variation responsible for mouse strain differences in integrin alpha 2 expression is associated with altered platelet responses to collagen. *Blood* 2004; **103**(9): p. 3396-402.
- 15 Peters LL, Cheever EM, Ellis HR, Magnani PA, Svenson KL, Von Smith R and Bogue MA. Large-scale, high-throughput screening for coagulation and hematologic phenotypes in mice. *Physiol Genomics* 2002; **11**(3): p. 185-93.
- 16 Nonne C, Lenain N, Hechler B, Mangin P, Cazenave JP, Gachet C and Lanza F. Importance of platelet phospholipase Cgamma2 signaling in arterial thrombosis as a function of lesion severity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**(6): p. 1293-8.
- 17 Hechler B, Nonne C, Roh EJ, Cattaneo M, Cazenave JP, Lanza F, Jacobson KA and Gachet C. MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-

- bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **316**(2): p. 556-63.
- 18 DiMinno G and Silver MJ. Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; **225**(1): p. 57-60.
- 19 Leon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave JP and Gachet C. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest* 1999; **104**(12): p. 1731-7.
- 20 Hechler B, Lenain N, Marchese P, Vial C, Heim V, Freund M, Cazenave JP, Cattaneo M, Ruggeri ZM, Evans R and Gachet C. A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *J Exp Med* 2003; **198**(4): p. 661-7.
- 21 Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B and Furie BC. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* 2006; **107**(10): p. 3902-6.
- 22 Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokhtari-Nejad R, Rackebrandt K, Cazenave JP, Ohlmann P, Gachet C and Zirngibl H. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med* 2001; **193**(4): p. 459-69.
- 23 Lockyer S, Okuyama K, Begum S, Le S, Sun B, Watanabe T, Matsumoto Y, Yoshitake M, Kambayashi J and Tandon NN. GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thromb Res* 2005; **118**(3): p. 371-80.
- 24 Aleil B, Meyer N, Wolff V, Kientz D, Wiesel ML, Gachet C, Cazenave JP and Lanza F. Plasma glycoprotein V levels in the general population: normal distribution, associated parameters and implications for clinical studies. *Thromb Haemost* 2006; **96**(4): p. 505-11.
- 25 Wolff V, Aleil B, Giroud M, Lorenzini JL, Meyer N, Wiesel ML, Cazenave JP and Lanza F. Soluble platelet glycoprotein V is a marker of thrombosis in patients with ischemic stroke. *Stroke* 2005; **36**(3): p. e17-9.

b) Conclusion

Bien qu'étant une sous-unité constitutive du complexe GPIIb-IIIa, la GPV n'est pas impliquée dans les propriétés d'adhésion au FW. L'étude *in vitro* des souris déficientes en GPV croisées en retour sur un fond pur C57BL/6/J confirme l'observation d'une diminution de l'agrégation et de l'adhésion au collagène (**Moog et al. 2001**). Les différences sont modestes et observées surtout en présence de faibles doses de collagène suggérant que la GPV serait plutôt un récepteur accessoire au collagène. Une augmentation de la réponse aux faibles doses de thrombine des plaquettes GPV^{-/-} est aussi confirmée. L'explication la plus probable est qu'en absence de GPV à la surface des plaquettes, la thrombine serait localement plus disponible pour activer ses récepteurs (PARs et GPIIb). Une autre hypothèse a été proposée conférant à GPV un rôle de régulateur négatif de l'activation de la sous-unité GPIIb par la thrombine (**Ramakrishnan et al. 2001**).

Des travaux précédents avaient proposé un rôle anti- ou pro-thrombotique pour la sous-unité GPV sur des expériences réalisées indépendamment dans un même modèle de thrombose au FeCl₃ sur artérioles mésentériques (**Moog et al. 2001; Ni et al. 2000**). Cette étude, utilisant des souris GPV^{-/-} sur fond génétique C57BL/6/J réconcilie ces observations contradictoires en démontrant une légère diminution ou une amplification marquée de la thrombose en l'absence de GPV selon le type de lésion réalisée et l'importance des différents agonistes produits localement. Pour ces souris, une diminution de la thrombose est observée dans des modèles plus dépendants du collagène tels que la lésion laser superficielle, la lésion sévère en présence d'hirudine et le thromboembolisme par injection d'un mélange collagène/adrenaline. Au contraire dans des modèles générant de la thrombine, la thrombose est normale dans le modèle de thromboembolisme déclenché par le facteur tissulaire et amplifiée suite à une lésion laser sévère.

La mortalité des souris GPV^{-/-} est augmentée par comparaison aux souris GPV^{+/+} dans un modèle de thromboembolisme déclenché par le facteur tissulaire en présence de clopidogrel qui inhibe le rôle stabilisateur de l'ADP sur la thrombose. Dans la lésion sévère, une résistance au traitement clopidogrel est également observée pour ces souris, l'amplification de la réponse à la thrombine des plaquettes déficientes en GPV compensant l'absence d'amplification à l'ADP.

En conclusion, l'étude des souris GPV^{-/-} a montré une tendance pro- ou anti-thrombotique qui pourrait dépendre de la contribution du collagène et de la thrombine dans différents modèles de thrombose.

3.2. Le récepteur au collagène GPVI/ γ RFc

PUBLICATION 5

Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcRgamma deficiency. *Blood*. 2006 Jun 1;107(11):4346-53.

Mangin P*, Yap CL*, Nonne C*, Sturgeon SA, Goncalves I, Yuan Y, Schoenwaelder SM, Wright CE, Lanza F, Jackson SP. (*premiers auteurs équivalents)

3.2.1. Introduction

Le collagène est une protéine adhésive de la matrice vasculaire fortement thrombogène et un des agonistes plaquettaires les plus puissants avec la thrombine. L'utilisation de peptides synthétiques en triple hélice comprenant des motifs de reconnaissance du collagène ont permis d'étudier les propriétés de liaison et d'activation des plaquettes au collagène (**Barnes et al. 1996; Farndale et al. 2004**). La plaquette possède plusieurs glycoprotéines de surface susceptibles de se lier au collagène, dont la GPVI et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ sont fonctionnellement les plus importants (**Barnes et al. 1996**).

L'importance de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ pour l'adhésion au collagène est bien établie (**Clemetson and Clemetson 2001**) mais son implication dans la croissance du thrombus *in vitro* (**Chen et al. 2002a; Holtkotter et al. 2002; Kuijpers et al. 2003; Nieswandt et al. 2001b**) et *in vivo* (**Gruner et al. 2003; He et al. 2003**) reste controversée.

La GPVI, une glycoprotéine de 62 kDa, fait partie de la famille des immunoglobulines. Les patients déficients en GPVI présentent des défauts de réponses au collagène et ont des saignements modérés (**Arai et al. 1995; Moroi et al. 1989; Takahashi and Moroi 2001; Yagisawa et al. 1994**). La GPVI est associée à la chaîne γ des récepteurs Fc (γ RFc), une association nécessaire pour l'expression à la surface plaquettaire et pour la signalisation intracellulaire (**Clemetson and Clemetson 2001; Nieswandt et al. 2001a; Tsuji et al. 1997**). La liaison de GPVI au collagène entraîne son « clustering » et le regroupement de tyrosine kinases de la famille src générant la phosphorylation des motifs ITAM de la γ RFc (**Ezumi et al. 1998; Quek et al. 2000**). Ceci conduit au recrutement et à l'autophosphorylation de la tyrosine kinase p72syk qui va mener à l'activation de la PLC γ 2 et la libération de calcium intracellulaire (**Asselin et al. 1997; Ichinohe et al. 1995; Poole et al. 1997**).

La GPVI a été proposée comme jouant un rôle central dans la formation d'un thrombus au vu des études de perfusion sur collagène de sang humain traité par un anticorps anti-GPVI et de sang de souris déficientes en GPVI ou déplétées en GPVI par injection de l'anticorps JAQ1 (**Kato et al. 2003; Lecut et al. 2003; Nieswandt et al. 2001b; Sarratt et al. 2005**). Les premiers résultats dans des modèles de thrombose artérielle par lésion mécanique (**Massberg et al. 2003; Massberg et al. 2004b**) ou chimique (**Massberg et al. 2003; Munnix et al. 2005**) ont montré une thrombose fortement diminuée et suggéré que ce récepteur pouvait être une cible antithrombotique intéressante.

Nous avons réévalué le rôle de la GPVI dans la thrombose en utilisant une lignée de souris déficientes pour le corécepteur de la GPVI, la chaîne γ des récepteurs Fc (γ FcR) et qui n'expriment pas de GPVI à la surface des plaquettes (**Tsuji et al. 1997**). Les souris ont été évaluées dans plusieurs modèles de thrombose. Le premier est une adaptation du modèle de Folts, développé à l'origine dans la coronaire de chien, à la carotide de souris (**Sturgeon et al. 2006**). Une lésion mécanique de la paroi est réalisée à l'aide d'une pince au niveau d'une sténose entraînant des cycles de diminution/restauration du flux (CFR) dus à la formation et à l'embolisation d'un thrombus plaquettaire. Le second est un modèle de lésion de la carotide par un courant électrique, l'électrode étant à la surface du vaisseau, associée à une sténose (**Sturgeon et al. 2006**). Ces deux modèles induisent la formation d'un thrombus occlusif essentiellement plaquettaire qui est évalué par la mesure du débit artériel en aval du site de la lésion. La thrombose est inhibée dans ces deux modèles par un antagoniste de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le clopidogrel (**Sturgeon et al. 2006**). Le troisième est le modèle de lésion laser d'artérioles mésentériques qui permet de suivre par microscopie intravitale la cinétique de formation du thrombus. La lésion superficielle qui expose une matrice riche en collagènes III et IV est sensible aux antiplaquettaires connus. La lésion sévère expose les différentes couches de la paroi au sang circulant et génère de la thrombine. La thrombose consécutive à cette lésion est sensible aux antiplaquettaires et à l'hirudine (**Nonne et al. 2005**).

La réponse des plaquettes γ FcR^{-/-} en présence ou non de thrombine a été évaluée *in vitro* par perfusion à flux élevés sur une matrice de collagène de sang prélevé sur hirudine ou sur un inhibiteur du facteur XIIa (CTI : *corn trypsin inhibitor*), retardant la génération de thrombine en bloquant la phase contact de la coagulation.

Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcR γ deficiency

Pierre Mangin, Cindy L. Yap, Christelle Nonne, Sharelle A. Sturgeon, Isaac Goncalves, Yiping Yuan, Simone M. Schoenwaelder, Christine E. Wright, Francois Lanza, and Shaun P. Jackson

Fibrillar collagens are among the most potent activators of platelets and play an important role in the initiation of thrombosis. The glycoprotein VI (GPVI)/FcR γ -chain complex is a central collagen receptor and inhibitors of GPVI produce a major defect in arterial thrombogenesis. In this study we have examined arterial thrombus formation in mice lacking the GPVI/FcR γ -chain complex (FcR $\gamma^{-/-}$). Using 3 distinct arterial thrombosis models involving deep vascular injury, we demonstrate that deficiency of GPVI/FcR γ is not associated with a major defect in arterial throm-

bus formation. In contrast, with milder vascular injury deficiency of GPVI/FcR γ was associated with a 30% reduction in thrombus growth. Analysis of FcR $\gamma^{-/-}$ platelets in vitro, using thrombin-dependent and -independent thrombosis models, demonstrated a major role for thrombin in overcoming the thrombosis defect associated with GPVI/FcR γ deficiency. Inhibition of thrombin in vivo produced a much greater defect in thrombus formation in mice lacking GPVI/FcR γ compared with normal controls. Similarly, thrombin inhibition produced a marked prolonga-

tion in bleeding time in FcR $\gamma^{-/-}$ mice relative to wild-type mice. Our studies define an important role for thrombin in overcoming the hemostatic and thrombotic defect associated with GPVI/FcR γ deficiency. Moreover, they raise the interesting possibility that the full antithrombotic potential of GPVI receptor antagonists may only be realized through the concurrent administration of anticoagulant agents. (Blood. 2006;107:4346-4353)

© 2006 by The American Society of Hematology

Introduction

Platelet adhesion and aggregation at sites of vascular injury is essential for the cessation of bleeding; however, excessive accumulation of platelets at sites of atherosclerotic plaque rupture can result in arterial thrombotic occlusion, leading to acute myocardial infarction and ischemic stroke.¹ A major factor contributing to the heightened thrombogenic potential of atherosclerotic lesions is the high content of type I and III fibrillar collagens in advanced plaques.² These substrates are among the most potent activators of platelets and are thought to play a major role in promoting platelet thrombus formation in vivo. Recently, there has been increased focus on collagen receptors as potential antithrombotic targets, due in part to the recognized importance of collagens in atherothrombosis,³ the demonstration that inhibitors targeting collagen receptors can produce an antithrombotic effect in vivo,^{4,7} and the finding that collagen receptor deficiency leads to a relatively mild bleeding tendency.⁸

Considerable progress has been made over the last few years in elucidating the relative roles of 2 major collagen receptors, glycoprotein VI (GPVI) and integrin $\alpha_2\beta_1$, in promoting platelet adhesion and thrombus growth.⁹ There is compelling evidence that GPVI is of central importance for collagen activation of platelets, with deficiency of GPVI leading to defective platelet adhesion and thrombus growth.^{4,10} The importance of integrin $\alpha_2\beta_1$ remains

controversial, although recent studies have suggested that it also plays a key role in promoting primary platelet adhesion on collagen, but is less important for thrombus growth.¹¹ GPVI is a member of the immunoglobulin superfamily of cell-surface receptors and is noncovalently complexed with the FcR γ -chain. The FcR γ -chain is the critical signaling element of the GPVI/FcR γ complex and is essential for GPVI expression on the surface of human and murine platelets.¹²⁻¹⁴ Several recent studies have demonstrated an indispensable role for the GPVI/FcR γ complex in promoting thrombus formation in vivo, with defects in thrombus development of similar magnitude to that reported for inhibitors against GPIb/V/IX and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.⁵⁻⁷ This, combined with the demonstration that inhibitors of GPVI produce a relative minor defect in hemostasis, has raised the possibility that GPVI receptor antagonists may have a relatively wide therapeutic window relative to other antiadhesive agents.^{4,10}

To investigate the importance of the GPVI/FcR γ -chain complex in arterial thrombogenesis we have examined thrombus formation in 3 distinct in vivo thrombosis models using FcR γ -deficient (FcR $\gamma^{-/-}$) mice. The results of these experiments were compared against integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and P2Y₁₂ receptor antagonists and demonstrated an unexpected minor role for GPVI/FcR γ in promoting arterial thrombosis. Our studies demonstrate that the hemostatic

From the Australian Centre for Blood Diseases, Monash University, Melbourne, Victoria, Australia; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U.311, Etablissement Français du Sang (EFS), Strasbourg, France; and the Department of Pharmacology, University of Melbourne, Victoria, Australia.

Submitted October 26, 2005; accepted December 2, 2005. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, January 3, 2006; DOI 10.1182/blood-2005-10-4244.

Supported by INSERM, Association de Recherche et de Développement en Médecine et en Santé Publique (ARMESA), and grants from the National Health and Medical Research Council (NH&MRC).

P.M., C.N., and C.L.Y. contributed equally to this study.

An Inside *Blood* analysis of this article appears at the front of this issue.

Reprints: Shaun P. Jackson, Australian Centre for Blood Diseases, Monash University, Melbourne, Victoria 3004, Australia; e-mail: shaun.jackson@med.monash.edu.au.

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.

© 2006 by The American Society of Hematology

and thrombosis defect associated with GPVI/FcR γ -chain is primarily manifest under experimental conditions limiting thrombin generation. These studies demonstrate an important role for thrombin in overcoming the thrombosis defect associated with GPVI/FcR γ deficiency and raise the possibility that the full antithrombotic potential of GPVI receptor antagonists may only be realized with coadministration of anticoagulant agents.

Materials and methods

Mouse strains

FcR γ -deficient mice were provided by Prof Takashi Saito (Department of Molecular Genetics, Graduate School of Medicine, Chiba, Japan).¹⁵

Static calcium assays and flow-based adhesion assays

Washed platelets¹⁶ loaded with calcium indicator dyes¹⁷ and 2.5 mM Probenecid (Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australia) were applied to fibrillar type I collagen-coated coverslips (2.5 mg/mL) for up to 30 minutes at 37°C. Real-time platelet calcium flux was monitored using confocal microscopy and analyzed offline to obtain single-cell calcium tracings, while the number of platelets exhibiting oscillatory calcium flux was calculated as a percentage of total adherent platelets. Adherent platelets mounted on coverslips were then fixed with 2% glutaraldehyde in 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4, for 60 minutes, then incubated with 1% OsO₄ in 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4 for 30 minutes. The fixed platelets were dehydrated by successive immersions in increasing concentrations of ethanol followed by critical-point drying. The coverslips on which the fixed platelets were attached were mounted on scanning electron microscopy¹⁸ stubs and coated with gold prior to imaging using a Hitachi 5570 scanning electron microscope. The number of spread platelets was quantified as a percentage of total adherent platelets. For flow-based assays,¹⁷ anticoagulated whole blood (100 μ g/mL lepirudin) or blood collected into 40 μ g/mL Factor XIIa (FXIIa) inhibitor (corn trypsin inhibitor; Merck, Kilsyth, Australia) was labeled with DiOC₆ (1 μ M) and perfused through fibrillar type I collagen-coated microcapillary tubes (2.5 mg/mL) at 500 s⁻¹ for 3 minutes. Platelets and thrombi were observed using an inverted Leica DMIRB microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and a 40 \times 0.55 numeric aperture (NA) water objective. Images were acquired using a Dage-MTI charge-coupled device (CCD) camera 300 ETRCX (Dage-MTI, Michigan City, IN) and analyzed using MCID-M4 software version 3.0 (Imaging Research, St Catharines, ON, Canada). The total number of platelets tethering to the matrix for every 1 \times 10⁷ platelets perfused was quantified, and the number of platelets exhibiting stable platelet adhesion (movement no greater than 1 cell diameter within 10 seconds) were quantified and expressed as a percentage of total adherent platelets. Following the experiment, the formed thrombi were fixed with 2% PFA for 15 minutes. The thrombi were imaged with a Zeiss confocal microscope Meta 510 (Zeiss, Oberkochen, Germany). The thrombus volumes per field were calculated in number of pixels with the Software Image J 1.33u (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

In vivo thrombosis models

Electrolytic model. A modified version of an electrolytic injury model¹⁹ was performed on 5 wild-type (C57Bl/6) and 5 FcR γ -chain-deficient (FcR γ ^{-/-}) mice.²⁰ Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbitone (30 mg/kg; Sigma-Aldrich) and body temperature maintained at 37°C throughout the experiment via a rectal temperature probe connected to a thermoblanket (Harvard Apparatus, Kent, United Kingdom). A tracheotomy was performed and mice were mechanically ventilated with room air supplemented with O₂ via a respiratory pump (MiniVent Type 845; Harvard Apparatus, Hugstetten, Germany). A Doppler flow probe (0.8-mm internal diameter [id]; selected for its smaller overall size compared with the flow probe used for the FcR γ model) attached to a directional pulsed Doppler flow meter (model 545C-3; Bioengineering,

Roy J. and Lucille A. Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City) was placed around both isolated carotid arteries to measure blood flow in units of kilohertz Doppler shift. The blood flow signal from the right carotid artery was used to calculate the heart rate (beats per minute), while a platinum hook electrode placed distal to the flow probe on the left carotid artery was used to induce vascular injury. Blood stasis was created by gently clamping the left artery, then vascular injury was induced by delivering an electrical current of 4 mA for 1.25 minutes using a constant current unit (Model CCU1; Grass, Quincy, MA) connected to a Grass SD9 stimulator. Blood flow was allowed to resume immediately after injury and the formation of occlusive thrombi in the carotid artery was indicated by a decrease in blood flow to zero. Changes in blood flow were monitored for 30 minutes and recorded for offline analysis (PowerLab Chart 4.2 software; ADInstruments, Sydney, Australia). The total amount of blood flowing through the injured artery following vascular injury was determined by calculating the area under the blood flow curve.

Folts-like stenosis-injury model. A modified version of the Folts model²¹ was performed on 9 wild-type (C57Bl/6) and 8 FcR γ ^{-/-} mice.²⁰ Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbitone (30 mg/kg; Sigma-Aldrich) and placed on a heating pad for the duration of the experiment. A flow probe (0.5-mm id; Transonic Systems, Ithaca NY), connected to a blood flowmeter (T206 Flowmeter; Transonic Systems), was gently placed around the isolated left carotid artery prior to placing a silk suture distal to the flow probe. The suture was tightened gradually until blood flow was decreased by 50% and vascular injury was created by crushing the carotid artery with artery forceps directly over the suture. The formation of occlusive thrombi in the carotid artery was indicated by a decrease in blood flow to zero. This model of arterial thrombosis characteristically produced occlusive thrombi within 2 to 3 minutes of vascular injury. We typically found that 1 set of injuries (5 crushes) would produce sufficient injury to induce occlusive thrombus formation. However, on some occasions several sets of repetitive injuries were required to induce occlusive thrombus formation, presumably due to the cushioning effects of the suture on the vessel wall. Further characterization of this model demonstrated that occlusive thrombus formation was unable to occur in nonstenosed carotid arteries or arteries stenosed by less than 70% (data not shown).

Laser-injury model. A laser-induced injury model was performed on 13 wild-type (C57Bl/6) and 14 FcR γ ^{-/-} mice aged between 3 and 5 weeks of age. Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg), and administered a fluorescent dye, DiOC₆ (5 μ L of a 100 μ M solution/g of body weight), to assist thrombus visualization. The mesenteric bowel was gently exteriorized and localized injury of the luminal surface of arterioles induced using a pulsed nitrogen dye laser (440 nm, Micropoint Laser System; Photonics Instruments, St Charles, IL²²). Severe and moderate injuries have been induced by 2 different laser intensity as previously described.²³ Thrombi were observed using an inverted Leica DMIRB microscope (Leica Microsystems). Images acquired by a Cooke SensiCam (Auburn Hills, MI) charge-coupled device (CCD) camera (2 \times 2 binning) and analyzed using Slidebook software (Intelligent Imaging Innovations, Denver, CO).

Histology

Carotid arteries were harvested and fixed with 4% paraformaldehyde for more than 48 hours prior to alcohol and xylene processing, then embedded in paraffin. Serial sections (5 μ m thick) were cut and stained using Carstairs stain^{24,25} to produce differential staining of platelets (gray-blue to navy), fibrin (bright red), collagen (bright blue), and red blood cells (yellow to orange). Images were visualized using an Olympus BH2-RFCA microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and a 20 \times /0.46 NA objective. Images were captured using an Olympus DP50-CU 5.0V/2.0A camera and Viewfinder Lite software version 1.0.

Tail bleeding times

Template bleeding time²¹ (1-mm deep \times 5-mm long) was performed on the tails of mice. Tail bleeding time was measured before (control) and 5 minutes after drug administration. The left jugular vein was exposed via

blunt dissection to allow for direct injection of drugs using a 30-gauge needle (bolus size approximately 50 μ L). An incision 5-mm long and 1-mm deep was made 1 cm from the tail tip using a scalpel blade (taped off 1 mm from the end). The edge of the incision was blotted every 30 seconds until blood flow had ceased. The second incision was made 5 mm distal to the first incision.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. Average SEM for carotid blood flow over time was calculated from repeated measures analysis of variance (ANOVA) using the pooled estimate of error from the residual mean square as (error mean square/number of animals) (0.5) after subtracting the sums of the squares for each time. This error bar is shown in Figure 2A. When comparing matched values within or between 2 treatment groups, paired or unpaired Student *t* tests were used, respectively. The statistical significance of differences between thrombus surface area means was evaluated using a nonparametric Mann-Whitney test and *P* values of less than .05 were considered to be significant. All tests were performed using Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

FcR γ /GPVI deficiency does not prevent occlusive thrombus formation in a “Folts-type” arterial thrombosis model

To investigate the importance of the GPVI/FcR γ -chain complex in promoting occlusive thrombus formation in stenosed-injured arteries, we examined FcR $\gamma^{-/-}$ mice in a modified “Folts-type” carotid artery thrombosis model.¹⁹ The Folts model has been extensively used in larger animals and involves repetitive crush injury to areas of arterial stenosis, resulting in platelet exposure to subendothelial thrombogenic components and high shear stress, 2 key factors promoting thrombus growth.²⁰ Development of occlusive thrombi in mice typically occurred within 2 to 3 minutes of vascular injury, and mechanical agitation of the vessel resulted in the embolisation of thrombi and restoration of normal blood flow. Constant formation and dislodgement of thrombi resulted in cyclic flow reductions (CFRs), a characteristic feature of the Folts model. Analysis of wild-type mice revealed that 89% (*n* = 9) developed continuous CFRs following vascular injury (Figure 1A). Histologic analysis of occluded arteries revealed that the thrombi were principally composed of platelets (Figure 1B) and administration of a mouse integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonist GPI562 (4 mg/kg intravenously) completely eliminated CFRs in all treated mice (*n* = 4, data not shown). Histologic analysis of carotid arteries from GPI562-treated mice confirmed complete absence of thrombi at the site of vessel injury (data not shown). Unexpectedly, vascular injury to the carotid artery in FcR $\gamma^{-/-}$ mice led to the formation of CFRs in 87% of mice (*n* = 8) (Figure 1C) and the rate and extent of vessel occlusion in FcR $\gamma^{-/-}$ mice was no different from matched wild-type controls (data not shown). Histologic analysis also confirmed that there was no difference in thrombus composition between the 2 groups (Figure 1B,D). These findings suggest that the GPVI/FcR γ -chain complex is not essential for arterial thrombotic occlusion following injury to stenosed arteries.

Blockade of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and P2Y₁₂, but not FcR γ deficiency, prevented occlusive arterial thrombus formation using an electrolytic injury model

Our findings with the “Folts-type” model contrasted with previous studies demonstrating a central role for GPVI in promoting arterial thrombus formation.⁴⁻⁷ These previous studies have used a variety

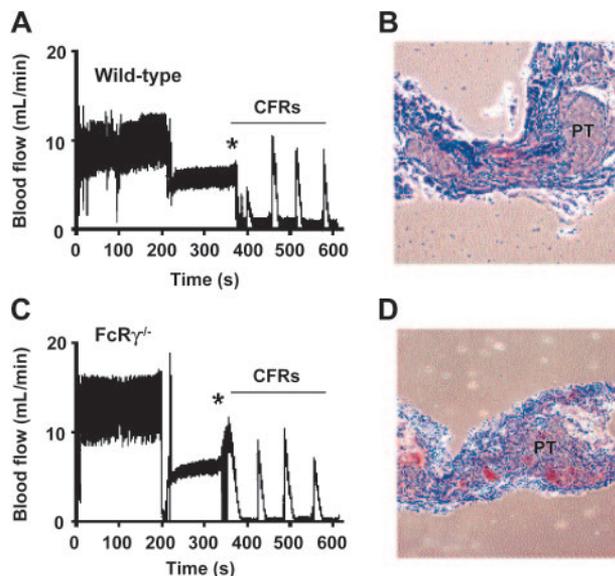
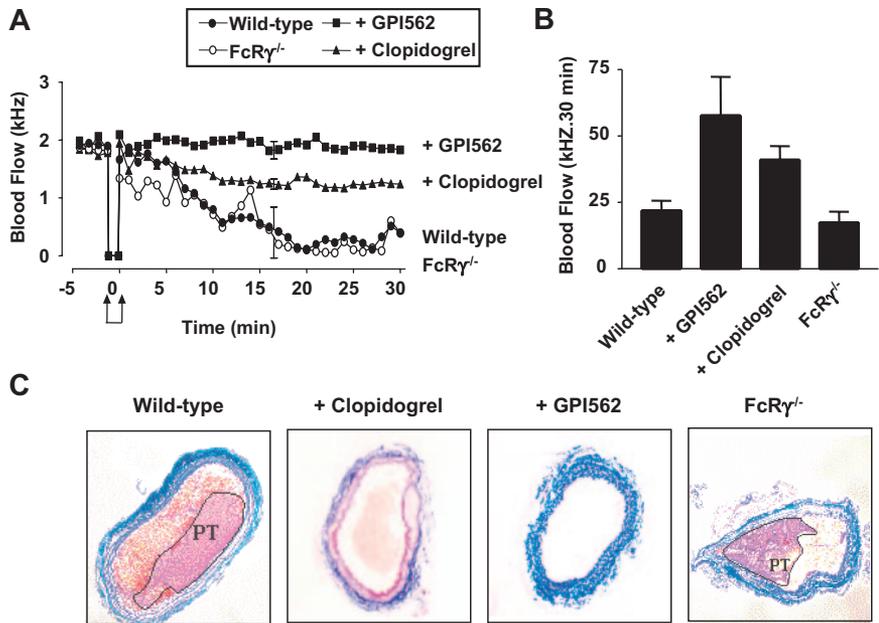


Figure 1. Effect of FcR γ deficiency on occlusive thrombus formation in a “Folts-type” arterial thrombosis model. (A,C) Repetitive crush injury to stenosed carotid arteries was used to induce occlusive thrombus formation in wild-type and FcR $\gamma^{-/-}$ mice as described in “Materials and methods.” Vascular injury (indicated by *) led to the formation of repetitive cyclic flow reductions (CFRs) in both the wild-type and FcR $\gamma^{-/-}$ mice. The blood flow traces are from single-mouse experiments representative of 9 and 8 independent wild-type and FcR $\gamma^{-/-}$ experiments, respectively. (B,D) Histologic analysis of longitudinally sectioned carotid arteries from wild-type mice and FcR $\gamma^{-/-}$ mice demonstrating the presence of vaso-occlusive platelet-rich thrombi (PT) in the arterial lumen following the development of CFRs.

of experimental mouse thrombosis models, none of which involved fixed arterial stenosis and deep arterial injury, raising the possibility that our findings were specific to the “Folts-type” model. To investigate this possibility we used a second mouse carotid artery thrombosis model that involved electrolytic injury to nonstenosed carotid arteries.¹⁹ Electrolytic injury leads to full thickness vascular injury, triggering the formation of platelet-rich thrombi (confirmed by histology) that ultimately occlude the artery within 15 to 20 minutes. The thrombi that formed in this model were typically unstable and prone to spontaneous embolization, leading to variable periods of arterial occlusion. The importance of platelets in this model was confirmed by the ability of the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ inhibitor, GPI562 (4 mg/kg intravenously), to preserve normal carotid artery blood flow following electrical injury (Figure 2A-B). Analysis of FcR $\gamma^{-/-}$ mice in this model revealed no difference in the rate of occlusive thrombus formation than that observed in matched FcR $\gamma^{+/+}$ mice (Figure 2A-B). Analysis of total carotid artery blood flow over a 30-minute period following electrical injury revealed no significant differences between wild-type and FcR $\gamma^{-/-}$ mice (Figure 2B; 22.0 ± 3.6 kHz and 19.9 ± 4.8 kHz, *n* = 6). Furthermore, examination of occluded arteries from FcR $\gamma^{-/-}$ mice demonstrated no difference in thrombus composition compared with wild-type matched controls (Figure 2C). In contrast, pretreating mice with the P2Y₁₂ receptor antagonist clopidogrel (50 mg/kg) maintained carotid blood flow throughout the 30-minute observation period (Figure 2A-B). Histologic analysis revealed that clopidogrel prevented formation of occlusive thrombi, although less effectively as the $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonist (Figure 2C). These findings are consistent with the results from the “Folts-type” model, demonstrating a dispensable role for the GPVI/FcR γ -chain complex in arterial thrombogenesis. Moreover,

Figure 2. Effect of FcR γ deficiency and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and P2Y $_{12}$ inhibition on occlusive arterial thrombus formation following electrolytic injury. (A) Electrolytic injury was induced in the carotid artery of FcR γ -deficient mice (FcR γ ^{-/-}, n = 5) or wild-type mice treated with vehicle alone (wild-type, n = 5), GPI562 (5 mg/kg) (+ GPI562, n = 5) or clopidogrel (50 mg/kg) (+ clopidogrel, n = 4) as described in "Materials and methods." Carotid artery blood flow was monitored over a 30-minute time period following arterial injury (indicated by arrows). Error bars are average SEM from repeated measures ANOVA. (B) Total blood flow over a 30-minute period. Error bars are \pm 1 SEM. (C) Histologic analysis of carotid arteries from FcR γ ^{-/-} or wild-type mice treated with vehicle alone, GPI562, or clopidogrel. Tissue samples were stained with Castair stain in which platelets stain purple, fibrin stain red, red blood cells stain yellow, and collagen stains blue. Platelet-rich thrombi (PT) are highlighted in wild-type control and FcR γ ^{-/-} mice.



they suggest that the defect in thrombus formation in GPVI/FcR γ -chain-deficient platelets is significantly less than that observed with integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and P2Y $_{12}$ receptor antagonists.

FcR γ /GPVI is involved in thrombosis using a laser-injury model

A limitation of the "Folts-type" and electrolytic models was the inability to directly visualize the kinetics of thrombus growth. It is possible that significant differences in the initial rate of thrombus formation, due to defects in the activation of primary adherent platelets, would not be detected by gross alterations in blood flow. To investigate in more detail the kinetics of thrombus formation in wild-type and FcR γ ^{-/-} mice we used intravital microscopy to visualize thrombus development in mouse mesenteric arterioles following laser-induced vascular injury.²² As demonstrated in Figure 3A-B, severe vessel injury resulted in the formation of stable, occlusive thrombi (maximum mean surface area of 12 007.5

μm^2) over a 90-second period in wild-type mice. Pretreating mice with the $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonist integrilin (10 mg/kg intravenously) or clopidogrel (50 mg/kg) prevented vascular occlusion in this model, confirming the central role of platelets in this process.²² Unexpectedly, laser injury of FcR γ ^{-/-} arterioles resulted in a similar rate and extent of thrombus formation as the wild-type controls (Figure 3A-B: FcR γ ^{-/-}; mean surface area of 12 220.8 μm^2 , $P = .402$), and the thrombi that formed under these experimental conditions remained stable over a 3-minute observation period. To investigate whether the GPVI/FcR γ -chain complex played a more important role in promoting formation in nonocclusive thrombi, we examined the kinetics of thrombus development under conditions of less severe vascular injury. As demonstrated in Figure 3C-D, weaker laser intensities induced arteriole injuries, resulting in the formation of transient nonocclusive arterial thrombi. These thrombi were principally composed of platelets, as they were abolished by

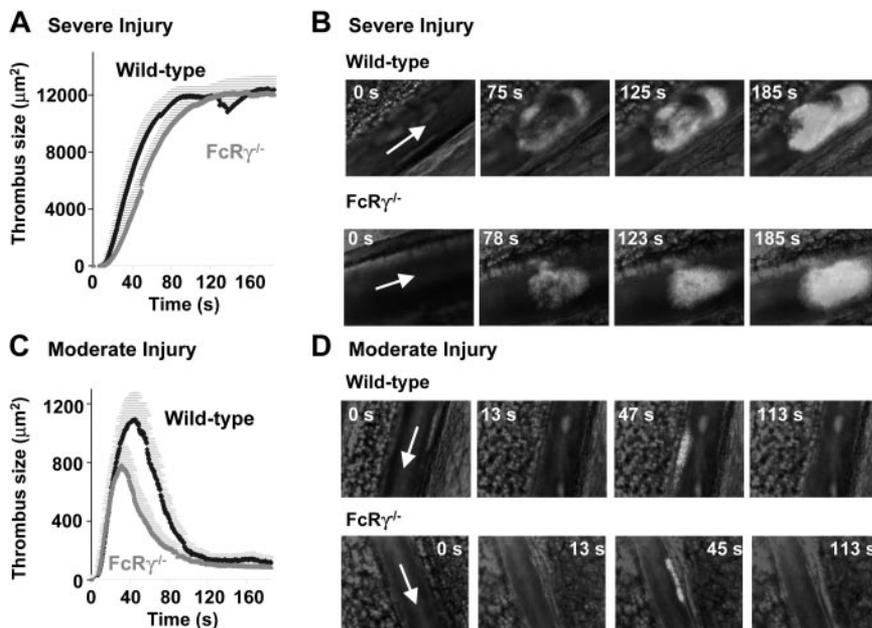


Figure 3. Effect of FcR γ deficiency on thrombus formation in a laser-induced arterial thrombosis model. Severe (A-B) or moderate (C-D) laser-induced lesions were generated in the mesenteric arteries of wild-type and FcR γ ^{-/-} mice and the surface area of developing thrombi assessed as described previously.²² (A,C) Traces represent the mean surface area (\pm SEM) of the thrombi developing over 150 seconds (WT: n = 12 vessels in 8 mice; FcR γ ^{-/-}: n = 12 vessels in 7 mice). Analysis of mean surface area of thrombi formed in severely injured vessels indicate no significant difference in thrombus formation between wild-type and FcR γ ^{-/-} mice ($P > .05$). In contrast, following moderate injury there was a 30% reduction in the size of thrombi formed in FcR γ ^{-/-} mice relative to wild-type mice (WT: n = 19 vessels in 7 mice; FcR γ ^{-/-}: n = 29 vessels in 9 mice). Time sequence images of platelet thrombi forming in wild-type and FcR γ ^{-/-} mice subjected to severe (B) or moderate (D) injury. Arrow indicates blood flow direction.

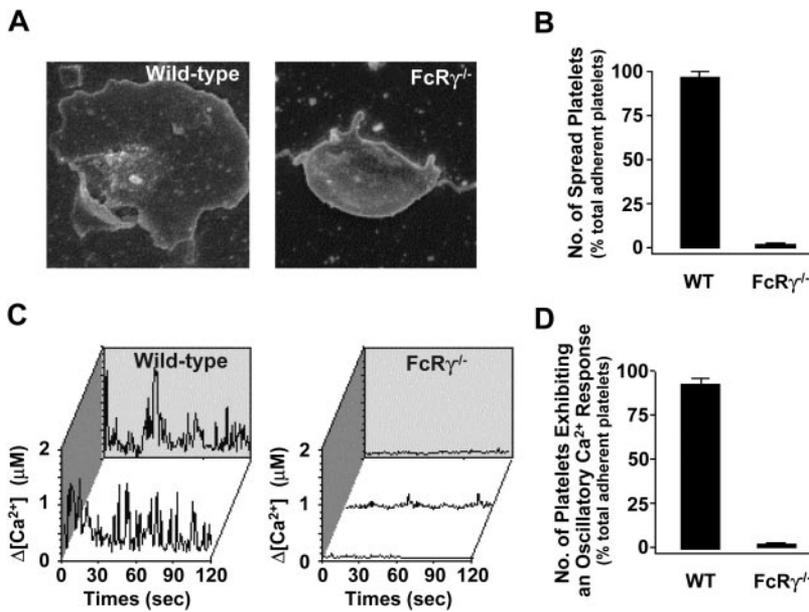


Figure 4. Spreading and calcium flux of FcR $\gamma^{-/-}$ mouse platelets on a collagen matrix. (A) Representative SEM images of collagen-adherent platelets from wild-type and FcR $\gamma^{-/-}$ mice. (B) The percentage of adherent platelets (mean \pm SEM) that spread on the collagen matrix was quantitated as described in "Materials and methods." (C) Calcium dye-loaded washed platelets were applied to a type 1 fibrillar collagen matrix under static conditions for 30 minutes at 37°C. Individual wild-type platelets underwent an oscillatory Ca²⁺ response following adhesion to the collagen matrix, whereas FcR $\gamma^{-/-}$ platelets did not exhibit an oscillatory Ca²⁺ response. Calcium profiles are from representative single platelets obtained from wild-type or FcR $\gamma^{-/-}$ mice. (D) The percentage of adherent platelets (mean \pm SEM) exhibiting oscillatory calcium flux was quantitated as described in "Materials and methods."

pretreating mice with the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonist or with clopidogrel.²² Comparative analysis of wild-type and FcR $\gamma^{-/-}$ mice revealed a 28.7% reduction in the size of thrombi formed in FcR $\gamma^{-/-}$ mice (maximum thrombus size of 1096 μm^2 and 782 μm^2 for wild-type and FcR $\gamma^{-/-}$ mice, respectively, nonsignificant $P = .578$). Overall, our studies using 3 distinct thrombosis models do not support an essential role for the GPVI/FcR γ -chain complex in arterial thrombogenesis.

FcR γ /GPVI deficiency prevents platelet activation under flow and static conditions

Our results were unexpected given the known importance of collagen fibers in promoting arterial thrombosis and the central role played by the GPVI/FcR γ -chain complex in collagen activation of platelets. To investigate the possibility that our FcR $\gamma^{-/-}$ mice may have retained some residual responsiveness to collagen, potentially through integrin $\alpha_2\beta_1$, we performed a series of static and flow-based adhesion assays on a type I fibrillar collagen matrix. In contrast to wild-type platelets, FcR γ -deficient platelets were un-

able to undergo shape change or spread on the collagen substrate under static conditions (Figure 4A-B). Moreover, these platelets did not exhibit a detectable cytosolic calcium response (Figure 4C-D). Similarly, under flow conditions, FcR $\gamma^{-/-}$ platelets in anticoagulated whole blood were unable to form thrombi under a variety of different flow conditions (500-1800 s^{-1}) (Figure 5A). Notably, these platelets tethered normally to the collagen surface and underwent surface translocation; however, the major defect in these platelets was their inability to form sustained adhesion contacts (Figure 5A-B). These studies confirm previous findings that the platelets from FcR $\gamma^{-/-}$ mice are unable to become activated on a collagen substrate, independent of the addition of exogenous stimuli.^{4,26}

Thrombin generation leads to thrombus formation in FcR $\gamma^{-/-}$ blood after perfusion over a collagen surface

An important activator of platelets is the serine protease thrombin.²⁷ Thrombin generation *in vivo* is principally dependent on the surface expression of tissue factor (TF); however, *in vitro*, a large

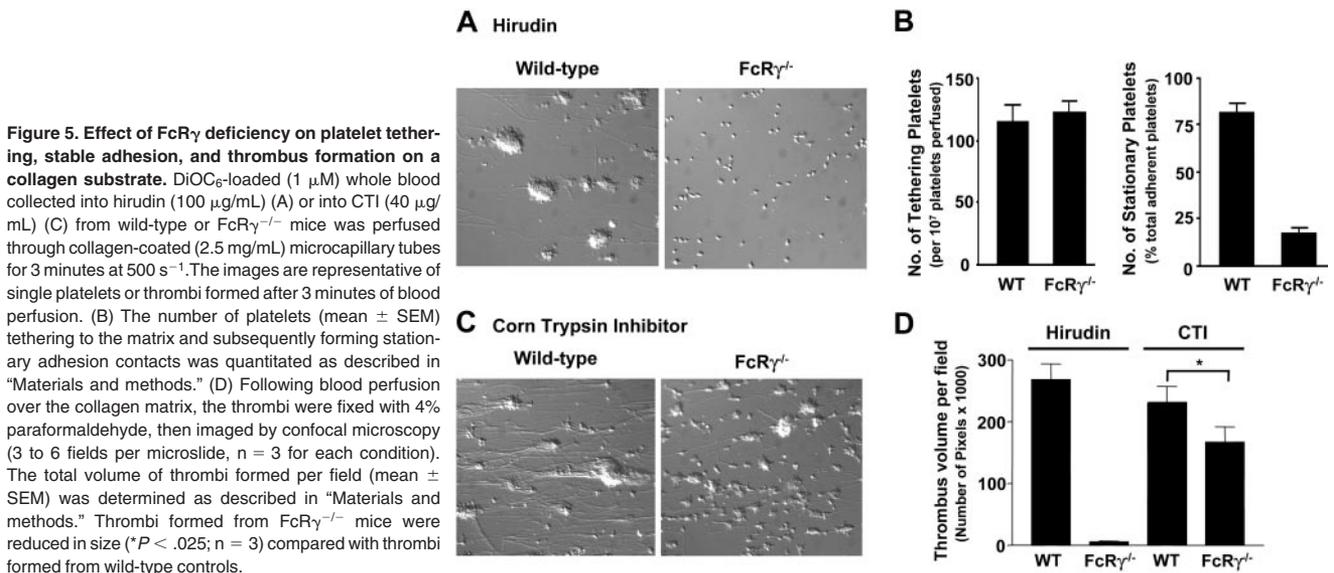


Figure 5. Effect of FcR γ deficiency on platelet tethering, stable adhesion, and thrombus formation on a collagen substrate. DiOC₆-loaded (1 μM) whole blood collected into hirudin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A) or into CTI (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (C) from wild-type or FcR $\gamma^{-/-}$ mice was perfused through collagen-coated (2.5 mg/mL) microcapillary tubes for 3 minutes at 500 s^{-1} . The images are representative of single platelets or thrombi formed after 3 minutes of blood perfusion. (B) The number of platelets (mean \pm SEM) tethering to the matrix and subsequently forming stationary adhesion contacts was quantitated as described in "Materials and methods." (D) Following blood perfusion over the collagen matrix, the thrombi were fixed with 4% paraformaldehyde, then imaged by confocal microscopy (3 to 6 fields per microslide, $n = 3$ for each condition). The total volume of thrombi formed per field (mean \pm SEM) was determined as described in "Materials and methods." Thrombi formed from FcR $\gamma^{-/-}$ mice were reduced in size ($*P < .025$; $n = 3$) compared with thrombi formed from wild-type controls.

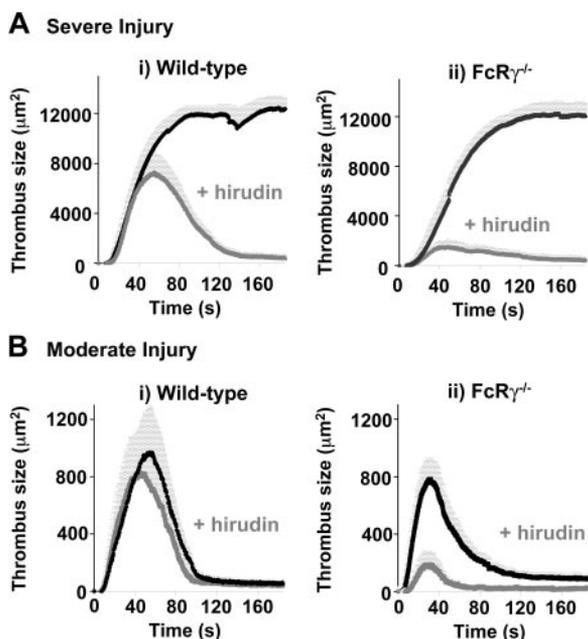


Figure 6. Effect of hirudin on laser-induced thrombus formation in wild-type and FcR γ -deficient mice. Severe (A) or moderate (B) laser-induced lesions were generated in the mesenteric arteries of wild-type (i) and FcR γ ^{-/-} (ii) mice treated with vehicle alone or hirudin (10 mg/kg subcutaneously). Traces represent the mean surface area (\pm SEM) of thrombi developing over 150 seconds (severe injury: (i) WT, n = 12 vessels in 8 mice; WT + Hir, n = 5 vessels in 3 mice; (ii) FcR γ ^{-/-}, n = 12 vessels in 7 mice; FcR γ ^{-/-} + Hir, n = 5 vessels in 4 mice; moderate injury (i) WT, n = 19 vessels in 7 mice; WT + Hir, n = 11 vessels in 4 mice; (ii) FcR γ ^{-/-}, n = 29 vessels in 9 mice; FcR γ ^{-/-} + Hir, n = 7 vessels in 4 mice).

proportion of thrombin generation is initiated by the contact phase of blood coagulation, principally involving Factor XII. This thrombin is rapidly neutralized by the anticoagulants used in our blood collection process, precluding analysis of the importance of this protease in regulating platelet thrombus growth *in vitro*. To investigate whether thrombin can overcome the thrombosis defect associated with GPVI/FcR γ -chain deficiency, we established an *in vitro* flow-based thrombosis assay that enables concomitant platelet deposition and thrombin generation on immobilized collagen matrices. This assay was dependent on collecting whole blood in the presence of the FXII inhibitor, corn trypsin inhibitor (CTI), which markedly slows thrombin generation *in vitro* ("Materials and methods"). In preliminary studies we confirmed that CTI inhibited fibrin formation *ex vivo* for up to 10 to 15 minutes following blood collection (data not shown). However, thrombin generation and fibrin formation were readily apparent following perfusion of wild-type mouse whole blood over a type I fibrillar collagen matrix. Fibrin formation was apparent within the first 60 to 90 seconds of perfusion and progressive build-up of fibrin after approximately 160 seconds of perfusion, ultimately leading to microcapillary occlusion. The initiator of blood coagulation under these conditions was not identified but presumably reflects the presence of microvesicle-derived tissue factor in whole blood or the presence of a FXIa-like activity on the surface of activated platelets. As demonstrated in Figure 5C, both wild-type and FcR γ ^{-/-} platelets were able to form thrombi when CTI-treated whole blood was perfused over a type I collagen matrix at 500 s⁻¹. The individual thrombi formed with FcR γ ^{-/-} blood were typically smaller than wild-type thrombi, although analysis of total thrombus volume on the matrix surface revealed a 25% difference between FcR γ ^{-/-} and wild-type mice (Figure 4D). These studies demonstrate that thrombin generation on an immobilized

thrombogenic substrate is sufficient to restore thrombus development in FcR γ ^{-/-} platelets.

Hirudin further reduced thrombus formation in FcR γ -deficient mice following laser-injury

To investigate whether thrombin generation was responsible for the near-normal thrombotic response of FcR γ ^{-/-} mice *in vivo*, we examined the effects of high concentrations of the thrombin inhibitor hirudin (10 mg/kg) on laser-induced thrombus formation in mesenteric arterioles. Consistent with previous findings, hirudin had no effect on initial thrombus formation following severe vascular injury; however, thrombi formed under these conditions were invariably unstable, leading to progressive thrombus dissolution from the point of maximum growth (Figure 6Ai). In contrast, initial thrombus formation was markedly impaired in hirudin-treated FcR γ ^{-/-} mice, with 10.9% maximal thrombus size of that observed in untreated mice (Figure 6Aii). To investigate whether thrombin was also contributing to the thrombotic response of FcR γ ^{-/-} mice following moderate vascular injury, the effects of hirudin on platelet thrombus growth was examined in wild-type and FcR γ ^{-/-} mice. Distinct from the severe vascular injury model, hirudin had minimal effect on thrombus kinetics in wild-type mice following milder vascular injury (Figure 6Bi). In contrast, hirudin had a marked effect on thrombus development in FcR γ ^{-/-} mice under the same experimental conditions, with 21% maximal thrombus size of that observed in untreated mice (Figure 6Bii). Taken together, these studies define a major role for thrombin in maintaining a robust thrombotic response in mice lacking the GPVI/FcR γ -chain.

Hirudin prolongs FcR γ -deficient mouse tail bleeding time

To examine whether these findings are also relevant to hemostasis, we examined the effect of thrombin inhibition on the tail bleeding time of wild-type and FcR γ ^{-/-} mice. As demonstrated in Figure 7, there was no significant prolongation in tail bleeding time in FcR γ ^{-/-} mice relative to wild-type matched controls, whereas

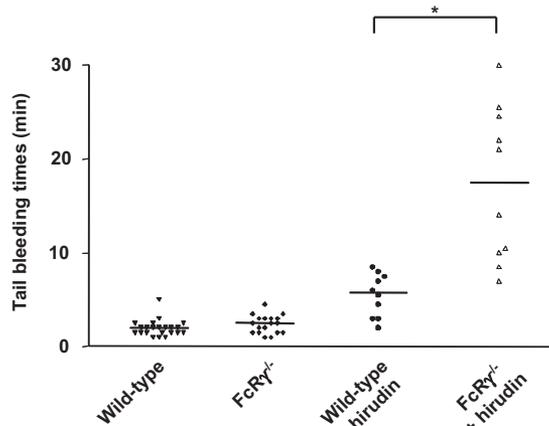


Figure 7. Effect of hirudin on the tail bleeding time of wild-type and FcR γ -deficient mice. Tail bleeding time was measured before and 5 minutes after hirudin (10 mg/kg) administration in FcR γ ^{-/-} mice (2.5 ± 0.2 minutes before and 17.3 ± 2.6 minutes after, n = 10; $P < .001$, paired Student *t* test) or wild-type mice (2.0 ± 0.2 minutes before and 5.5 ± 0.7 minutes after, n = 10; $P = .001$, paired Student *t* test), as described in "Materials and methods." Baseline tail bleeding times of a further 12 wild-type mice (total, n = 22) and 8 FcR γ ^{-/-} mice (total, n = 18) were examined and demonstrated not to be significantly different from each other ($P > .05$). Horizontal bars represent the mean bleeding time values for each group of animals. * $P < .05$, Student *t* test.

hirudin prolonged the bleeding time approximately 3-fold in wild-type mice. However, in FcR $\gamma^{-/-}$ mice, hirudin prolonged the bleeding time more than 7-fold. These findings are consistent with our thrombosis studies and confirm an important role for thrombin in maintaining a near-normal hemostatic response following loss of the GPVI/FcR γ -chain complex.

Discussion

The studies reported here provide new insight into the role of the GPVI/FcR γ receptor in arterial thrombogenesis. Using 3 distinct models of arterial thrombosis we have demonstrated that deficiency of GPVI/FcR γ leads to a relatively modest defect in arterial thrombosis compared to $\alpha_{IIb}\beta_3$ or P2Y $_{12}$ receptor blockade. In fact, the only experimental condition in which FcR $\gamma^{-/-}$ mice exhibited a marked defect in hemostasis and thrombosis was when these mice were treated with thrombin inhibitors. These *in vivo* studies have demonstrated a functional overlap between thrombin and GPVI/FcR γ in which reduction in the platelet activating properties of one mechanism can be partially compensated by the other. Overall these studies suggest a greater functional redundancy for GPVI in arterial thrombogenesis than previously recognized. Furthermore, they provide a mechanism to partially explain the varied thrombotic response reported in GPVI-deficient mice. Finally, these studies raise the interesting possibility that the full antithrombotic potential of GPVI inhibitors *in vivo* may require concurrent administration of anticoagulant agents.

Our initial findings for a near-normal arterial thrombotic response in FcR γ -null mice was unexpected in light of previous findings demonstrating a crucial role for the GPVI/FcR γ receptor complex in arterial thrombogenesis.^{4,7} These differences are unlikely to be simply explained by differences in the degree of GPVI/FcR γ receptor inhibition in different studies, as a similar defect in collagen responsiveness has been demonstrated in mice treated with GPVI receptor antagonists, with antibodies that down-regulate GPVI surface expression, and in mice with targeted deletion of the FcR γ -chain. A more likely explanation is that the importance of GPVI in thrombosis is influenced by the nature of the thrombogenic injury operating in different experimental models. For example, mice with a targeted deletion of the *Gpvi* gene formed occlusive thrombi in FeCl $_3$ -injured carotid arteries, with the major defect in thrombosis related to thrombus stability, rather than initial thrombus growth (Z. M. Ruggeri, personal oral communication, September 2005). Similarly, studies from the Furie laboratory recently published in abstract form²⁸ have demonstrated that the defect in thrombus formation in FcR γ -null mice is critically dependent on the type of arterial lesion. Similar to our findings, normal occlusion was observed following laser injury of mesenteric arterioles; however, following FeCl $_3$ injury, a major thrombosis defect was observed. The reasons for these differences is currently under investigation and may relate in part to the nature of the thrombogenic elements exposed following different forms of arterial injury. In this context it is of interest that the ratio of tissue factor to platelets present in the laser injury model was 5-fold greater than after FeCl $_3$ treatment,²⁸ suggesting a more prominent role for thrombin generation in the former model. Consistent with this, we have provided 3 independent lines of evidence demonstrating that thrombin is a key variable influencing the thrombotic response in FcR γ -null mice. First, in our *in vitro* studies, complete inhibition of thrombin abolished thrombus formation on a collagen substrate, whereas thrombin generation partially restored thrombus

growth. Second, we have demonstrated a direct relationship between the extent of laser injury and the thrombin-dependency for thrombus growth,²² such that with milder forms of injury there is progressive decrease in the importance of thrombin for thrombosis formation and a concomitant greater role for GPVI. Finally, inhibition of thrombin *in vivo* produced a profound defect in thrombus growth in FcR γ -null mice. Of note, following moderate vessel injury, deficiency of GPVI/FcR γ receptor or inhibition of thrombin alone produced only minor defect in the kinetics of thrombus formation, whereas concurrent thrombin inhibition and GPVI/FcR γ receptor deficiency almost completely eliminated thrombus formation altogether. These latter findings provide an example of the potential redundant platelet-activating mechanisms *in vivo* and suggest caution when attempting to exclude the contribution of a specific activating stimulus to the thrombotic process.

Based on findings from *in vitro* perfusion assays and *in vivo* thrombosis models, GPVI has recently been proposed to play a potentially important role in promoting the initial recruitment of platelets from flowing blood onto thrombogenic surfaces.^{4,6} However, in our flow assays we have observed no significant defect in the ability of FcR $\gamma^{-/-}$ platelets to tether to immobilized collagen, but rather a primary defect in the ability of these platelets to form firm adhesion contacts. This defect is consistent with the role of the GPVI/FcR γ receptor in promoting platelet activation, as a necessary step for up-regulation of the affinity state of surface integrins necessary for firm adhesion. The demonstration that the primary defect in GPVI/FcR γ platelets is linked to defective stable adhesion, rather than reduced tethering is potentially important, as it provides an explanation for the ability of thrombin to induce platelet activation and thrombus growth. Notably, such compensatory mechanisms are unable to overcome the adhesive defects associated with GPIb and $\alpha_{IIb}\beta_3$ deficiency, providing further evidence that the major defect in GPVI/FcR γ -null platelets relates to their failure to promote platelet activation rather than a fundamental defect in adhesive capacity.

Our studies highlight the importance of validating potential antithrombotic targets in a broad range of experimental animal models and for the need for detailed characterization of these models using well-defined antithrombotic approaches. Two of the thrombosis models developed in this study were based on models that have been extensively investigated in larger animals. The "Folts-type" stenosis-injury model was originally developed in the dog,^{29,30} but has been adapted for use in pigs,³¹ monkeys,^{32,33} and rabbits,³⁴ and is considered one of the standard models to assess the antithrombotic potential of antiplatelet agents. This model has not been widely used in mice, presumably due to the technical challenges associated with forming reproducible stenoses and injury in such small vessels. However, an advantage of this model is that thrombus formation represents the combined effects of deep-vessel injury and high-shear stress, thereby mimicking 2 of the key elements relevant to thrombus formation in diseased atherosclerotic human arteries. Similarly, the electrolytic model used in this study has also been used extensively in larger animals,³⁵⁻³⁷ and is generally considered to represent a highly reproducible and reliable model for analysis of acute thrombus formation in larger arteries. The laser injury model in the microcirculation of mice is an increasingly popular method to analyze thrombus formation *in vivo* due to the ability to cause precise, graded, and localized vascular injury and also because it enables real-time monitoring of the thrombotic process. However, there is increasing recognition that interlaboratory variability with this

model may be considerable, necessitating the need for more detailed characterization of such models before firm conclusions can be drawn on the likely importance of individual platelet components to thrombus formation.

Finally, the results presented here have potentially important implications for GPVI as an antithrombotic target. The enthusiasm for GPVI as a thrombosis therapeutic target has stemmed from a number of factors, including the recognition that collagens represent an important thrombogenic element of atherosclerotic lesions, the demonstration that GPVI antagonists produce a potent antithrombotic effect *in vivo*, and importantly, that mice and humans with GPVI deficiency have a relatively mild bleeding tendency. These latter observations suggest that GPVI antagonists may have a considerably wider therapeutic window than conventional antiplatelet therapies. However, the findings presented here begin to

question this hypothesis, as we have demonstrated that the only experimental conditions leading to a major thrombosis defect (ie, concurrent thrombin inhibition in FcR $\gamma^{-/-}$ mice) also resulted in a significantly prolonged bleeding time. It remains to be established whether lesser degrees of thrombin inhibition in FcR $\gamma^{-/-}$ mice will preserve normal hemostasis while maintaining an antithrombotic effect. Nonetheless, our studies raise the possibility that inhibition of GPVI *per se* may not afford the same level of antithrombotic protection as P2Y₁₂ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ receptor antagonists.

Acknowledgment

We would like to thank Dr Christian Gachet for his constant support of the project and fruitful discussions.

References

- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8:1227-1234.
- Rekhter MD. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much or not enough. *Card Res*. 1999;41:376-381.
- McCullagh KG, Duance VC, Bishop KA. The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J Pathol*. 1980;130:45-54.
- Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, et al. Glycoprotein VI but not $\alpha_2\beta_1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J*. 2001;20:2120-2130.
- Massberg S, Gawaz M, Gruner S, et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall *in vivo*. *J Exp Med*. 2003;197:41-49.
- Massberg S, Konrad I, Bultmann A, et al. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall *in vivo*. *FASEB J*. 2004;18:397-399.
- Gruner S, Prostedna M, Koch M, et al. Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood*. 2005;105:1492-1499.
- Arai M, Yamamoto N, Moroi M, Akamatsu N, Fukutake K, Tanoue K. Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br J Haematol*. 1995;89:124-130.
- Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102:449-461.
- Kato K, Kanaji T, Russell S, et al. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood*. 2003;102:1701-1707.
- Sarratt KL, Chen H, Zutter MM, et al. GPVI and $\alpha_2\beta_1$ play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood*. 2005;106:1268-1277.
- Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, et al. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett*. 1997;413:255-259.
- Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, et al. A novel association of Fc receptor-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem*. 1997;272:23528-23531.
- Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, et al. Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain. *J Biol Chem*. 2000;275:23998-24002.
- Park SY, Ueda S, Ohno H, et al. Resistance of Fc receptor-deficient mice to fatal glomerulonephritis. *J Clin Invest*. 1998;102:1229-1238.
- Nesbitt WS, Kulkarni S, Giuliano S, et al. Distinct glycoprotein Ib/IX and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. *J Biol Chem*. 2002;277:2965-2972.
- Yap CL, Anderson KE, Hughan SC, et al. Essential role for phosphoinositide 3-kinase in shear-dependent signaling between platelet glycoprotein Ib/IX and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Blood*. 2002;99:151-158.
- Hladovec J. Experimental arterial thrombosis in rats with continuous registration. *Thromb Diath Haemorrh*. 1971;26:407-410.
- Sturgeon SA, Jones C, Angus JA, et al. Adaptation of the Folts and electrolytic methods of arterial thrombosis for the study of anti-thrombotic molecules in small animals. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2006;53:20-29.
- Folts JD, Crowell EB, Rowe GG. Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation*. 1976;54:365-370.
- Falati SP, Gross, Merrill-Skoloff G, et al. Real-time *in vivo* imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med*. 2002;8:1175-1181.
- Nonne C, Lenain N, Hechler B, et al. Importance of platelet phospholipase C γ_2 signaling in arterial thrombosis as a function of lesion severity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1293-1298.
- Wright CE, Angus JA, Komer PI. Structural factors increase blood pressure through the interaction of resistance vessel geometry with neurohumoral and local factors: estimates in rabbits with renal cellophane-wrap hypertension with intact effectors and during neurohumoral blockade. *J Hypertens*. 2002;20:471-483.
- Guarini S. A highly reproducible model of arterial thrombosis in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1996;35:101-105.
- Dejana E, Villa S, de Gaetano G. Bleeding time in rats: a comparison of different experimental conditions. *Thromb Haemost*. 1982;48:108-111.
- Poole A, Gibbins JM, Turner M, et al. The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J*. 1997;16:2333-2341.
- Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407:258-264.
- Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B, Furie BC. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation *in vivo*. *Blood*. 2006;107:3902-3906.
- Folts JD, Bonebrake FC. The effects of cigarette smoke and nicotine on platelet thrombus formation in stenosed dog coronary arteries: inhibition with phentolamine. *Circulation*. 1982;65:465-470.
- Roux SP, Sakariassen KS, Turitto VT, et al. Effect of aspirin and epinephrine on experimentally induced thrombogenesis in dogs. A parallelism between *in vivo* and *ex vivo* thrombosis models. *Arterioscler Thromb*. 1991;11:1182-1191.
- Samama CM, Bonnin P, Bonneau M, et al. Comparative arterial antithrombotic activity of clopidogrel and acetylsalicylic acid in the pig. *Thromb Haemost*. 1992;68:500-505.
- Coller BS, Folts JD, Scudder LE, et al. Antithrombotic effect of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein Ib/IIIa receptor in an experimental animal model. *Blood*. 1986;68:783-786.
- Coller BS, Folts JD, Smith SR, et al. Abolition of *in vivo* platelet thrombus formation in primates with monoclonal antibodies to the platelet GPIIb/IIIa receptor: correlation with bleeding time, platelet aggregation, and blockade of GPIIb/IIIa receptors. *Circulation*. 1989;80:1766-1774.
- Golino P, Cappelli-Bigazzi M, Ambrosio G, et al. Endothelium-derived relaxing factor modulates platelet aggregation in an *in vivo* model of recurrent platelet activation. *Circ Res*. 1992;71:1447-1456.
- Markland FS, Friedrichs GS, Pewitt SR, et al. Thrombolytic effects of recombinant fibrinolytic or APSAC in a canine model of carotid artery thrombosis. *Circulation*. 1994;90:2448-2456.
- Markland FS, Friedrichs GS, Pewitt SR, et al. Thrombolytic effects of recombinant fibrinolytic or APSAC in a canine model of carotid artery thrombosis. *Circulation*. 1994;90:2448-2456.
- Thiagarajan P, Benedict CR. Inhibition of arterial thrombosis by recombinant annexin V in a rabbit carotid artery injury model. *Circulation*. 1997;96:2339-2347.

3.2.2. Conclusion

Cette étude a permis de réévaluer l'importance du récepteur GPVI/ γ FcR dans la thrombose artérielle. L'utilisation de modèles utilisant trois types de lésions a mis en évidence un rôle antithrombotique relativement modeste de la GPVI par rapport aux effets obtenus en bloquant les récepteurs P2Y₁₂ ou $\alpha_{IIb}\beta_3$ et en absence du complexe GPIb-V-IX.

Dans les modèles de Folts et électrique appliqués à la carotide, les souris γ FcR^{-/-} présentent une thrombose occlusive comparable aux souris contrôles. Dans le modèle de lésion superficielle laser, qui est peu dépendant de la génération de thrombine, la thrombose est légèrement diminuée chez les souris γ FcR^{-/-} tandis que dans la lésion sévère la thrombose n'est pas affectée. Les expériences de perfusion de sang en conditions de flux sur une matrice de collagène permettent d'expliquer ces différents comportements. La perfusion de sang de souris γ FcR^{-/-} ne forme pas de thrombi importants en absence de thrombine. Par contre, dans ces mêmes conditions mais en présence de thrombine, la formation des thrombi n'est quasiment pas affectée par le déficit en GPVI.

Les résultats obtenus avec les souris γ FcR^{-/-} dans le modèle laser sont similaires à ceux obtenus précédemment avec les souris PLC γ 2^{-/-}, une enzyme indispensable à la signalisation de GPVI, où on observe également une diminution de la taille du thrombus en lésion superficielle mais pas en lésion sévère (**Nonne et al. 2005**). Tout comme nous, Dubois et al. observent un temps d'occlusion normal d'artérioles du crémaster de souris γ FcR^{-/-} dans un modèle de thrombose au laser qui génère de la thrombine (**Dubois et al. 2006**). Au contraire, dans un modèle de lésion par le FeCl₃ d'artérioles mésentériques ou du crémaster, la thrombose est diminuée pour ces souris. Nos données sont également en accord avec les résultats obtenus dans un modèle de lésion au FeCl₃ de la carotide de souris déficientes en GPVI où le défaut majeur observé concerne plus l'instabilité du thrombus que sa croissance (**Konstantinides et al. 2006**). Par contre, ces résultats divergent des études précédentes qui montraient un rôle clef du récepteur GPVI dans la thrombose artérielle et dans la stabilité du thrombus (**Massberg et al. 2003; Massberg et al. 2004b; Munnix et al. 2005**). Ces différences pourraient s'expliquer par la nature de la surface exposée dans les différents modèles de thrombose utilisés et par le type de vaisseau lésé.

Le degré de dépendance à la thrombine du modèle semble donc conditionner le degré d'implication de la voie GPVI dans la thrombose. Cette étude remet en cause un rôle

important du récepteur GPVI dans des conditions où la thrombine est générée et par conséquent son intérêt comme cible antithrombotique. Bien que le ciblage de ce récepteur à lui seul ne confère pas une protection suffisante, il pourrait avoir une utilité comme traitement préventif ou d'appoint dans le cadre d'une polythérapie antiplaquettaire.

4. Rôle des récepteurs à l'ADP P2Y₁ et P2Y₁₂ dans la thrombose

PUBLICATION 6

MRS2500, a potent, selective and stable antagonist of the P2Y₁ receptor, with strong antithrombotic activity in mice. J Pharmacol Exp Ther. 2006 Feb;316(2):556-63.

Hechler B, Nonne C, Roh EJ, Cattaneo M, Cazenave JP, Lanza F, Jacobson K, Gachet C.

4.1. Introduction

L'ADP et l'ATP jouent un rôle central dans l'hémostase et la thrombose. Ils exercent leurs effets via des récepteurs purinergiques P2 qui comprennent sur les plaquettes le récepteur P2X₁ à l'ATP et les récepteurs couplés aux protéines G, P2Y₁ et P2Y₁₂ (**Gachet et al. 2006b**).

Le récepteur P2Y₁ est responsable du changement de forme des plaquettes et de l'initiation de l'agrégation par l'ADP. Couplé à la protéine G α_q , son activation mène à la mobilisation des stocks de calcium intracellulaires. Le récepteur P2Y₁₂, couplé à G α_i , est responsable de l'activation complète et de l'amplification de l'agrégation à l'ADP, de la stabilisation des agrégats et de l'amplification des autres voies d'activation des plaquettes (**Gachet et al. 2006b**). Ces deux récepteurs sont aussi impliqués dans la génération de thrombine *in vitro* et *in vivo* (**Leon et al. 2004; Leon et al. 2001; Leon et al. 2003**). Enfin, le récepteur P2X₁ joue un rôle dans l'activation plaquettaire à flux élevé et dans la thrombose artérielle *in vivo* (**Hechler et al. 2003; Hechler et al. 2005**).

Le récepteur P2Y₁₂ est la cible du clopidogrel, un médicament antithrombotique qui a montré son efficacité en clinique et dans des modèles animaux de thrombose (**Savi and Herbert 2005**).

L'étude de souris déficientes en récepteur P2Y₁ et P2X₁ ou traités par des antagonistes de ces récepteurs a montré que ces récepteurs pouvaient également être des cibles intéressantes pour des médicaments antithrombotiques (**Gachet et al. 2006b**). Les souris P2Y₁^{-/-} présentent un défaut d'agrégation en réponse à l'ADP et aux faibles doses de collagène (**Fabre et al. 1999; Leon et al. 1999**) et sont résistantes à la thrombose (**Fabre et al. 1999; Lenain et al. 2003; Leon et al. 2001; Leon et al. 1999**). Dans le modèle de thrombose au FeCl₃ d'artérioles mésentériques, les souris P2Y₁^{-/-} ont un défaut de formation du thrombus quantitativement équivalent à celui de souris traitées par le clopidogrel et l'effet combiné de la déficience en P2Y₁ et du clopidogrel amplifie cet effet antithrombotique (**Lenain et al. 2003**). Une nouvelle molécule a été développée récemment, le MRS2500, qui antagonise de manière sélective P2Y₁, inhibe l'agrégation plaquettaire à l'ADP avec une IC₅₀ de l'ordre du nM (**Cattaneo et al. 2004; Kim et al. 2003**) et présente une structure chimique qui la rendrait moins sensible à la dégradation par les nucléotidases *in vivo*. Le but de cette étude a été de déterminer la stabilité de ce composé *in vivo* et son effet sur l'hémostase chez la

souris. Dans un second temps, le modèle de thrombose artérielle *in vivo* par lésion laser a été utilisé pour évaluer le potentiel antithrombotique du MRS2500 et pour valider l'intérêt du ciblage du récepteur P2Y₁.

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

MRS2500 [2-Iodo-N6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a Potent, Selective, and Stable Antagonist of the Platelet P2Y1 Receptor with Strong Antithrombotic Activity in Mice

Béatrice Hechler, **Christelle Nonne**, Eun Joo Roh, Marco Cattaneo, Jean-Pierre Cazenave, François Lanza, Kenneth A. Jacobson, and Christian Gachet

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2006, Vol. 316, Pages 556-563

Pages 556 à 563 :

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://intl-jpet.aspetjournals.org/cgi/content/full/316/2/556>

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

4.2. Conclusion

Le but de cette étude était d'évaluer le potentiel antithrombotique du MRS2500, un nouvel antagoniste sélectif et puissant du récepteur P2Y₁.

Des études avec un autre antagoniste P2Y₁, le composé MRS2179, avaient déjà montré une inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP et de la thrombose dans un modèle de thromboembolisme généralisé (**Baurand et al. 2001; Leon et al. 2001**). Cependant la faible affinité et l'absence de stabilité de ce composé empêchaient son évaluation *in vivo*. Cette étude a montré que l'administration du MRS2500 à la souris inhibait sélectivement *ex vivo* l'agrégation plaquettaire à l'ADP et que le composé était stable *in vivo*. L'injection de MRS2500 à 2 mg/kg prolonge faiblement le temps de saignement chez la souris. Ces mêmes observations ont été faites pour les souris P2Y₁^{-/-} (**Leon et al. 1999**). Au contraire, des composés bloquant l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou le récepteur P2Y₁₂ induisent un allongement important du temps de saignement dans de nombreuses espèces animales (**Foster et al. 2001**).

Dans le modèle de thrombose artérielle par lésion laser et dans un modèle de thromboembolisme par injection intraveineuse de collagène/adrénaline, le MRS2500 montre un effet antithrombotique important et augmente l'instabilité du thrombus.

Ces réponses ressemblent à celles observées dans les souris déficientes en Gα_q dans le modèle de thrombose au laser. Gα_q est une protéine clef de la signalisation de P2Y₁ mais également d'autres récepteurs (TPα, PAR et 5-HT_{2A}) (**Nonne et al. 2005**).

Les résultats obtenus avec cette nouvelle molécule indiquent que le récepteur P2Y₁ est une cible prometteuse en complément des stratégies antiplaquettaires déjà existantes. Des études dans des modèles de thrombose sur des animaux plus proches de l'homme (porc, singe, primate) seront nécessaires pour confirmer l'intérêt thérapeutique de cette molécule.

Par ailleurs, ce travail a permis de montrer que la combinaison du MRS2500 et du clopidogrel inhibe totalement la formation du thrombus dans le modèle laser de lésion sévère. Ces résultats confortent l'amplification de l'effet antithrombotique par administration de clopidogrel aux souris P2Y₁^{-/-} avait déjà été montré dans un modèle de lésion au FeCl₃ sur artérioles mésentériques (**Lenain et al. 2003**). Ces résultats suggèrent également qu'une combinaison de médicaments touchant les deux principaux récepteurs à l'ADP pourrait

présenter un intérêt en assurant un effet antiplaquettaire efficace tout en préservant une capacité hémostatique suffisante.

D) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En raison du prolongement de la durée de vie, des modifications du mode de vie en termes d'alimentation et de sédentarité, le nombre d'individus souffrant de maladies cardiovasculaires a considérablement augmenté. La thrombose au site de rupture d'une plaque d'athérosclérose est l'évènement responsable du développement des syndromes coronariens aigus, de l'infarctus du myocarde et des complications ischémiques périphériques (rénale, digestive ...). La plaquette sanguine joue un rôle clef dans la thrombose artérielle et représente une cible thérapeutique importante en vue du traitement des maladies thrombotiques. L'efficacité d'un médicament antiplaquettaire largement prescrit comme l'aspirine est limitée alors que des traitements plus efficaces comme le clopidogrel et les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ exposent aux risques hémorragiques liés à leurs propriétés antihémostatiques. En conséquence, une recherche active s'oriente vers le développement de nouveaux médicaments qui pourraient combiner une bonne efficacité antithrombotique et un risque hémorragique faible (**Jackson and Schoenwaelder 2003**).

L'étude *in vivo* des mécanismes de thrombose et de l'implication des plaquettes n'est pas réalisable chez l'homme et requiert des modèles expérimentaux dans l'animal. En raison de sa taille et de sa fertilité, la souris est devenue l'espèce la plus fréquemment utilisée en recherche fondamentale. La biologie moléculaire permettant la manipulation du génome de la souris a ouvert de nouvelles possibilités pour étudier la fonction de nouvelles protéines et voies de signalisation plaquettaires *in vitro* et *in vivo*. Cette avancée associée au développement de modèles de thrombose perfectionnés offrent l'opportunité d'explorer finement les mécanismes moléculaires de la thrombose et d'évaluer de nouvelles approches thérapeutiques (**Denis and Wagner 2007; Nieswandt et al. 2005**).

L'objectif de mon travail de thèse était de développer et de caractériser un nouveau modèle de thrombose chez la souris ainsi que d'explorer les mécanismes de la thrombose en l'appliquant à des souris déficientes pour des récepteurs et voies d'activation plaquettaires. Ce travail a été motivé par les limites des modèles existants et par le besoin de disposer d'un modèle fiable, localisé et reproductible.

Le modèle de thrombose artérielle le plus fréquemment utilisé dans la souris est l'application directe de chlorure de fer (FeCl_3) sur l'adventice d'une artère qui résulte généralement en la formation d'un thrombus plaquettaire occlusif entre 5 et 20 minutes (**Denis and Wagner 2007; Nieswandt et al. 2005**). Les réponses au FeCl_3 résultent de l'exposition du sous-endothélium et/ou des couches plus profondes de la paroi qui

contiennent des glycoprotéines de la matrice extracellulaire, des collagènes I, III et IV interstitiels et du facteur tissulaire permettant l'adhésion et/ou l'activation des plaquettes **(Konstantinides et al. 2001; Ni et al. 2000; Tseng et al. 2006)**. Le modèle de thrombose induite par le FeCl₃ présente l'avantage d'être simple d'utilisation, reproductible et, quand il est couplé à la microscopie à fluorescence, de permettre le suivi en temps réel et extemporanément de la formation du thrombus. Ce modèle peut être appliqué à des artères de diamètre important (artères carotides, fémorales) et à des artérioles (mésentère, crémaster) ce qui permet de valider des observations dans plusieurs territoires vasculaires avec des conditions hémodynamiques et des matrices vasculaires différentes.

Ce modèle a permis de confirmer l'importance des principaux récepteurs plaquettaires (complexe GPIb-V-IX, $\alpha_{IIb}\beta_3$, récepteurs à l'ADP) et ligands (Fg, FW) dans la formation d'un thrombus.

Ce modèle, appliqué à la carotide et aux artérioles mésentériques, a montré une capacité très réduite à la thrombose de souris exprimant une GPIb α dont le domaine extracellulaire a été remplacé par le récepteur IL-4 humain incapable de lier le FW ou déficientes pour la GPIb β **(Bergmeier et al. 2006; Konstantinides et al. 2006; Strassel et al. 2007)** indiquant que le récepteur GPIb-V-IX est clef dans la formation d'un thrombus artériel. Le défaut en FW ayant un effet antithrombotique moins prononcé **(Denis et al. 1998; Ni et al. 2000)** suggère le rôle d'autres ligands se liant à ce récepteur dans l'initiation de la thrombose.

La délétion ou le blocage de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ nécessaire à l'adhésion stable et à l'agrégation plaquettaire inhibe la thrombose induite par le FeCl₃ sur la carotide **(Smyth et al. 2001)**. L'étude *in vivo* des souris déficientes pour les récepteurs P2Y₁₂ ou P2Y₁ ou traitées au clopidogrel montre une diminution de la taille des thrombi dans les artérioles mésentériques **(Andre et al. 2003; Lenain et al. 2003)**. Ces résultats confirment que l'étape d'agrégation dépendant de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le mécanisme amplificateur de l'ADP jouent un rôle clef dans le développement du thrombus *in vivo*.

L'absence du Fg, principal ligand de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, dans des souris knock-out n'empêche pas la formation de thrombi mais augmente la fréquence d'embolisation dans la carotide et la artérioles mésentériques **(Jirouskova et al. 2004; Ni et al. 2000)**. De manière intéressante, des souris dont la chaîne γ du Fg, nécessaire à la liaison à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, a été mutée ou inhibée ont un temps d'occlusion des vaisseaux plus prolongé qu'en absence de Fg

(Denis and Wagner 2007; Jirouskova et al. 2004; Ni et al. 2003a). Ainsi, le défaut en Fg semble avoir un effet antithrombotique moins prononcé que l'absence ou le blocage de $\alpha_{IIb}\beta_3$.

L'utilisation de souris génétiquement modifiées dans les modèles de thrombose au $FeCl_3$ a mis à jour des mécanismes et acteurs moins bien connus, impliqués dans la consolidation des thrombi **(Prevost et al. 2003)**. Par exemple, les souris déficientes en CD40L soumises à un modèle de thrombose au $FeCl_3$ présentent des défauts de formation et de stabilité du thrombus corrigés par l'injection de sCD40L **(Andre et al. 2002)**. L'explication proposée est que le CD40L de surface ou soluble exposé par les plaquettes activées se lierait à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et renforcerait sa signalisation « outside-in ». Des souris déficientes en CD151 ou TSSC6, appartenant à la famille des tétraspanines et susceptibles de réguler la signalisation outside-in de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, ont une augmentation de l'embolisation et une diminution de la stabilité du thrombus suite à une lésion au $FeCl_3$ **(Goschnick et al. 2006; Lau et al. 2004)**.

Quelque fois des réponses plus variables et difficiles à interpréter ont été obtenues en utilisant le modèle $FeCl_3$. Ces différences sont influencées par le type de modèle utilisé et le niveau de sévérité de la lésion vasculaire. Dans une première série d'études, l'absence de GPVI déplétée par l'anticorps JAQ1 ou par inactivation génique réduit la thrombose artérielle au $FeCl_3$ dans la carotide et le mésentère **(Massberg et al. 2003; Munnix et al. 2005)**. Une autre étude a montré que, selon la concentration en $FeCl_3$ déposé sur les artérioles mésentériques, exposant une matrice plus ou moins riche en collagène I, on observait une diminution ou une réponse inchangée des souris déficientes en $\gamma FcR/GPVI$ **(Dubois et al. 2006)**.

Des variations de réponses thrombotiques pour l'inactivation d'un même gène ont été observées avec ce modèle **(Jirouskova et al. 2004; Moog et al. 2001; Ni et al. 2003a; Ni et al. 2001)**. Ces différences pourraient être dues à des variations entre laboratoires de concentrations de $FeCl_3$, de temps de lésion et/ou de vaisseaux utilisés aboutissant à l'exposition de matrices de natures différentes **(Dubois et al. 2006; Wang and Xu 2005)**.

Le modèle au $FeCl_3$ présente donc des limites et souffre fréquemment d'un manque de caractérisation pharmacologique et histologique. Quand le $FeCl_3$ est déposé par superfusion sur le mésentère, plusieurs vaisseaux, artères et veines, vont être lésés simultanément pouvant perturber la thrombose du vaisseau observé. L'utilisation de papier Whatmann imbibé de produit chimique et déposé sur le vaisseau est un moyen de palier à cet inconvénient.

Cependant, le FeCl₃ induit des modifications chimiques mal connues susceptibles de modifier le caractère thrombogène de protéines ou macromolécules de la paroi vasculaire. De plus, l'évaluation semi-quantitative de la thrombose (temps d'occlusion, nombre de plaquettes adhérentes) rend l'analyse des données délicate. Ces limites justifient le développement d'autres modèles de thrombose impliquant des modes d'induction de la lésion mieux contrôlés.

Une des difficultés de la lésion chimique étant de contrôler la variabilité de l'étendue des dommages causés, notre choix s'est porté sur une lésion par rayon laser. Le laser présente comme avantage de pouvoir produire une lésion précise, modulable et reproductible et l'utilisation d'artérioles mésentériques de pouvoir léser plusieurs vaisseaux indépendamment sur un même animal (**Hechler et al. 2003**). Le laser à azote choisi est un laser d'ablation dont le faisceau émet une longueur d'onde dans le visible (440 nm) et ne chauffe pas l'échantillon (contrairement aux infrarouges). L'impact du faisceau laser mesuré sur un miroir correspond à un cercle de quelques µm de diamètre. Le rayon laser est donc capable de léser très précisément à l'échelle de la cellule et il est possible de moduler sa puissance et donc les dégâts causés.

Indépendamment de notre travail, le laboratoire de B. Furie a mis au point un modèle également basé sur la lésion laser utilisant le même laser générateur mais ciblant un autre vaisseau, l'artériole du muscle crémaster (**Celi et al. 2003; Falati et al. 2002**). Ce modèle apporte des avancées techniques avec la mise en place d'un système intégré de microscopie intravitale comprenant un changeur de longueur d'onde et un obturateur placé sur le trajet de la lumière transmise pilotés par un logiciel (SlideBook™) qui permettent l'acquisition séquentielle d'images en lumière transmise et dans trois longueurs d'ondes distinctes. Un système piezo-électrique permettant un déplacement en z et un scanner confocal à disque de Nipkow permettent le balayage du thrombus en 3 dimensions et en double marquage. Les images sont acquises avec des caméras CCD à grande vitesse d'acquisition pour la partie microscopie à fluorescence et à haute résolution pour la partie confocale. Ce système permet d'analyser informatiquement la cinétique de croissance, la taille, l'intensité de fluorescence et l'embolisation du thrombus. L'analyse par microscopie à fluorescence permet de visualiser des antigènes plaquettaires et la génération de protéines telles que la fibrine, la P-sélectine et les facteurs de coagulation et de déterminer la composition et la (co)localisation des éléments qui constituent le thrombus.

Ce système intégré a été adapté à notre équipement microscopique et à notre modèle de lésion laser d'artérioles mésentériques. Au final, notre modèle et celui du laboratoire de B. Furie bénéficient du même équipement mais diffèrent surtout par le choix du vaisseau lésé (mésentère versus muscle crémaster) et par l'étendue et la profondeur des lésions.

Après calibration de l'intensité du rayon laser et de la durée du tir, nous avons pu obtenir des lésions, superficielles ou sévères de la paroi d'artères mésentériques caractérisés histologiquement, aboutissant à des thromboses reproductibles et distinctes au niveau de leur taille et de leur cinétique (**Nonne et al. 2005**).

L'analyse en microscopie électronique d'artérioles prélevées après une lésion superficielle montre une lésion très limitée en étendue et profondeur contrairement à la lésion sévère et à la lésion provoquée par le FeCl₃. La lésion superficielle expose un sous-endothélium riche en collagène sans atteindre les couches plus profondes (média et adventice). Le thrombus formé est très localisé, non occlusif, de taille modérée et rapidement réversible. Les antiplaquettaires comme le clopidogrel ou l'éptifibatide diminuent fortement la thrombose superficielle mais l'aspirine n'a pas d'effet. L'hirudine ne diminue pas la thrombose à la différence des modèles de lésion laser sévère et dans le crémaster. La lésion superficielle provoque donc un thrombus de composition et de réactivité pharmacologique uniques qui distinguent ce modèle des principaux modèles existants.

Dans ce modèle, la thrombose est diminuée chez les souris déficientes en γ RFc/GPVI à la différence des observations dans les modèles de lésion sévère, de Folts et de lésion électrique, qui entraînent une thrombose occlusive dépendant de la génération de thrombine (**Mangin et al. 2006**). Par contre, une thrombose diminuée est également observée pour ces souris dans des modèles de lésion mécanique (**Massberg et al. 2004b**) ou au FeCl₃ (**Massberg et al. 2003; Munnix et al. 2005**). Ces variations de réponse sont difficiles à expliquer, notamment en l'absence de caractérisation complète de plusieurs de ces modèles.

Sur le plan physiopathologique, le modèle de lésion superficielle, qui est réalisé sur un vaisseau sain et sans atteinte les couches profondes, pourrait correspondre plus à un modèle d'hémostase que de thrombose, telle qu'elle se développe après rupture d'une plaque d'athérosclérose. Cependant, il serait tentant d'assimiler ce modèle à modèle d'un angor instable ou d'un infarctus du myocarde sans élévation du segment ST, où le thrombus formé est riche en plaquettes et non occlusif et où les lésions pourraient correspondre à l'érosion plutôt qu'à la rupture d'une plaque d'athérosclérose (**Mizuno et al. 1992**). Le traitement de

ces affections est uniquement basé sur les antiagrégants plaquettaires, les thrombolytiques dégradant la fibrine s'étant révélés inefficaces (**TIMI.IIIB 1994**).

L'analyse en microscopie électronique après lésion profonde montre des dommages plus étendus et qui affectent en son centre les couches profondes (média et adventice), contenant des collagènes I, III et capables de générer de la thrombine. Le thrombus formé occupe progressivement toute la lumière du vaisseau, sans qu'il y ait un arrêt total du flux. Dans ce modèle, la fibrine consolide le thrombus au site de lésion. Ce thrombus est composé de plaquettes dégranulées à proximité du site de lésion et de plaquettes ayant conservé leurs granules à mesure que l'on s'en éloigne. La lésion sévère est sensible aux antiplaquettaires (eptifibatide, clopidogrel) et anticoagulants (hirudine) mais pas à l'aspirine.

Le modèle de lésion sévère développé dans les artérioles mésentériques présente des similitudes avec celui décrit dans les artérioles du muscle crémaster (**Dubois et al. 2006; Falati et al. 2002; Falati et al. 2004**), où la thrombose est également sensible à l'hirudine (**Dubois et al. 2006**). Dans ce même modèle, l'observation en microscopie intravitale montre l'accumulation de facteur tissulaire et la génération de fibrine au site de lésion et à l'intérieur du thrombus (**Falati et al. 2002**). L'absence d'effet du déficit en γ RFc/GPVI dans notre modèle de lésion et également observé dans la lésion d'artérioles du crémaster (**Dubois et al. 2006; Mangin et al. 2006**) renforçant l'idée que ces deux modèles présentent des similitudes. Cependant, leur comparaison est difficile à réaliser car l'analyse des thrombi dans l'artériole du crémaster diffère selon les publications : taille du thrombus (unité arbitraire) (**Chou et al. 2004**), intensité de fluorescence (**Falati et al. 2002**) et intensité de fluorescence normalisée (**Vandendries et al. 2007**). Des expériences d'immunomarquage *in vivo* et d'immunofluorescence sur tissu fixé suggèrent une faible exposition de collagène de type I dans le modèle développé dans le crémaster (**Dubois et al. 2006**). Or nos analyses d'immunomarquages par billes d'or de la paroi des artérioles mésentériques avec le même anticorps suggèrent l'exposition du collagène I dans la lésion sévère. La comparaison sera facilitée lorsque ces deux types de modèles seront diffusés plus largement et comparés.

Au niveau physiopathologique, le modèle de lésion sévère se rapproche plus d'une thrombose telle qu'elle se produit après rupture d'une plaque d'athérosclérose exposant une matrice riche en collagène et en FT (**McCullagh et al. 1980; Penz et al. 2007**). La rupture d'une plaque est la cause majoritaire de l'infarctus du myocarde transmural avec élévation du segment ST après occlusion complète de l'artère coronaire par un thrombus riche en plaquettes et en fibrine (**Mizuno et al. 1992**). Les traitements thrombolytiques se sont révélés efficaces

dans cette pathologie contrairement aux antiagrégants seuls. Il faut cependant noter que la lésion sévère d'artérioles mésentériques entraîne une occlusion qui régresse progressivement, des mécanismes physiologiques (désagrégation, fibrinolyse) intervenant probablement dans ce vaisseau sain pour permettre sa résorption. Dans l'optique d'un criblage pharmacologique ce modèle de lésion sévère polyvalent doit permettre d'évaluer à la fois les agents antiplaquettaires et anticoagulants.

Le modèle de lésion laser développé durant cette thèse a permis dans un premier temps d'explorer l'importance de plusieurs récepteurs et voies d'activation des plaquettes dans la formation d'un thrombus. J'ai pu montrer que l'absence ou un faible niveau d'expression du complexe GPIb-V-IX, connu pour affecter l'hémostase, a également des répercussions sur le développement d'une thrombose dans les deux types de lésions (**Strassel et al. 2007**). Cibler le complexe représente donc une voie intéressante alors que peu d'inhibiteurs ont été développés à ce jour. Deux approches sont envisageables pour bloquer le récepteur. La première, sur laquelle sont basés les inhibiteurs connus, est d'empêcher la liaison au FW donc l'adhésion, en ciblant le domaine extracellulaire. La deuxième, que nous avons tenté d'évaluer à l'aide des souris GPIb β Δ IC^{-/-}, est de cibler la signalisation. Cependant, la délétion du domaine intracellulaire de la GPIb β entraînant une thrombopénie et une baisse d'expression du complexe à la surface des plaquettes ne nous a pas permis de distinguer clairement les effets provenant de la signalisation, dont le rôle reste encore à démontrer (**Strassel et al. 2007**). Récemment au laboratoire, une courte région intracellulaire de la GPIb β a été identifiée comme étant impliquée dans l'activation menant à l'émission de filopodes de cellules transfectées par le complexe GPIb-V-IX (**David**, manuscrit en préparation). La transduction virale de mégacaryocytes provenant de souris GPIb β ^{-/-} pour y insérer une GPIb β humaine dont le domaine intracellulaire a été muté dans cette région est en cours. Ces cellules seront ensuite réimplantées dans les souris GPIb β ^{-/-} irradiées. Ces souris permettront d'évaluer l'importance des domaines intracellulaires de la GPIb β dans la lignée plaquettaire et les répercussions dans les modèles de thrombose.

Le modèle de lésion laser a aussi été mis à contribution pour évaluer le rôle de la GPV dans la thrombose. La GPV est une sous-unité du complexe GPIb-V-IX mais n'est pas impliquée dans ses fonctions d'adhésion (**Kahn et al. 1999**). Des résultats discordants montrant une tendance pro ou antithrombotique avaient été publiés précédemment (**Moog et**

al. 2001; Ni et al. 2001; Ramakrishnan et al. 1999) sur des lignées distinctes générées sur fond génétique mixte. L'objectif de ce travail était de réévaluer le potentiel thrombotique en utilisant des souris déficientes en GPV croisées en retour sur un fond pur C57BL6/J. L'étude de ces souris dans le modèle laser et la comparaison de deux types de lésion (superficielle et sévère) permettent de réconcilier ces observations d'apparence contradictoires en démontrant une légère diminution ou une amplification de la thrombose en l'absence de GPV selon le degré d'implication de la thrombine. Le défaut de réponse au collagène des plaquettes de ces souris a probablement une faible répercussion dans le développement du thrombus. Le rôle physiologique de la GPV reste encore à identifier. Les autres pistes à explorer portent sur la part de la forme soluble libérée par la thrombine dans les réponses plus tardives comme la fibrinof formation et la fibrinolyse.

Une information intéressante obtenue grâce à ce modèle de thrombose est que le blocage du récepteur GPVI au collagène et de sa voie de signalisation en réponse au collagène est peu efficace dans des conditions de thrombose sévère où la voie de la thrombine prédomine (**Mangin et al. 2006**). Ces résultats corroborés par d'autres équipes tempèrent quelque peu les espoirs placés dans le développement d'antagonistes de ce récepteur. La GPVI pourrait malgré tout représenter une cible intéressante en situations de thrombose lors de lésions superficielles ou pour améliorer l'efficacité antithrombotique en association avec d'autres antiplaquettaires comme des antagonistes du récepteur PAR4.

Le profil thrombotique des souris déficientes en γ RFc/GPVI était en fait prévisible sur la base de l'étude précédente évaluant la part des voies d'activation PLC γ 2 et PLC β /G α q. La taille du thrombus est diminuée pour les souris PLC γ 2^{-/-} avec un profil similaire aux souris γ RFc^{-/-} dans la lésion superficielle. L'activation PLC γ 2 dépendante par les récepteurs aux protéines adhésives joue un rôle moindre dans la thrombose sévère, théorie confirmée par l'absence d'effet du défaut en GPVI sur la thrombose suite à cette lésion (**Mangin et al. 2006**). Lors de la lésion sévère, la thrombine générée localement et la sécrétion d'ADP semble suffire à l'activation plaquettaire et à la formation du thrombus, ce qui est confirmé par le défaut observé chez les souris P2Y₁^{-/-} (**Hechler et al. 2006**). La déficience en G α q affecte les deux types de thrombose. La contribution des récepteurs plaquettaires à la thrombine et plus particulièrement PAR4 dans ce modèle reste à évaluer. Les souris PAR4^{-/-} sont protégées de la thrombose dans le modèle de lésion au FeCl₃ d'artérioles mésentériques (**Hamilton et al. 2004; Sambrano et al. 2001**) et ont une diminution de la taille des thrombi et de l'expression de P-sélectine (avec une génération normale de fibrine) dans le modèle de lésion laser d'artérioles du crémaster (**Vandendries et al. 2007**).

Enfin, ce travail a permis de confirmer un rôle important d'un des deux récepteurs à l'ADP, P2Y₁, confirmant l'intérêt clinique de son ciblage (**Hechler et al. 2006**). Le modèle de lésion laser a aussi montré l'utilité d'associer une inhibition des deux récepteurs principaux de l'ADP, P2Y₁ et P2Y₁₂, et d'ouvrir la voie à l'évaluation de ces cibles dans des modèles sur de plus gros animaux préluce indispensable aux études chez l'homme.

Dans la suite de ce travail des développements et des améliorations devront être apportées au modèle laser.

A ce jour, l'analyse de la thrombose a surtout porté sur l'évolution de la surface du thrombus. L'évaluation du volume du thrombus va être implémentée afin d'apprécier des différences dans la structure du thrombus et la cohésion des plaquettes. Les mises au point ont déjà été effectuées dans des souris C57BL6/J. La mesure du volume des thrombi montre une différence de 45 fois entre les thromboses superficielle et sévère au lieu de 10 à 12 fois pour la surface.

L'analyse des mécanismes et acteurs impliqués dans la thrombose va nécessiter l'amélioration des marquages *in vivo* de protéines/récepteurs sur le mode de ce qui a été réalisé dans le modèle crémaster (**Falati et al. 2002**). Le marquage est réalisable directement par l'injection à l'animal d'un anticorps couplé à un fluorophore, d'un fluorophore ou indirectement par l'injection de plaquettes ou de protéines marquées *in vitro*. Une première approche nous a permis de confirmer la présence et localisation de la fibrine dans le modèle de thrombose sévère. Ces marquages pourront nous permettre de visualiser d'autres acteurs/protéines comme le facteur tissulaire, la P-sélectine ou la forme soluble de la GPV libérée suite à son clivage par la thrombine afin de déterminer leur contribution à la thrombose.

Les approches de marquage peuvent cependant interférer avec le processus de thrombose et/ou induire des artefacts. Certains fluorophores sont activateurs aux fortes doses, c'est le cas du DIOC₆ qui s'incorpore dans les membranes lipidiques et donc dans les granules plaquettaires induisant leur sécrétion.

Lors des expériences d'immunomarquage *in vivo* nous avons pu constater que l'anticorps de souris anti-chaîne II β de la fibrine (aux doses utilisées dans la publication 2) inhibait la formation du thrombus. D'autres anticorps évalués aux doses décrites par le groupe de B. Furie se sont révélés thrombopéniant dans notre modèle, comme l'anticorps de rat anti-CD41 de souris, ou inhibiteurs de la thrombose comme l'anticorps de rat anti-P-sélectine de souris (**Falati et al. 2003**).

Il est également envisagé d'explorer *in vivo* certaines fonctions des plaquettes surtout étudiées *in vitro* mais peu ou pas explorés dans un système. Par exemple, ce modèle pourrait permettre d'évaluer la signalisation intracellulaire, l'activité procoagulante, le changement de forme, la désagrégation, la fibrinolyse et la rétraction du caillot.

La réinjection de plaquettes préalablement marquées avec des sondes fluorescentes pour le calcium pourrait permettre d'évaluer la signalisation calcique dans un thrombus *in vivo* (**van Gestel et al. 2003**). Ces changements dans les niveaux d'activation des plaquettes pourront être mis en relation avec leur comportement et leur intégration dans le thrombus.

Afin de mesurer l'activité procoagulante des plaquettes, un test spécifique devra être développé pour mesurer la génération de thrombine *in situ* basé sur un substrat fluorescent de la thrombine.

Lors de leur activation les plaquettes subissent divers changements de forme comme la contraction du corps cellulaire, l'émission de filopodes contribuant au ralentissement des plaquettes et la production de lamellipodes. L'ensemble de ces événements repose sur la réorganisation des cytosquelettes de microtubules et d'actine (**Hartwig 2006**). Une amélioration des méthodes de visualisation *in vivo* du thrombus en contraste interférentiel ou l'utilisation de plaquettes fluorescentes pourrait permettre de mieux apprécier les changements de forme et renseigner sur leur implication dans la formation d'un thrombus.

L'étude des mécanismes de désagrégation du thrombus et de lyse du caillot sont également très peu étudiés *in vivo*. L'étude en microscope électronique du thrombus formé après une lésion sévère nous a montré que les plaquettes au contact de la paroi lésée et au centre du thrombus étaient fortement activées et avaient sécrété le contenu de leurs granules, tandis que celles plus éloignées présentaient une moindre activation. L'observation de la cinétique du thrombus en fluorescence et lumière transmise indique que la région du thrombus en aval du site de lésion sévère embolise lors de la régression du thrombus. Ces observations suggèrent que contrairement aux conditions de l'agrégation où les plaquettes semblent activées de façon homogène par un agoniste, les thrombi formés *in vivo* sont hétérogènes, ce qui participe à l'embolisation/désagrégation du thrombus. L'étude de ces mécanismes va également nécessiter des adaptations du modèle existant.

Le rôle des plaquettes au niveau artériel est clairement établi mais il ne faut pas négliger leur implication possible dans la thrombose veineuse. Les lignées de souris génétiquement modifiées offrent l'opportunité d'évaluer l'importance des plaquettes dans la thrombose veineuse. Le modèle de Wessler est le modèle de thrombose veineuse chez l'animal le plus courant (**Freund et al. 1990; Wessler 1962**). Ce modèle présente

l'inconvénient de ne pas pouvoir être associé au développement de l'imagerie chez le petit animal. Les modèles de thrombose veineuse par photoinduction et par lésion au FeCl₃ sont aussi décrits dans la littérature (**Denis and Wagner 2007**). Un modèle couramment utilisé dans les veines est l'activation de l'endothélium par un ionophore calcique, modèle qui a permis de mettre en évidence le rôle de la P-sélectine dans le recrutement des plaquettes au site de lésion (**Frenette et al. 1995**). Le développement d'un modèle de thrombose veineuse bien calibré et localisé par lésion laser associé au système d'imagerie permettrait de visualiser en temps réel et de quantifier finement la thrombose. Quelques expériences de lésion laser de veinules mésentériques ont été réalisées mais montrant la formation d'un thrombus mixte de leucocytes et de plaquettes et une sensibilité à un anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ et à l'hirudine.

Le modèle décrit ici est réalisé chez des animaux très jeunes (3 semaines) dont les vaisseaux sont sains, sans lésion d'athérosclérose. Par conséquent, il est envisagé de réaliser les mêmes types de lésion directement sur des vaisseaux présentant des plaques d'athérosclérose, telles que celles générées dans des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}) ou en récepteur des LDL (LDL^{-/-}) afin de mieux modéliser les situations physiopathologiques humaines (**Ishibashi et al. 1993; Zhang et al. 1992**). Le croisement de ces souris avec des souris déficientes pour certains récepteurs ou protéines impliquées dans l'hémostase et la thrombose pourra permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu en situations pathologiques. Le développement accéléré de plaques d'athérosclérose calibrées et de composition proche des plaques humaines peut être contrôlé spatialement par la mise en place d'un collier sur une artère de gros calibre (**von der Thusen et al. 2001**). Des essais de mise en place d'un collier sur la carotide de souris ApoE^{-/-} ont déjà été réalisés. L'analyse de la composition des lésions d'athérosclérose montre que les lésions développées présentent les caractéristiques des plaques d'athérome développées chez l'homme. Cette technique permet d'envisager le développement de modèles de thrombose sur plaques bien calibrées sur des vaisseaux facilement accessibles et pourrait bénéficier des améliorations techniques de l'imagerie chez le petit animal.

Au final, le modèle développé durant cette thèse présente des caractéristiques intéressantes mais qui seul ne répond pas à toutes les questions. Ce modèle doit être associé à d'autres modes d'induction de la thrombose et sur plusieurs territoires vasculaires pour une meilleure évaluation des mécanismes et acteurs de la thrombose et pour apprécier l'intérêt d'un ciblage pharmacologique.

Dans une perspective thérapeutique, les modèles dans la souris et l'évaluation systématique du génome plaquettaire pourraient dégager des pistes intéressantes. Le modèle développé pendant cette thèse est un puissant outil pour découvrir des molécules telles que le clopidogrel ou des inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à effet antithrombotique puissant mais serait moins efficace pour évaluer des composés comme l'aspirine. Il permet aussi d'évaluer de façon systématique des associations d'agents qui par eux-mêmes ont un effet antithrombotique faible. Des traitements combinés P2Y₁/P2Y₁₂ ou GPVI/PAR4 peuvent être envisagés.

Il reste que les souris sont des petits animaux qui ont avec l'homme de nombreuses différences et on ne s'affranchira pas de mettre à l'épreuve les données générées par les études chez la souris dans des modèles animaux plus proches de l'homme comme le chien, le porc ou les primates (**Johnson et al. 1999**).

E) RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarts, P. A., S. A. van den Broek, G. W. Prins, G. D. Kuiken, J. J. Sixma et R. M. Heethaar. "Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood." *Arteriosclerosis* (1988) 8(6): 819-24.
- Adam, F., M. C. Bouton, M. G. Huisse et M. Jandrot-Perrus. "Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib alpha." *Trends Mol Med* (2003) 9(11): 461-4.
- Adams, J. C. et J. Lawler. "The thrombospondins." *Int J Biochem Cell Biol* (2004) 36(6): 961-8.
- Aiken, J. W., R. J. Shebuski, O. V. Miller et R. R. Gorman. "Endogenous prostacyclin contributes to the efficacy of a thromboxane synthetase inhibitor for preventing coronary artery thrombosis." *J Pharmacol Exp Ther* (1981) 219(2): 299-308.
- Aird, W. C. "Spatial and temporal dynamics of the endothelium." *J Thromb Haemost* (2005) 3(7): 1392-406.
- Andre, P. "P-selectin in haemostasis." *Br J Haematol* (2004) 126(3): 298-306.
- Andre, P., S. M. Delaney, T. LaRocca, D. Vincent, F. DeGuzman, M. Jurek, B. Koller, D. R. Phillips et P. B. Conley. "P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries." *J Clin Invest* (2003) 112(3): 398-406.
- Andre, P., K. S. Prasad, C. V. Denis, M. He, J. M. Papalia, R. O. Hynes, D. R. Phillips et D. D. Wagner. "CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism." *Nat Med* (2002) 8(3): 247-52.
- Angelillo-Scherrer, A., L. Burnier, N. Flores, P. Savi, M. DeMol, P. Schaeffer, J. M. Herbert, G. Lemke, S. P. Goff, G. K. Matsushima, H. S. Earp, C. Vesin, M. F. Hoylaerts, S. Plaisance, D. Collen, E. M. Conway, B. Wehrle-Haller et P. Carmeliet. "Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy." *J Clin Invest* (2005) 115(2): 237-46.
- Angelillo-Scherrer, A., P. de Frutos, C. Aparicio, E. Melis, P. Savi, F. Lupu, J. Arnout, M. Dewerchin, M. Hoylaerts, J. Herbert, D. Collen, B. Dahlback et P. Carmeliet. "Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis." *Nat Med* (2001) 7(2): 215-21.
- Annis, D. S., J. E. Murphy-Ullrich et D. F. Mosher. "Function-blocking antithrombospondin-1 monoclonal antibodies." *J Thromb Haemost* (2006) 4(2): 459-68.
- Arai, M., N. Yamamoto, M. Moroi, N. Akamatsu, K. Fukutake et K. Tanoue. "Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency." *Br J Haematol* (1995) 89(1): 124-30.
- Arfors, K. E., D. P. Dhall, J. Engeset, H. C. Hint, N. A. Matheson et O. Tangen. "Studies on platelet behaviour after endothelial injury." *Br J Surg* (1968a) 55(11): 858.
- Arfors, K. E., H. C. Hint, D. P. Dhall et N. A. Matheson. "Counteraction of platelet activity at sites of laser-induced endothelial trauma." *Br Med J* (1968b) 4(5628): 430-1.
- Ariens, R. A., T. S. Lai, J. W. Weisel, C. S. Greenberg et P. J. Grant. "Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms." *Blood* (2002) 100(3): 743-54.
- 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., K. Dwyer, K. Enjyoji et S. C. Robson. "Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets." *Blood Cells Mol Dis* (2006) 36(2): 217-22.

- 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.
- Bagdy, D., G. Szabo, E. Barabas et S. Bajusz. "Inhibition by D-MePhe-Pro-Arg-H (GYKI-14766) of thrombus growth in experimental models of thrombosis." *Thromb Haemost* (1992) 68(2): 125-9.
- Balla, G., G. M. Vercellotti, J. W. Eaton et H. S. Jacob. "Iron loading of endothelial cells augments oxidant damage." *J Lab Clin Med* (1990) 116(4): 546-54.
- Barnes, M. J., C. G. Knight et R. W. Farndale. "The use of collagen-based model peptides to investigate platelet-reactive sequences in collagen." *Biopolymers* (1996) 40(4): 383-97.
- Baruch, D., C. Denis, C. Marteaux, D. Schoevaert, L. Coulombel et D. Meyer. "Role of von Willebrand factor associated to extracellular matrices in platelet adhesion." *Blood* (1991) 77(3): 519-27.
- Baurand, A., P. Raboisson, M. Freund, C. Leon, J. P. Cazenave, J. J. Bourguignon et C. Gachet. "Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist." *Eur J Pharmacol* (2001) 412(3): 213-21.
- 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.
- Bennett, J. S. "Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3." *J Clin Invest* (2005) 115(12): 3363-9.
- Bergmann, S. R., K. A. Fox, M. M. Ter-Pogossian, B. E. Sobel et D. Collen. "Clot-selective coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator." *Science* (1983) 220(4602): 1181-3.
- Bergmeier, W., C. L. Piffath, T. Goerge, S. M. Cifuni, Z. M. Ruggeri, J. Ware et D. D. Wagner. "The role of platelet adhesion receptor GPIb α far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103(45): 16900-5.
- Bernat, A., A. M. Mares, G. Defreyn, J. P. Maffrand et J. M. Herbert. "Effect of various antiplatelet agents on acute arterial thrombosis in the rat." *Thromb Haemost* (1993) 70(5): 812-6.
- Bernatowicz, M. S., C. E. Klimas, K. S. Hartl, M. Peluso, N. J. Allegretto et S. M. Seiler. "Development of potent thrombin receptor antagonist peptides." *J Med Chem* (1996) 39(25): 4879-87.
- Berndt, M. C. et D. R. Phillips. "Purification and preliminary physicochemical characterization of human platelet membrane glycoprotein V." *J Biol Chem* (1981) 256(1): 59-65.
- 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.
- Beviglia, L., A. Poggi, C. Rossi, M. A. McLane, R. Calabrese, E. Scanziani, J. J. Cook et S. Niewiarowski. "Mouse antithrombotic assay. Inhibition of platelet thromboembolism by disintegrins." *Thromb Res* (1993) 71(4): 301-15.
- Bevilacqua, C., M. Finesso et M. Prosdociami. "Acute carotid artery occlusive thrombosis and its pharmacological prevention in the rabbit." *Thromb Res* (1991) 62(4): 263-73.
- Bhatt, D. L. et E. J. Topol. "Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy." *Nat Rev Drug Discov* (2003) 2(1): 15-28.
- Blair, E., E. Nygren et R. A. Cowley. "A Spiral Wire Technique for Producing Gradually Occlusive Coronary Thrombosis." *J Thorac Cardiovasc Surg* (1964) 48: 476-85.

- Boneu, B. et J.-P. Cazenave. "Introduction à l'étude de l'Hémostase et de la Thrombose. 2ème édition." Alinéa (1997).
- Bonnefoy, A., K. Daenens, H. B. Feys, R. De Vos, P. Vandervoort, J. Vermynen, J. Lawler et M. F. Hoylaerts. "Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting (sub)endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13." *Blood* (2006) 107(3): 955-64.
- Bonnefoy, A., R. Hantgan, C. Legrand et M. M. Frojmovic. "A model of platelet aggregation involving multiple interactions of thrombospondin-1, fibrinogen, and GPIIb/IIIa receptor." *J Biol Chem* (2001) 276(8): 5605-12.
- Booth, N. A. et B. Bennett. "Fibrinolysis and thrombosis." *Baillieres Clin Haematol* (1994) 7(3): 559-72.
- Bornstein, P. "Thrombospondins as matricellular modulators of cell function." *J Clin Invest* (2001) 107(8): 929-34.
- Bou-Gharios, G., M. Ponticos, V. Rajkumar et D. Abraham. "Extra-cellular matrix in vascular networks." *Cell Prolif* (2004) 37(3): 207-20.
- Broersma, R. J., L. W. Kutcher et E. F. Heminger. "The effect of thrombin inhibition in a rat arterial thrombosis model." *Thromb Res* (1991) 64(4): 405-12.
- Brophy, J. M. et L. Joseph. "Medical decision making with incomplete evidence--choosing a platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor for percutaneous coronary interventions." *Med Decis Making* (2005) 25(2): 222-8.
- Burke, A. P., F. D. Kolodgie, A. Farb, D. K. Weber, G. T. Malcom, J. Smialek et R. Virmani. "Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression." *Circulation* (2001) 103(7): 934-40.
- Bush, L. R. et R. J. Shebuski. "In vivo models of arterial thrombosis and thrombolysis." *Faseb J* (1990) 4(13): 3087-98.
- Camera, M., M. Frigerio, V. Toschi, M. Brambilla, F. Rossi, D. C. Cottell, P. Maderna, A. Parolari, R. Bonzi, O. De Vincenti et E. Tremoli. "Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2003) 23(9): 1690-6.
- Cattaneo, M., A. Lecchi, M. Ohno, B. V. Joshi, P. Besada, S. Tchilibon, R. Lombardi, N. Bischofberger, T. K. Harden et K. A. Jacobson. "Antiaggregatory activity in human platelets of potent antagonists of the P2Y₁ receptor." *Biochem Pharmacol* (2004) 68(10): 1995-2002.
- Cattaneo, M., A. Lecchi, A. M. Randi, J. L. McGregor et P. M. Mannucci. "Identification of a new congenital defect of platelet function characterized by severe impairment of platelet responses to adenosine diphosphate." *Blood* (1992) 80(11): 2787-96.
- 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.
- Cayette, A. J., Y. Du, J. Oliver-Krasinski, G. Lavielle, T. J. Verbeuren et R. A. Cohen. "The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherosclerosis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2000) 20(7): 1724-8.
- Celi, A., G. Merrill-Skoloff, P. Gross, S. Falati, D. S. Sim, R. Flaumenhaft, B. C. Furie et B. Furie. "Thrombus formation: direct real-time observation and digital analysis of thrombus assembly in a living mouse by confocal and widefield intravital microscopy." *J Thromb Haemost* (2003) 1(1): 60-8.

- Cercek, B., A. S. Lew, H. Hod, J. Yano, N. K. Reddy et W. Ganz. "Enhancement of thrombolysis with tissue-type plasminogen activator by pretreatment with heparin." *Circulation* (1986) 74(3): 583-7.
- Chauhan, A. K., J. Kisucka, C. B. Lamb, W. Bergmeier et D. D. Wagner. "von Willebrand Factor and Factor VIII are independently required to form stable occlusive thrombi in injured veins." *Blood* (2006).
- Chen, C., Q. Li, A. L. Darrow, Y. Wang, C. K. Derian, J. Yang, L. de Garavilla, P. Andrade-Gordon et B. P. Damiano. "Mer receptor tyrosine kinase signaling participates in platelet function." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2004) 24(6): 1118-23.
- Chen, H., D. Locke, Y. Liu, C. Liu et M. L. Kahn. "The platelet receptor GPVI mediates both adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion." *J Biol Chem* (2002a) 277(4): 3011-9.
- Chen, J., T. G. Diacovo, D. G. Grenache, S. A. Santoro et M. M. Zutter. "The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis." *Am J Pathol* (2002b) 161(1): 337-44.
- Chiang, T. M., A. Rinaldy et A. H. Kang. "Cloning, characterization, and functional studies of a nonintegrin platelet receptor for type I collagen." *J Clin Invest* (1997) 100(3): 514-21.
- Chiang, T. M. et H. Takayama. "The signal transduction pathway of the nonintegrin receptor of 65 kDa is different from glycoprotein VI." *Arch Biochem Biophys* (2002) 407(1): 10-4.
- Cho, J. et D. F. Mosher. "Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation." *J Thromb Haemost* (2006) 4(7): 1461-9.
- Cho, M. J., J. Liu, T. I. Pestina, S. A. Steward, D. W. Thomas, T. M. Coffman, D. Wang, C. W. Jackson et T. K. Gartner. "The roles of alpha IIb beta 3-mediated outside-in signal transduction, thromboxane A₂, and adenosine diphosphate in collagen-induced platelet aggregation." *Blood* (2003) 101(7): 2646-51.
- Chou, J., N. Mackman, G. Merrill-Skoloff, B. Pedersen, B. C. Furie et B. Furie. "Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation." *Blood* (2004) 104(10): 3190-7.
- Clemetson, J. M., J. Polgar, E. Magnenat, T. N. Wells et K. J. Clemetson. "The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors." *J Biol Chem* (1999) 274(41): 29019-24.
- Clemetson, K. J. et J. M. Clemetson. "Platelet collagen receptors." *Thromb Haemost* (2001) 86(1): 189-97.
- Clifford, E. E., K. Parker, B. D. Humphreys, S. B. Kertesy et G. R. Dubyak. "The P2X₁ receptor, an adenosine triphosphate-gated cation channel, is expressed in human platelets but not in human blood leukocytes." *Blood* (1998) 91(9): 3172-81.
- Coller, B. S., K. Anderson et H. F. Weisman. "New antiplatelet agents: platelet GPIIb/IIIa antagonists." *Thromb Haemost* (1995) 74(1): 302-8.
- Coller, B. S., J. D. Folts, L. E. Scudder et S. R. Smith. "Antithrombotic effect of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in an experimental animal model." *Blood* (1986) 68(3): 783-6.
- Coller, B. S., J. D. Folts, S. R. Smith, L. E. Scudder et R. Jordan. "Abolition of in vivo platelet thrombus formation in primates with monoclonal antibodies to the platelet GPIIb/IIIa receptor. Correlation with bleeding time, platelet aggregation, and blockade of GPIIb/IIIa receptors." *Circulation* (1989) 80(6): 1766-74.

- Contrino, J., G. Hair, D. L. Kreutzer et F. R. Rickles. "In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease." *Nat Med* (1996) 2(2): 209-15.
- Coughlin, S. R. "Thrombin signalling and protease-activated receptors." *Nature* (2000) 407(6801): 258-64.
- Day, S. M., J. L. Reeve, B. Pedersen, D. M. Farris, D. D. Myers, M. Im, T. W. Wakefield, N. Mackman et W. P. Fay. "Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall." *Blood* (2005) 105(1): 192-8.
- Denis, C., D. Baruch, C. M. Kielty, N. Ajzenberg, O. Christophe et D. Meyer. "Localization of von Willebrand factor binding domains to endothelial extracellular matrix and to type VI collagen." *Arterioscler Thromb* (1993) 13(3): 398-406.
- 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.
- Denis, C. V. et D. D. Wagner. "Platelet Adhesion Receptors and Their Ligands in Mouse Models of Thrombosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2007).
- DiMinno, G. et M. J. Silver. "Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol." *J Pharmacol Exp Ther* (1983) 225(1): 57-60.
- Dogne, J. M., J. Hanson, X. de Leval, P. Kolh, V. Tchana-Sato, L. de Leval, S. Rolin, A. Ghuysen, P. Segers, B. Lambermont, B. Masereel et B. Pirotte. "Pharmacological characterization of N-tert-butyl-N'-[2-(4'-methylphenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea (BM-573), a novel thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor in a rat model of arterial thrombosis and its effects on bleeding time." *J Pharmacol Exp Ther* (2004) 309(2): 498-505.
- Dorffler-Melly, J., L. A. Schwarte, C. Ince et M. Levi. "Mouse models of focal arterial and venous thrombosis." *Basic Res Cardiol* (2000) 95(6): 503-9.
- Drake, T. A., J. Cheng, A. Chang et F. B. Taylor, Jr. "Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis." *Am J Pathol* (1993) 142(5): 1458-70.
- Drake, T. A., J. H. Morrissey et T. S. Edgington. "Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis." *Am J Pathol* (1989) 134(5): 1087-97.
- 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.
- Du, X. et M. H. Ginsberg. "Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function." *Thromb Haemost* (1997) 78(1): 96-100.
- Dubois, C., L. Panicot-Dubois, G. Merrill-Skoloff, B. Furie et B. C. Furie. "Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo." *Blood* (2006) 107(10): 3902-6.
- Dubois, C., B. Steiner et S. C. Meyer Reigner. "Contribution of PAR-1, PAR-4 and GPIIb/IIIa 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 GpIb α -thrombin complex essential for platelet aggregation." *Science* (2003) 301(5630): 222-6.
- Esmon, C. T. "Possible involvement of cytokines in diffuse intravascular coagulation and thrombosis." *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* (1999) 12(3): 343-59.
- Esmon, C. T. "Does inflammation contribute to thrombotic events?" *Haemostasis* (2000) 30 Suppl 2: 34-40.
- Exposito, J. Y., C. Cluzel, R. Garrone et C. Lethias. "Evolution of collagens." *Anat Rec* (2002) 268(3): 302-16.
- 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.
- Fabre, J. E., M. Nguyen, A. Latour, J. A. Keifer, L. P. Audoly, T. M. Coffman et B. H. Koller. "Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y₁-deficient mice." *Nat Med* (1999) 5(10): 1199-202.
- Falati, S., P. Gross, G. Merrill-Skoloff, B. C. Furie et B. Furie. "Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse." *Nat Med* (2002) 8(10): 1175-81.
- Falati, S., P. L. Gross, G. Merrill-Skoloff, D. Sim, R. Flaumenhaft, A. Celi, B. C. Furie et B. Furie. "In vivo models of platelet function and thrombosis: study of real-time thrombus formation." *Methods Mol Biol* (2004) 272: 187-98.
- Falati, S., Q. Liu, P. Gross, G. Merrill-Skoloff, J. Chou, E. Vandendries, A. Celi, K. Croce, B. C. Furie et B. Furie. "Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin." *J Exp Med* (2003) 197(11): 1585-98.
- Farndale, R. W., J. J. Sixma, M. J. Barnes et P. G. de Groot. "The role of collagen in thrombosis and hemostasis." *J Thromb Haemost* (2004) 2(4): 561-73.
- Farrehi, P. M., C. K. Ozaki, P. Carmeliet et W. P. Fay. "Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice." *Circulation* (1998) 97(10): 1002-8.
- Faxon, D. P., V. Fuster, P. Libby, J. A. Beckman, W. R. Hiatt, R. W. Thompson, J. N. Topper, B. H. Annex, J. H. Rundback, R. P. Fabunmi, R. M. Robertson et J. Loscalzo. "Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology." *Circulation* (2004) 109(21): 2617-25.
- Fay, W. P., J. G. Murphy et W. G. Owen. "High concentrations of active plasminogen activator inhibitor-1 in porcine coronary artery thrombi." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1996) 16(10): 1277-84.
- 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.
- Fitzgerald, G. A., C. Healy et J. Daugherty. "Thromboxane A₂ biosynthesis in human disease." *Fed Proc* (1987) 46(1): 154-8.
- Folts, J. D., E. B. Crowell, Jr. et G. G. Rowe. "Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin." *Circulation* (1976) 54(3): 365-70.
- Foster, C. J., D. M. Prosser, J. M. Agans, Y. Zhai, M. D. Smith, J. E. Lachowicz, F. L. Zhang, E. Gustafson, F. J. Monsma, Jr., M. T. Wiekowski, S. J. Abbondanzo, D. N. Cook, M. L. Bayne, S. A. Lira et M. S. Chintala. "Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs." *J Clin Invest* (2001) 107(12): 1591-8.

- Frenette, P. S., C. V. Denis, L. Weiss, K. Jurk, S. Subbarao, B. Kehrel, J. H. Hartwig, D. Vestweber et D. D. Wagner. "P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo." *J Exp Med* (2000) 191(8): 1413-22.
- Frenette, P. S., R. C. Johnson, R. O. Hynes et D. D. Wagner. "Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) 92(16): 7450-4.
- Freund, M., J. P. Cazenave, M. Courtney, E. Degryse, C. Roitsch, A. Bernat, D. Delebasse, G. Defreyn et J. P. Maffrand. "Inhibition by recombinant hirudins of experimental venous thrombosis and disseminated intravascular coagulation induced by tissue factor in rats." *Thromb Haemost* (1990) 63(2): 187-92.
- Furchgott, R. F. et J. V. Zawadzki. "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* (1980) 288(5789): 373-6.
- Fuss, C., J. C. Palmaz et E. A. Sprague. "Fibrinogen: structure, function, and surface interactions." *J Vasc Interv Radiol* (2001) 12(6): 677-82.
- Gachet, C. "Regulation of platelet functions by P2 receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2006) 46: 277-300.
- Gachet, C., M. Cattaneo, P. Ohlmann, B. Hechler, A. Lecchi, J. Chevalier, D. Cassel, P. M. Mannucci et J. P. Cazenave. "Purinoceptors on blood platelets: further pharmacological and clinical evidence to suggest the presence of two ADP receptors." *Br J Haematol* (1995) 91(2): 434-44.
- Gachet, C., J. P. Cazenave, P. Ohlmann, C. Bouloux, G. Defreyn, F. Driot et J. P. Maffrand. "The thienopyridine ticlopidine selectively prevents the inhibitory effects of ADP but not of adrenaline on cAMP levels raised by stimulation of the adenylate cyclase of human platelets by PGE1." *Biochem Pharmacol* (1990) 40(12): 2683-7.
- Gachet, C., B. Hechler, C. Leon, J.-P. Cazenave et F. Lanza. "Transgenic animals in primary hemostasis and thrombosis " *Transgenic Models in Pharmacology*. Springer Verlag (2004) 159: 509-544.
- Gachet, C., B. Hechler, C. Nonne, J. P. Cazenave, F. Lanza et B. Aleil. "Atherothrombosis: transposition of the models to the clinic and reciprocally." *Therapie* (2006a) 61(5): 389-94.
- Gachet, C., C. Leon et B. Hechler. "The platelet P2 receptors in arterial thrombosis." *Blood Cells Mol Dis* (2006b) 36(2): 223-7.
- Gay, S., L. Balleisen, K. Remberger, P. P. Fietzek, B. C. Adelman et K. Kuhn. "Immunohistochemical evidence for the presence of collagen type III in human arterial walls, arterial thrombi, and in leukocytes, incubated with collagen in vitro." *Klin Wochenschr* (1975) 53(19): 899-902.
- Giancotti, F. G. et E. Ruoslahti. "Integrin signaling." *Science* (1999) 285(5430): 1028-32.
- Giannessi, D., S. Del Ry et R. L. Vitale. "The role of endothelins and their receptors in heart failure." *Pharmacol Res* (2001) 43(2): 111-26.
- Goldsmith, H. L. et V. T. Turitto. "Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis." *Thromb Haemost* (1986) 55(3): 415-35.
- Golino, P., G. Ambrosio, I. Pascucci, M. Ragni, E. Russolillo et M. Chiariello. "Experimental carotid stenosis and endothelial injury in the rabbit: an in vivo model to study intravascular platelet aggregation." *Thromb Haemost* (1992) 67(3): 302-5.
- Golino, P., M. Ragni, P. Cirillo, D. D'Andrea, A. Scognamiglio, A. Ravera, C. Buono, M. Ezban, N. Corcione, F. Vigorito, M. Condorelli et M. Chiariello. "Antithrombotic

- effects of recombinant human, active site-blocked factor VIIa in a rabbit model of recurrent arterial thrombosis." *Circ Res* (1998) 82(1): 39-46.
- Goschnick, M. W., L. M. Lau, J. L. Wee, Y. S. Liu, P. M. Hogarth, L. M. Robb, M. J. Hickey, M. D. Wright et D. E. Jackson. "Impaired "outside-in" integrin α Ibbeta3 signaling and thrombus stability in TSSC6-deficient mice." *Blood* (2006) 108(6): 1911-8.
- Gould, W. R., S. M. Baxi, R. Schroeder, Y. W. Peng, R. J. Leadley, J. T. Peterson et L. A. Perrin. "Gas6 receptors Axl, Sky and Mer enhance platelet activation and regulate thrombotic responses." *J Thromb Haemost* (2005) 3(4): 733-41.
- Gruner, S., M. Prostredna, V. Schulte, T. Krieg, B. Eckes, C. Brakebusch et B. Nieswandt. "Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo." *Blood* (2003) 102(12): 4021-7.
- Guarini, S., C. Bazzani, A. Botticelli, A. Balugani et A. Bertolini. "Antithrombotic activity of a 2-kDa heparin fragment in an experimental model of carotid artery thrombosis in rats." *J Pharm Pharmacol* (1996) 48(4): 407-10.
- Habib, A., G. A. Fitzgerald et J. Maclouf. "Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets." *J Biol Chem* (1999) 274(5): 2645-51.
- 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.
- Hamilton, J. R., I. Cornelissen et S. R. Coughlin. "Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets." *J Thromb Haemost* (2004) 2(8): 1429-35.
- Harker, L. A., S. R. Hanson, J. N. Wilcox et A. B. Kelly. "Antithrombotic and antilesion benefits without hemorrhagic risks by inhibiting tissue factor pathway." *Haemostasis* (1996) 26 Suppl 1: 76-82.
- Hartwig, J. H. "The platelet: form and function." *Semin Hematol* (2006) 43(1 Suppl 1): S94-100.
- He, L., L. K. Pappan, D. G. Grenache, Z. Li, D. M. Tollefsen, S. A. Santoro et M. M. Zutter. "The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo." *Blood* (2003) 102(10): 3652-7.
- Hechler, B., A. Eckly, P. Ohlmann, J. P. Cazenave et C. Gachet. "The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel." *Br J Haematol* (1998a) 103(3): 858-66.
- 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.
- Hechler, B., C. Leon, C. Vial, P. Vigne, C. Frelin, J. P. Cazenave et C. Gachet. "The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation." *Blood* (1998b) 92(1): 152-9.
- Hechler, B., S. Magnenat, M. L. Zighetti, M. U. Kassack, H. Ullmann, J. P. Cazenave, R. Evans, M. Cattaneo et C. Gachet. "Inhibition of platelet functions and thrombosis through selective or nonselective inhibition of the platelet P2 receptors with increasing doses of NF449 [4,4',4",4"-((carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis-(carbonylimino)))t etrakis-benzene-1,3-disulfonic acid octasodium salt]." *J Pharmacol Exp Ther* (2005) 314(1): 232-43.
- Hechler, B., C. Nonne, E. J. Roh, M. Cattaneo, J. P. Cazenave, F. Lanza, K. A. Jacobson et C. Gachet. "MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor

- with strong antithrombotic activity in mice." *J Pharmacol Exp Ther* (2006) 316(2): 556-63.
- Heemskerk, J. W., P. R. Siljander, E. M. Bevers, R. W. Farndale et T. Lindhout. "Receptors and signalling mechanisms in the procoagulant response of platelets." *Platelets* (2000) 11(6): 301-6.
- Hemker, H. C., J. L. van Rijn, J. Rosing, G. van Dieijen, E. M. Bevers et R. F. Zwaal. "Platelet membrane involvement in blood coagulation." *Blood Cells* (1983) 9(2): 303-17.
- Henrita van Zanten, G., E. U. Saelman, K. M. Schut-Hese, Y. P. Wu, P. J. Sloomweg, H. K. Nieuwenhuis, P. G. de Groot et J. J. Sixma. "Platelet adhesion to collagen type IV under flow conditions." *Blood* (1996) 88(10): 3862-71.
- Herault, J. P., F. Dol, C. Gaich, A. Bernat et J. M. Herbert. "Effect of clopidogrel on thrombin generation in platelet-rich plasma in the rat." *Thromb Haemost* (1999) 81(6): 957-60.
- Herbert, J. M., F. Dol, A. Bernat, R. Falotico, A. Lale et P. Savi. "The antiaggregating and antithrombotic activity of clopidogrel is potentiated by aspirin in several experimental models in the rabbit." *Thromb Haemost* (1998) 80(3): 512-8.
- 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.
- Hindriks, G., M. J. Ijsseldijk, A. Sonnenberg, J. J. Sixma et P. G. de Groot. "Platelet adhesion to laminin: role of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions, shear rate, and platelet membrane glycoproteins." *Blood* (1992) 79(4): 928-35.
- Hirata, M., Y. Hayashi, F. Ushikubi, Y. Yokota, R. Kageyama, S. Nakanishi et S. Narumiya. "Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A₂ receptor." *Nature* (1991) 349(6310): 617-20.
- Hollopeter, G., H. M. Jantzen, D. Vincent, G. Li, L. England, V. Ramakrishnan, R. B. Yang, P. Nurden, A. Nurden, D. Julius et P. B. Conley. "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs." *Nature* (2001) 409(6817): 202-7.
- Holtkotter, O., B. Nieswandt, N. Smyth, W. Muller, M. Hafner, V. Schulte, T. Krieg et B. Eckes. "Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen." *J Biol Chem* (2002) 277(13): 10789-94.
- Hoylaerts, M. F., H. Yamamoto, K. Nuyts, I. Vreys, H. Deckmyn et J. Vermynen. "von Willebrand factor binds to native collagen VI primarily via its A1 domain." *Biochem J* (1997) 324 (Pt 1): 185-91.
- Huang, J., E. M. Driscoll, M. L. Gonzales, A. M. Park et B. R. Lucchesi. "Prevention of arterial thrombosis by intravenously administered platelet P2T receptor antagonist AR-C69931MX in a canine model." *J Pharmacol Exp Ther* (2000) 295(2): 492-9.
- Huber, D., E. M. Cramer, J. E. Kaufmann, P. Meda, J. M. Masse, E. K. Kruithof et U. M. Vischer. "Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo." *Blood* (2002) 99(10): 3637-45.
- Hudson, B. G., K. Tryggvason, M. Sundaramoorthy et E. G. Neilson. "Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen." *N Engl J Med* (2003) 348(25): 2543-56.
- 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.
- Humphries, J. E., B. A. Yirinec et C. E. Hess. "Atherosclerosis and unstable angina in Bernard-Soulier syndrome." *Am J Clin Pathol* (1992) 97(5): 652-5.

- Hung, D. T., Y. H. Wong, T. K. Vu et S. R. Coughlin. "The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase." *J Biol Chem* (1992) 267(29): 20831-4.
- Hungerford, J. E. et C. D. Little. "Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall." *J Vasc Res* (1999) 36(1): 2-27.
- Ichinohe, T., H. Takayama, Y. Ezumi, S. Yanagi, H. Yamamura et M. Okuma. "Cyclic AMP-insensitive activation of c-Src and Syk protein-tyrosine kinases through platelet membrane glycoprotein VI." *J Biol Chem* (1995) 270(47): 28029-36.
- Ill, C. R., E. Engvall et E. Ruoslahti. "Adhesion of platelets to laminin in the absence of activation." *J Cell Biol* (1984) 99(6): 2140-5.
- 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.
- Inoue, O., K. Suzuki-Inoue, O. J. McCarty, M. Moroi, Z. M. Ruggeri, T. J. Kunicki, Y. Ozaki et S. P. Watson. "Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI." *Blood* (2006) 107(4): 1405-12.
- Iozzo, R. V. "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." *Annu Rev Biochem* (1998) 67: 609-52.
- Isenberg, W. M., R. P. McEver, D. R. Phillips, M. A. Shuman et D. F. Bainton. "The platelet fibrinogen receptor: an immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering." *J Cell Biol* (1987) 104(6): 1655-63.
- Ishibashi, S., M. S. Brown, J. L. Goldstein, R. D. Gerard, R. E. Hammer et J. Herz. "Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery." *J Clin Invest* (1993) 92(2): 883-93.
- 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, S. P., W. S. Nesbitt et S. Kulkarni. "Signaling events underlying thrombus formation." *J Thromb Haemost* (2003) 1(7): 1602-12.
- Jackson, S. P. et S. M. Schoenwaelder. "Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'." *Nat Rev Drug Discov* (2003) 2(10): 775-89.
- Jandrot-Perrus, M., S. Busfield, A. H. Lagrue, X. Xiong, N. Debili, T. Chickering, J. P. Le Couedic, A. Goodearl, B. Dussault, C. Fraser, W. Vainchenker et J. L. Villeval. "Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily." *Blood* (2000) 96(5): 1798-807.
- Jandrot-Perrus, M., A. H. Lagrue, M. Okuma et C. Bon. "Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1." *J Biol Chem* (1997) 272(43): 27035-41.
- Janssens, R., D. Communi, S. Piroton, M. Samson, M. Parmentier et J. M. Boeynaems. "Cloning and tissue distribution of the human P2Y1 receptor." *Biochem Biophys Res Commun* (1996) 221(3): 588-93.
- Jantzen, H. M., D. S. Milstone, L. Gousset, P. B. Conley et R. M. Mortensen. "Impaired activation of murine platelets lacking G alpha(i2)." *J Clin Invest* (2001) 108(3): 477-83.
- Jarvis, G. E., B. T. Atkinson, D. C. Snell et S. P. Watson. "Distinct roles of GPVI and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens." *Br J Pharmacol* (2002) 137(1): 107-17.

- Jin, J. et S. P. Kunapuli. "Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95(14): 8070-4.
- Jirouskova, M., I. Chereshev, H. Vaananen, J. L. Degen et B. S. Coller. "Antibody blockade or mutation of the fibrinogen gamma-chain C-terminus is more effective in inhibiting murine arterial thrombus formation than complete absence of fibrinogen." *Blood* (2004) 103(6): 1995-2002.
- Johnson, G. J., T. R. Griggs et L. Badimon. "The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. On behalf of the Subcommittee on Animal, Cellular and Molecular Models of Thrombosis and Haemostasis of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis." *Thromb Haemost* (1999) 81(5): 835-43.
- Jung, S. M. et M. Moroi. "Platelets interact with soluble and insoluble collagens through characteristically different reactions." *J Biol Chem* (1998) 273(24): 14827-37.
- Jung, S. M. et M. Moroi. "Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1)." *J Biol Chem* (2000) 275(11): 8016-26.
- 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.
- Kahn, M. L., Y. W. Zheng, W. Huang, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff, R. V. Farese, Jr., C. Tam et S. R. Coughlin. "A dual thrombin receptor system for platelet activation." *Nature* (1998) 394(6694): 690-4.
- Kamata, T., W. Puzon et Y. Takada. "Identification of putative ligand binding sites within I domain of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2, CD49b/CD29)." *J Biol Chem* (1994) 269(13): 9659-63.
- 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.
- Kato, K., Y. A. Elsayed, M. Namoto, K. Nakagawa et K. Sueishi. "Enhanced expression of tissue factor activity in the atherosclerotic aortas of cholesterol-fed rabbits." *Thromb Res* (1996) 82(4): 335-47.
- Kato, K., T. Kanaji, S. Russell, T. J. Kunicki, K. Furihata, S. Kanaji, P. Marchese, A. Reininger, Z. M. Ruggeri et J. Ware. "The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion." *Blood* (2003) 102(5): 1701-7.
- Kauffmanstein, G., B. Hechler, J. P. Cazenave et C. Gachet. "Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y receptor." *J Thromb Haemost* (2004) 2(11): 1980-8.
- Kawasaki, T., T. Kaida, J. Arnout, J. Vermynen et M. F. Hoylaerts. "A new animal model of thrombophilia confirms that high plasma factor VIII levels are thrombogenic." *Thromb Haemost* (1999) 81(2): 306-11.
- Kehrel, B., L. Balleisen, R. Kokott, R. Mesters, W. Stenzinger, K. J. Clemetson et J. van de Loo. "Deficiency of intact thrombospondin and membrane glycoprotein Ia in platelets with defective collagen-induced aggregation and spontaneous loss of disorder." *Blood* (1988) 71(4): 1074-8.

- Kim, H. S., M. Ohno, B. Xu, H. O. Kim, Y. Choi, X. D. Ji, S. Maddileti, V. E. Marquez, T. K. Harden et K. A. Jacobson. "2-Substitution of adenine nucleotide analogues containing a bicyclo[3.1.0]hexane ring system locked in a northern conformation: enhanced potency as P2Y1 receptor antagonists." *J Med Chem* (2003) 46(23): 4974-87.
- Kinsella, B. T., D. J. O'Mahony et G. A. Fitzgerald. "The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha." *J Pharmacol Exp Ther* (1997) 281(2): 957-64.
- Knight, C. G., L. F. Morton, A. R. Peachey, D. S. Tuckwell, R. W. Farndale et M. J. Barnes. "The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens." *J Biol Chem* (2000) 275(1): 35-40.
- Kobayashi, T., Y. Tahara, M. Matsumoto, M. Iguchi, H. Sano, T. Murayama, H. Arai, H. Oida, T. Yurugi-Kobayashi, J. K. Yamashita, H. Katagiri, M. Majima, M. Yokode, T. Kita et S. Narumiya. "Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice." *J Clin Invest* (2004) 114(6): 784-94.
- Kobe, B. et J. Deisenhofer. "The leucine-rich repeat: a versatile binding motif." *Trends Biochem Sci* (1994) 19(10): 415-21.
- Kondo, K., Y. Suzuki, Y. Ikeda et K. Umemura. "Genistein, an isoflavone included in soy, inhibits thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation." *Eur J Pharmacol* (2002) 455(1): 53-7.
- Konstantinides, S., K. Schafer, T. Thinnies et D. J. Loskutoff. "Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice." *Circulation* (2001) 103(4): 576-83.
- Konstantinides, S., J. Ware, P. Marchese, F. Almus-Jacobs, D. J. Loskutoff et Z. M. Ruggeri. "Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Ibalpha and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis." *J Thromb Haemost* (2006) 4(9): 2014-21.
- Kordenat, R. K., P. Kezdi et D. Powley. "Experimental intracoronary thrombosis and selective in situ lysis by catheter technique." *Am J Cardiol* (1972) 30(6): 640-5.
- Kovacs, I. B. et P. Gorog. "Laser-induced thrombosis test suitable for pharmacological screening studies." *Microvasc Res* (1979) 18(3): 403-12.
- Kritzik, M., B. Savage, D. J. Nugent, S. Santoso, Z. M. Ruggeri et T. J. Kunicki. "Nucleotide polymorphisms in the alpha2 gene define multiple alleles that are associated with differences in platelet alpha2 beta1 density." *Blood* (1998) 92(7): 2382-8.
- 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.
- Kuijpers, M. J., V. Schulte, W. Bergmeier, T. Lindhout, C. Brakebusch, S. Offermanns, R. Fassler, J. W. Heemskerk et B. Nieswandt. "Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo." *Faseb J* (2003) 17(6): 685-7.
- 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.
- Kuo, H. J., C. L. Maslen, D. R. Keene et R. W. Glanville. "Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen." *J Biol Chem* (1997) 272(42): 26522-9.
- Kurz, K. D., B. W. Main et G. E. Sandusky. "Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride." *Thromb Res* (1990) 60(4): 269-80.

- Kyriakides, T. R., J. W. Tam et P. Bornstein. "Accelerated wound healing in mice with a disruption of the thrombospondin 2 gene." *J Invest Dermatol* (1999) 113(5): 782-7.
- Lanza, F. "Bernard-Soulier syndrome (Hemorrhagiparous thrombocytic dystrophy)." *Orphanet J Rare Dis* (2006) 1: 46.
- 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.
- Lau, L. M., J. L. Wee, M. D. Wright, G. W. Moseley, P. M. Hogarth, L. K. Ashman et D. E. Jackson. "The tetraspanin superfamily member CD151 regulates outside-in integrin α IIb β 3 signaling and platelet function." *Blood* (2004) 104(8): 2368-75.
- Law, D. A., F. R. DeGuzman, P. Heiser, K. Ministri-Madrid, N. Killeen et D. R. Phillips. "Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in α IIb β 3 signalling and platelet function." *Nature* (1999) 401(6755): 808-11.
- Leadley, R. J., Jr., L. Chi, S. S. Rebello et A. Gagnon. "Contribution of in vivo models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents." *J Pharmacol Toxicol Methods* (2000) 43(2): 101-16.
- Leadley, R. J., Jr., C. J. Kasiewski, J. S. Bostwick, R. Bentley, C. T. Dunwiddie et M. H. Perrone. "Inhibition of repetitive thrombus formation in the stenosed canine coronary artery by enoxaparin, but not by unfractionated heparin." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1998) 18(6): 908-14.
- Lecut, C., L. A. Feeney, G. Kingsbury, J. Hopkins, F. Lanza, C. Gachet, J. L. Villevall et M. Jandrot-Perrus. "Human platelet glycoprotein VI function is antagonized by monoclonal antibody-derived Fab fragments." *J Thromb Haemost* (2003) 1(12): 2653-62.
- Leger, A. J., L. Covic et A. Kuliopulos. "Protease-activated receptors in cardiovascular diseases." *Circulation* (2006) 114(10): 1070-7.
- Legrand, C., V. Morandi, S. Mendelovitz, H. Shaked, J. R. Hartman et A. Panet. "Selective inhibition of platelet macroaggregate formation by a recombinant heparin-binding domain of human thrombospondin." *Arterioscler Thromb* (1994) 14(11): 1784-91.
- Legrand, Y., A. Courillon, F. Fauvel et J. Bariety. "[Arterial subendothelial structures: anatomy, biochemistry, functions]." *Nouv Rev Fr Hematol* (1979) 21(4): 403-17.
- Leidy, E. M., A. M. Stern, P. A. Friedman et L. R. Bush. "Enhanced thrombolysis by a factor XIIIa inhibitor in a rabbit model of femoral artery thrombosis." *Thromb Res* (1990) 59(1): 15-26.
- Lenain, N., M. Freund, C. Leon, J. P. Cazenave et C. Gachet. "Inhibition of localized thrombosis in P2Y1-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist." *J Thromb Haemost* (2003) 1(6): 1144-9.
- Leon, C., M. Alex, A. Klocke, E. Morgenstern, C. Moosbauer, A. Eckly, M. Spannagl, C. Gachet et B. Engelmann. "Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation." *Blood* (2004) 103(2): 594-600.
- Leon, C., M. Freund, C. Ravanat, A. Baurand, J. P. Cazenave et C. Gachet. "Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist." *Circulation* (2001) 103(5): 718-23.
- Leon, C., B. Hechler, M. Freund, A. Eckly, C. Vial, P. Ohlmann, A. Dierich, M. LeMeur, J. P. Cazenave et C. Gachet. "Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice." *J Clin Invest* (1999) 104(12): 1731-7.

- Leon, C., C. Ravanat, M. Freund, J. P. Cazenave et C. Gachet. "Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2003) 23(10): 1941-7.
- Li, T. T., S. Larrucea, S. Souza, S. M. Leal, J. A. Lopez, E. M. Rubin, B. Nieswandt et P. F. Bray. "Genetic variation responsible for mouse strain differences in integrin alpha 2 expression is associated with altered platelet responses to collagen." *Blood* (2004) 103(9): 3396-402.
- Libby, P. "Atherosclerosis: the new view." *Sci Am* (2002) 286(5): 46-55.
- Lin, P. H., N. A. Chronos, M. M. Marijianowski, C. Chen, B. Conklin, R. L. Bush, A. B. Lumsden et S. R. Hanson. "Carotid stenting using heparin-coated balloon-expandable stent reduces intimal hyperplasia in a baboon model." *J Surg Res* (2003) 112(1): 84-90.
- Lindenblatt, N., M. D. Menger, E. Klar et B. Vollmar. "Sustained hypothermia accelerates microvascular thrombus formation in mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2005) 289(6): H2680-7.
- Lindenblatt, N., W. Schareck, L. Belusa, R. M. Nickels, M. D. Menger et B. Vollmar. "Anti-oxidant ebselen delays microvascular thrombus formation in the rat cremaster muscle by inhibiting platelet P-selectin expression." *Thromb Haemost* (2003) 90(5): 882-92.
- 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.
- Lowenstein, C. J., C. N. Morrell et M. Yamakuchi. "Regulation of Weibel-Palade body exocytosis." *Trends Cardiovasc Med* (2005) 15(8): 302-8.
- Luo, S. Z., X. Mo, V. Afshar-Kharghan, S. Srinivasan, J. A. Lopez et R. Li. "Glycoprotein Ibalpha forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibbeta subunits in the resting platelet." *Blood* (2007) 109(2): 603-9.
- Lusis, A. J. "Atherosclerosis." *Nature* (2000) 407(6801): 233-41.
- Lynch, J. J., Jr., J. J. Cook, G. R. Sitko, M. A. Holahan, D. R. Ramjit, M. J. Mellott, M. T. Stranieri, Stabilito, II, G. Zhang, R. J. Lynch et et al. "Nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. 5. Antithrombotic effects of MK-0383." *J Pharmacol Exp Ther* (1995) 272(1): 20-32.
- Maalej, N., H. E. Osman, D. Shanmuganayagam, R. J. Shebuski et J. D. Folts. "Antithrombotic properties of the thromboxane A2/prostaglandin H2 receptor antagonist S18886 on prevention of platelet-dependent cyclic flow reductions in dogs." *J Cardiovasc Pharmacol* (2005) 45(5): 389-95.
- MacKenzie, A. B., M. P. Mahaut-Smith et S. O. Sage. "Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets." *J Biol Chem* (1996) 271(6): 2879-81.
- Mackman, N. "Regulation of the tissue factor gene." *Thromb Haemost* (1997) 78(1): 747-54.
- Mackman, N. "Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2004) 24(6): 1015-22.
- Madri, J. A., B. Dreyer, F. A. Pitlick et H. Furthmayr. "The collagenous components of the subendothelium. Correlation of structure and function." *Lab Invest* (1980) 43(4): 303-15.
- Mahaut-Smith, M. P., S. J. Ennion, M. G. Rolf et R. J. Evans. "ADP is not an agonist at P2X(1) receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets." *Br J Pharmacol* (2000) 131(1): 108-14.

- Mahaut-Smith, M. P., G. Tolhurst et R. J. Evans. "Emerging roles for P2X1 receptors in platelet activation." *Platelets* (2004) 15(3): 131-44.
- 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* (2004a) 104(2): 420-7.
- Mangin, P., P. Ohlmann, A. Eckly, J. P. Cazenave, F. Lanza et C. Gachet. "The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented." *J Thromb Haemost* (2004b) 2(6): 969-77.
- Mangin, P., C. L. Yap, C. Nonne, S. A. Sturgeon, I. Goncalves, Y. Yuan, S. M. Schoenwaelder, C. E. Wright, F. Lanza et S. P. Jackson. "Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcRgamma deficiency." *Blood* (2006) 107(11): 4346-53.
- 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.
- Markland, F. S., G. S. Friedrichs, S. R. Pewitt et B. R. Lucchesi. "Thrombolytic effects of recombinant fibrolyase or APSAC in a canine model of carotid artery thrombosis." *Circulation* (1994) 90(5): 2448-56.
- Marmur, J. D., M. Rossikhina, A. Guha, B. Fyfe, V. Friedrich, M. Mendlowitz, Y. Nemerson et M. B. Taubman. "Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury." *J Clin Invest* (1993) 91(5): 2253-9.
- 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.
- Martini, W. Z. "The effects of hypothermia on fibrinogen metabolism and coagulation function in swine." *Metabolism* (2007) 56(2): 214-21.
- Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt et M. Gawaz. "A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation." *J Exp Med* (2002) 196(7): 887-96.
- Massberg, S., M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlhofer, U. Heinzmann et B. Nieswandt. "A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo." *J Exp Med* (2003) 197(1): 41-9.
- Massberg, S., S. Gruner, I. Konrad, M. I. Garcia Arguinzonis, M. Eigenthaler, K. Hemler, J. Kersting, C. Schulz, I. Muller, F. Besta, B. Nieswandt, U. Heinzmann, U. Walter et M. Gawaz. "Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice." *Blood* (2004a) 103(1): 136-42.
- Massberg, S., I. Konrad, A. Bultmann, C. Schulz, G. Munch, M. Peluso, M. Lorenz, S. Schneider, F. Besta, I. Muller, B. Hu, H. Langer, E. Kremmer, M. Rudelius, U. Heinzmann, M. Ungerer et M. Gawaz. "Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo." *Faseb J* (2004b) 18(2): 397-9.
- Massberg, S., K. Schurzinger, M. Lorenz, I. Konrad, C. Schulz, N. Plesnila, E. Kennerknecht, M. Rudelius, S. Sauer, S. Braun, E. Kremmer, N. R. Emambokus, J. Frampton et M. Gawaz. "Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb." *Circulation* (2005) 112(8): 1180-8.

- Matsuno, H., T. Uematsu, S. Nagashima et M. Nakashima. "Photochemically induced thrombosis model in rat femoral artery and evaluation of effects of heparin and tissue-type plasminogen activator with use of this model." *J Pharmacol Methods* (1991) 25(4): 303-17.
- 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.
- Mayadas, T. N., R. C. Johnson, H. Rayburn, R. O. Hynes et D. D. Wagner. "Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice." *Cell* (1993) 74(3): 541-54.
- 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.
- McBane, R. D., W. E. Wysokinski, J. H. Chesebro et W. G. Owen. "Antithrombotic action of endogenous porcine protein C activated with a latent porcine thrombin preparation." *Thromb Haemost* (1995) 74(3): 879-85.
- 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.
- McClanahan, T. B., G. W. Hicks, D. P. Ignasiak, R. Bousley, T. E. Mertz, P. Juneau, N. Janiczek-Dolphin, I. C. Kim et K. P. Gallagher. "The antithrombotic effects of CI-1028, an orally bioavailable direct thrombin inhibitor, in a canine model of venous and arterial thrombosis." *J Thromb Thrombolysis* (2000) 10(3): 277-84.
- McCullagh, K. G., V. C. Duance et K. A. Bishop. "The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta." *J Pathol* (1980) 130(1): 45-55.
- 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.
- Methia, N., P. Andre, C. V. Denis, M. Economopoulos et D. D. Wagner. "Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice." *Blood* (2001) 98(5): 1424-8.
- Miner, J. H. et P. D. Yurchenco. "Laminin functions in tissue morphogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* (2004) 20: 255-84.
- Mizuno, K., K. Satomura, A. Miyamoto, K. Arakawa, T. Shibuya, T. Arai, A. Kurita, H. Nakamura et J. A. Ambrose. "Angioscopic evaluation of coronary-artery thrombi in acute coronary syndromes." *N Engl J Med* (1992) 326(5): 287-91.
- Moers, A., B. Nieswandt, S. Massberg, N. Wettschureck, S. Gruner, I. Konrad, V. Schulte, B. Aktas, M. P. Gratacap, M. I. Simon, M. Gawaz et S. Offermanns. "G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis." *Nat Med* (2003) 9(11): 1418-22.
- Moncada, S. et J. R. Vane. "The role of prostacyclin in vascular tissue." *Fed Proc* (1979) 38(1): 66-71.

- Monnet, E. et F. Fauvel-Lafeve. "A new platelet receptor specific to type III collagen. Type III collagen-binding protein." *J Biol Chem* (2000) 275(15): 10912-7.
- 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.
- Moroi, M., S. M. Jung, M. Okuma et K. Shinmyozu. "A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion." *J Clin Invest* (1989) 84(5): 1440-5.
- Morton, L. F., A. R. Peachey, L. S. Zijenah, A. H. Goodall, M. J. Humphries et M. J. Barnes. "Conformation-dependent platelet adhesion to collagen involving integrin alpha 2 beta 1-mediated and other mechanisms: multiple alpha 2 beta 1-recognition sites in collagen type I." *Biochem J* (1994) 299 (Pt 3): 791-7.
- Mousa, S. A., W. F. DeGrado, D. X. Mu, R. P. Kapil, B. R. Lucchesi et T. M. Reilly. "Oral antiplatelet, antithrombotic efficacy of DMP 728, a novel platelet GPIIb/IIIa antagonist." *Circulation* (1996) 93(3): 537-43.
- Mousa, S. A., R. Kapil et D. X. Mu. "Intravenous and oral antithrombotic efficacy of the novel platelet GPIIb/IIIa antagonist roxifiban (DMP754) and its free acid form, XV459." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1999) 19(10): 2535-41.
- Muller, I., A. Klocke, M. Alex, M. Kotzsch, T. Luther, E. Morgenstern, S. Zieseniss, S. Zahler, K. Preissner et B. Engelmann. "Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets." *Faseb J* (2003) 17(3): 476-8.
- Munnix, I. C., A. Strehl, M. J. Kuijpers, J. M. Auger, P. E. van der Meijden, M. A. van Zandvoort, M. G. oude Egbrink, B. Nieswandt et J. W. Heemskerk. "The glycoprotein VI-phospholipase Cgamma2 signaling pathway controls thrombus formation induced by collagen and tissue factor in vitro and in vivo." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2005) 25(12): 2673-8.
- Nagamatsu, Y., Y. Tsujioka, M. Hashimoto, J. C. Giddings et J. Yamamoto. "The differential effects of aspirin on platelets, leucocytes and vascular endothelium in an in vivo model of thrombus formation." *Clin Lab Haematol* (1999) 21(1): 33-40.
- Nakanishi-Matsui, M., Y. W. Zheng, D. J. Sulciner, E. J. Weiss, M. J. Ludeman et S. R. Coughlin. "PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin." *Nature* (2000) 404(6778): 609-13.
- Nakashima, Y., A. S. Plump, E. W. Raines, J. L. Breslow et R. Ross. "ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree." *Arterioscler Thromb* (1994) 14(1): 133-40.
- Namba, T., Y. Sugimoto, M. Hirata, Y. Hayashi, A. Honda, A. Watabe, M. Negishi, A. Ichikawa et S. Narumiya. "Mouse thromboxane A2 receptor: cDNA cloning, expression and northern blot analysis." *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 184(3): 1197-203.
- Nawroth, P. P. et D. M. Stern. "Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor." *J Exp Med* (1986) 163(3): 740-5.
- Nesbitt, W. S., P. Mangin, H. H. Salem et S. P. Jackson. "The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis." *J Mol Med* (2006) 84(12): 989-95.
- Ni, H., C. V. Denis, S. Subbarao, J. L. Degen, T. N. Sato, R. O. Hynes et D. D. Wagner. "Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen." *J Clin Invest* (2000) 106(3): 385-92.

- Ni, H., J. M. Papalia, J. L. Degen et D. D. Wagner. "Control of thrombus embolization and fibronectin internalization by integrin alpha IIb beta 3 engagement of the fibrinogen gamma chain." *Blood* (2003a) 102(10): 3609-14.
- Ni, H., V. Ramakrishnan, Z. M. Ruggeri, J. M. Papalia, D. R. Phillips et D. D. Wagner. "Increased thrombogenesis and embolus formation in mice lacking glycoprotein V." *Blood* (2001) 98(2): 368-73.
- Ni, H., P. S. Yuen, J. M. Papalia, J. E. Trevithick, T. Sakai, R. Fassler, R. O. Hynes et D. D. Wagner. "Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003b) 100(5): 2415-9.
- Nieswandt, B., B. Aktas, A. Moers et U. J. Sachs. "Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models." *J Thromb Haemost* (2005) 3(8): 1725-36.
- Nieswandt, B., W. Bergmeier, A. Eckly, V. Schulte, P. Ohlmann, J. P. Cazenave, H. Zirngibl, S. Offermanns et C. Gachet. "Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation." *Blood* (2001a) 97(12): 3829-35.
- Nieswandt, B., C. Brakebusch, W. Bergmeier, V. Schulte, D. Bouvard, R. Mokhtari-Nejad, T. Lindhout, J. W. Heemskerk, H. Zirngibl et R. Fassler. "Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen." *Embo J* (2001b) 20(9): 2120-30.
- Nieswandt, B., V. Schulte, A. Zywiec, M. P. Gratacap et S. Offermanns. "Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets." *J Biol Chem* (2002) 277(42): 39493-8.
- Nieswandt, B. et S. P. Watson. "Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?" *Blood* (2003) 102(2): 449-61.
- Nieuwenhuis, H. K., J. W. Akkerman, W. P. Houdijk et J. J. Sixma. "Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia." *Nature* (1985) 318(6045): 470-2.
- Nigatu, A., W. Sime, G. Gorfu, T. Geberhiwot, I. Anduren, S. Ingerpuu, M. Doi, K. Tryggvason, P. Hjerdahl et M. Patarroyo. "Megakaryocytic cells synthesize and platelets secrete alpha5-laminins, and the endothelial laminin isoform laminin 10 (alpha5beta1gamma1) strongly promotes adhesion but not activation of platelets." *Thromb Haemost* (2006) 95(1): 85-93.
- Nonne, C., N. Lenain, B. Hechler, P. Mangin, J. P. Cazenave, C. Gachet et F. Lanza. "Importance of platelet phospholipase Cgamma2 signaling in arterial thrombosis as a function of lesion severity." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2005) 25(6): 1293-8.
- Nurden, A. T. "Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes." *J Thromb Haemost* (2005) 3(8): 1773-82.
- Nurden, P., P. Savi, E. Heilmann, C. Bihour, J. M. Herbert, J. P. Maffrand et A. Nurden. "An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function." *J Clin Invest* (1995) 95(4): 1612-22.
- Offermanns, S. "Activation of platelet function through G protein-coupled receptors." *Circ Res* (2006) 99(12): 1293-304.
- Offermanns, S., C. F. Toombs, Y. H. Hu et M. I. Simon. "Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice." *Nature* (1997) 389(6647): 183-6.
- Ohlmann, P., K. L. Laugwitz, B. Nurnberg, K. Spicher, G. Schultz, J. P. Cazenave et C. Gachet. "The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins." *Biochem J* (1995) 312 (Pt 3): 775-9.
- Ottani, V., D. Martini, M. Franchi, A. Ruggeri et M. Raspanti. "Hierarchical structures in fibrillar collagens." *Micron* (2002) 33(7-8): 587-96.

- oude Egbrink, M. G., G. J. Tangelder, D. W. Slaaf et R. S. Reneman. "Thromboembolic reaction following wall puncture in arterioles and venules of the rabbit mesentery." *Thromb Haemost* (1988) 59(1): 23-8.
- Panes, O., V. Matus, C. G. Saez, T. Quiroga, J. Pereira et D. Mezzano. "Human platelets synthesize and express functional tissue factor." *Blood* (2007).
- Pareti, F. I., K. Niiya, J. M. McPherson et Z. M. Ruggeri. "Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III." *J Biol Chem* (1987) 262(28): 13835-41.
- Park, H. S. et S. M. Hourani. "Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5-diphosphate (ADP) in human platelets." *Br J Pharmacol* (1999) 127(6): 1359-66.
- Parsons, T. J., D. L. Haycraft, J. C. Hoak et H. Sage. "Interaction of platelets and purified collagens in a laminar flow model." *Thromb Res* (1986) 43(4): 435-43.
- Pearson, J. D. "Endothelial cell function and thrombosis." *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* (1999) 12(3): 329-41.
- Pelletier, A. J., S. C. Bodary et A. D. Levinson. "Signal transduction by the platelet integrin alpha IIb beta 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.
- Penz, S. M., A. J. Reininger, O. Toth, H. Deckmyn, R. Brandl et W. Siess. "Glycoprotein Ibalpha inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques." *Thromb Haemost* (2007) 97(3): 435-43.
- Peters, L. L., E. M. Cheever, H. R. Ellis, P. A. Magnani, K. L. Svenson, R. Von Smith et M. A. Bogue. "Large-scale, high-throughput screening for coagulation and hematologic phenotypes in mice." *Physiol Genomics* (2002) 11(3): 185-93.
- Phillips, D. R., K. S. Prasad, J. Manganello, M. Bao et L. Nannizzi-Alaimo. "Integrin tyrosine phosphorylation in platelet signaling." *Curr Opin Cell Biol* (2001) 13(5): 546-54.
- 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.
- Polgar, J., J. M. Clemetson, B. E. Kehrel, M. Wiedemann, E. M. Magnenat, T. N. Wells et K. J. Clemetson. "Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor." *J Biol Chem* (1997) 272(21): 13576-83.
- Poole, A., J. M. Gibbins, M. Turner, M. J. van Vugt, J. G. van de Winkel, T. Saito, V. L. Tybulewicz et S. P. Watson. "The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen." *Embo J* (1997) 16(9): 2333-41.
- Poole, A. W. et S. P. Watson. "Regulation of cytosolic calcium by collagen in single human platelets." *Br J Pharmacol* (1995) 115(1): 101-6.
- 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.
- Prevost, N., D. Woulfe, M. Tognolini et L. F. Brass. "Contact-dependent signaling during the late events of platelet activation." *J Thromb Haemost* (2003) 1(7): 1613-27.
- 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.
- Ralevic, V. et G. Burnstock. "Receptors for purines and pyrimidines." *Pharmacol Rev* (1998) 50(3): 413-92.
- 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.
- Ramakrishnan, V., P. S. Reeves, F. DeGuzman, U. Deshpande, K. Ministri-Madrid, R. B. DuBridg et D. R. Phillips. "Increased thrombin responsiveness in platelets from mice lacking glycoprotein V." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96(23): 13336-41.
- Rand, J. H., Sussman, II, R. E. Gordon, S. V. Chu et V. Solomon. "Localization of factor-VIII-related antigen in human vascular subendothelium." *Blood* (1980) 55(5): 752-6.
- Rand, J. H., X. X. Wu, B. J. Potter, R. R. Uson et R. E. Gordon. "Co-localization of von Willebrand factor and type VI collagen in human vascular subendothelium." *Am J Pathol* (1993) 142(3): 843-50.
- 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.
- Rekhter, M. D. "Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough." *Cardiovasc Res* (1999) 41(2): 376-84.
- Rolf, M. G. et M. P. Mahaut-Smith. "Effects of enhanced P2X1 receptor Ca²⁺ influx on functional responses in human platelets." *Thromb Haemost* (2002) 88(3): 495-502.
- 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 counter receptor for P-selectin." *J Exp Med* (1999) 190(6): 803-14.
- Romson, J. L., D. W. Haack et B. R. Lucchesi. "Electrical induction of coronary artery thrombosis in the ambulatory canine: a model for in vivo evaluation of anti-thrombotic agents." *Thromb Res* (1980) 17(6): 841-53.
- Rosen, E. D., S. Raymond, A. Zollman, F. Noria, M. Sandoval-Cooper, A. Shulman, J. L. Merz et F. J. Castellino. "Laser-induced noninvasive vascular injury models in mice generate platelet- and coagulation-dependent thrombi." *Am J Pathol* (2001) 158(5): 1613-22.
- Rosenbloom, J., W. R. Abrams et R. Mecham. "Extracellular matrix 4: the elastic fiber." *Faseb J* (1993) 7(13): 1208-18.
- Rosenblum, W. I., S. Murata, G. H. Nelson, P. K. Werner, R. Ranken et R. C. Harmon. "Anti-CD31 delays platelet adhesion/aggregation at sites of endothelial injury in mouse cerebral arterioles." *Am J Pathol* (1994) 145(1): 33-6.
- Ross, J. M., L. V. McIntire, J. L. Moake et J. H. Rand. "Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under physiological flow conditions." *Blood* (1995) 85(7): 1826-35.
- Roux, S., J. P. Carreaux, P. Hess, L. Falivene et J. P. Clozel. "Experimental carotid thrombosis in the guinea pig." *Thromb Haemost* (1994) 71(2): 252-6.
- Ruggeri, Z. M. "Role of von Willebrand factor in platelet thrombus formation." *Ann Med* (2000) 32 Suppl 1: 2-9.
- Sadler, J. E. "Biochemistry and genetics of von Willebrand factor." *Annu Rev Biochem* (1998) 67: 395-424.
- Saelman, E. U., H. K. Nieuwenhuis, K. M. Hese, P. G. de Groot, H. F. Heijnen, E. H. Sage, S. Williams, L. McKeown, H. R. Galnick et J. J. Sixma. "Platelet adhesion to collagen

- types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin)." *Blood* (1994) 83(5): 1244-50.
- Sage, S. O., E. H. Yamoah et J. W. Heemskerk. "The roles of P(2X1) and P(2T AC) receptors in ADP-evoked calcium signalling in human platelets." *Cell Calcium* (2000) 28(2): 119-26.
- Sakariassen, K. S., P. F. Nievelstein, B. S. Coller et J. J. Sixma. "The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium." *Br J Haematol* (1986) 63(4): 681-91.
- Salazar, A. E. "Experimental myocardial infarction. Induction of coronary thrombosis in the intact closed-chest dog." *Circ Res* (1961) 9: 1351-6.
- Saller, F., L. Burnier, M. Schapira et A. Angelillo-Scherrer. "Role of the growth arrest-specific gene 6 (gas6) product in thrombus stabilization." *Blood Cells Mol Dis* (2006) 36(3): 373-8.
- Samama, C. M., P. Bonnin, M. Bonneau, G. Pignaud, E. Mazoyer, O. Bailliant, J. P. Maffrand, P. Viars, J. P. Caen et L. O. Drouet. "Comparative arterial antithrombotic activity of clopidogrel and acetyl salicylic acid in the pig." *Thromb Haemost* (1992) 68(5): 500-5.
- Sambrano, G. R., E. J. Weiss, Y. W. Zheng, W. Huang et S. R. Coughlin. "Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis." *Nature* (2001) 413(6851): 74-8.
- Saniabadi, A. R., K. Umemura, N. Matsumoto, S. Sakuma et M. Nakashima. "Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction." *Thromb Haemost* (1995) 73(5): 868-72.
- Sarratt, K. L., H. Chen, M. M. Zutter, S. A. Santoro, D. A. Hammer et M. L. Kahn. "GPVI and alpha2beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow." *Blood* (2005) 106(4): 1268-77.
- Sato, M. et N. Ohshima. "Platelet thrombus induced in vivo by filtered light and fluorescent dye in mesenteric microvessels of the rat." *Thromb Res* (1984) 35(3): 319-34.
- 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., M. H. Ginsberg et Z. M. Ruggeri. "Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow." *Blood* (1999) 94(8): 2704-15.
- Savi, P. et J. M. Herbert. "Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis." *Semin Thromb Hemost* (2005) 31(2): 174-83.
- Scase, T. J., M. F. Heath, J. M. Allen, S. O. Sage et R. J. Evans. "Identification of a P2X1 purinoceptor expressed on human platelets." *Biochem Biophys Res Commun* (1998) 242(3): 525-8.
- Schumacher, W. A., E. C. Lee et B. R. Lucchesi. "Augmentation of streptokinase-induced thrombolysis by heparin and prostacyclin." *J Cardiovasc Pharmacol* (1985) 7(4): 739-46.
- Schumacher, W. A., T. E. Steinbacher, C. L. Heran, J. R. Megill et S. K. Durham. "Effects of antithrombotic drugs in a rat model of aspirin-insensitive arterial thrombosis." *Thromb Haemost* (1993) 69(5): 509-14.
- Schwartz, H., N. D. Tolley, J. M. Foulks, M. M. Denis, B. W. Risenmay, M. Buerke, R. E. Tilley, M. T. Rondina, E. M. Harris, L. W. Kraiss, N. Mackman, G. A. Zimmerman et A. S. Weyrich. "Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets." *J Exp Med* (2006) 203(11): 2433-40.

- Shattil, S. J., H. Kashiwagi et N. Pampori. "Integrin signaling: the platelet paradigm." *Blood* (1998) 91(8): 2645-57.
- Shattil, S. J. et P. J. Newman. "Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets." *Blood* (2004) 104(6): 1606-15.
- Shimokawa, M., K. Kitaguchi, M. Kawaguchi, T. Sakamoto, M. Kakimoto et H. Furuya. "The influence of induced hypothermia for hemostatic function on temperature-adjusted measurements in rabbits." *Anesth Analg* (2003) 96(4): 1209-13, table of contents.
- 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.
- Siljander, P. et R. Lassila. "Studies of adhesion-dependent platelet activation: distinct roles for different participating receptors can be dissociated by proteolysis of collagen." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1999) 19(12): 3033-43.
- Siljander, P. R. et R. Farndale. "Platelet receptors: collagen." *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (2002): 158-170.
- Siljander, P. R., I. C. Munnix, P. A. Smethurst, H. Deckmyn, T. Lindhout, W. H. Ouwehand, R. W. Farndale et J. W. Heemskerk. "Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood." *Blood* (2004) 103(4): 1333-41.
- Simons, K. et D. Toomre. "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* (2000) 1(1): 31-9.
- Smyth, S. S., E. D. Reis, H. Vaananen, W. Zhang et B. S. Coller. "Variable protection of beta 3-integrin--deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms." *Blood* (2001) 98(4): 1055-62.
- 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.
- Speidel, C. M., P. R. Eisenberg, W. Ruf, T. S. Edgington et D. R. Abendschein. "Tissue factor mediates prolonged procoagulant activity on the luminal surface of balloon-injured aortas in rabbits." *Circulation* (1995) 92(11): 3323-30.
- Staatz, W. D., S. M. Rajpara, E. A. Wayner, W. G. Carter et S. A. Santoro. "The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen." *J Cell Biol* (1989) 108(5): 1917-24.
- Staelens, S., M. A. Hadders, S. Vauterin, C. Platteau, M. De Maeyer, K. Vanhoorelbeke, E. G. Huizinga et H. Deckmyn. "Paratope determination of the antithrombotic antibody 82D6A3 based on the crystal structure of its complex with the von Willebrand factor A3-domain." *J Biol Chem* (2006) 281(4): 2225-31.
- Stearns-Kurosawa, D. J., S. Kurosawa, J. S. Mollica, G. L. Ferrell et C. T. Esmon. "The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93(19): 10212-6.
- Strassel, C., C. Nonne, A. Eckly, T. David, C. Leon, M. Freund, J. P. Cazenave, C. Gachet et F. Lanza. "Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2007) 27(1): 241-7.
- Strong, P., R. A. Coleman et P. P. Humphrey. "Prostanoid-induced inhibition of lipolysis in rat isolated adipocytes: probable involvement of EP3 receptors." *Prostaglandins* (1992) 43(6): 559-66.
- Sturgeon, S. A., C. Jones, J. A. Angus et C. E. Wright. "Adaptation of the Folts and electrolytic methods of arterial thrombosis for the study of anti-thrombotic molecules in small animals." *J Pharmacol Toxicol Methods* (2006) 53(1): 20-9.
- Suarez, E. L. et J. H. Jacobson, 2nd. "Results of small artery endarterectomy-microsurgical technique." *Surg Forum* (1961) 12: 256-7.

- Sun, B., J. Li, K. Okahara et J. Kambayashi. "P2X1 purinoceptor in human platelets. Molecular cloning and functional characterization after heterologous expression." *J Biol Chem* (1998) 273(19): 11544-7.
- Suzuki-Inoue, K., C. E. Hughes, O. Inoue, M. Kaneko, O. Cuyun-Lira, T. Takafuta, S. P. Watson et Y. Ozaki. "Involvement of Src kinases and PLCgamma2 in clot retraction." *Thromb Res* (2006).
- Suzuki-Inoue, K., O. Inoue, J. Frampton et S. P. Watson. "Murine GPVI stimulates weak integrin activation in PLCgamma2^{-/-} platelets: involvement of PLCgamma1 and PI3-kinase." *Blood* (2003) 102(4): 1367-73.
- 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.
- 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.
- Takahashi, H. et M. Moroi. "Antibody against platelet membrane glycoprotein VI in a patient with systemic lupus erythematosus." *Am J Hematol* (2001) 67(4): 262-7.
- Tanaka, T., S. Ito, R. Higashino, Y. Fukuta, Y. Fukuda, M. Takei, T. Kurimoto et H. Tamaki. "A new thromboxane receptor antagonist, Z-335, ameliorates experimental thrombosis without prolonging the rat tail bleeding time." *Thromb Res* (1998) 91(5): 229-35.
- Thiruvikraman, S. V., A. Guha, J. Roboz, M. B. Taubman, Y. Nemerson et J. T. Fallon. "In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X." *Lab Invest* (1996) 75(4): 451-61.
- Thomas, D. W., R. B. Mannon, P. J. Mannon, A. Latour, J. A. Oliver, M. Hoffman, O. Smithies, B. H. Koller et T. M. Coffman. "Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2." *J Clin Invest* (1998) 102(11): 1994-2001.
- TIMI.IIIB. "Effects of tissue plasminogen activator and a comparison of early invasive and conservative strategies in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. Results of the TIMI IIIB Trial. Thrombolysis in Myocardial Ischemia." *Circulation* (1994) 89(4): 1545-56.
- Toti, F., N. Satta, E. Fressinaud, D. Meyer et J. M. Freyssinet. "Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder." *Blood* (1996) 87(4): 1409-15.
- Tsakiris, D. A., L. Scudder, K. Hodivala-Dilke, R. O. Hynes et B. S. Coller. "Hemostasis in the mouse (*Mus musculus*): a review." *Thromb Haemost* (1999) 81(2): 177-88.
- Tseng, M. T., A. Dozier, B. Haribabu et U. M. Graham. "Transendothelial migration of ferric ion in FeCl3 injured murine common carotid artery." *Thromb Res* (2006) 118(2): 275-80.
- Tsuji, M., Y. Ezumi, M. Arai et H. Takayama. "A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets." *J Biol Chem* (1997) 272(38): 23528-31.
- Tuckwell, D. S., K. B. Reid, M. J. Barnes et M. J. Humphries. "The A-domain of integrin alpha 2 binds specifically to a range of collagens but is not a general receptor for the collagenous motif." *Eur J Biochem* (1996) 241(3): 732-9.
- Tunggal, P., N. Smyth, M. Paulsson et M. C. Ott. "Laminins: structure and genetic regulation." *Microsc Res Tech* (2000) 51(3): 214-27.

- 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.
- Umemura, K., H. Ishihara et M. Nakashima. "Anti-platelet effects of clopidogrel in rat middle cerebral artery thrombosis model." *Thromb Res* (1995) 80(3): 209-16.
- Van de Werf, F., I. K. Jang et D. Collen. "Thrombolysis with recombinant human single-chain urokinase-type plasminogen activator (rscu-PA): dose-response in dogs with coronary artery thrombosis." *J Cardiovasc Pharmacol* (1987) 9(1): 91-3.
- van der Giessen, W. J., E. Harmsen, P. P. de Tombe, P. G. Hugenholtz et P. D. Verdouw. "Coronary thrombolysis with and without nifedipine in pigs." *Basic Res Cardiol* (1988) 83(3): 258-67.
- van Erven, L., E. Velema, A. N. Bos, M. J. Post et C. Borst. "Thrombogenicity and intimal hyperplasia after conventional and thermal balloon dilation in normal rabbit iliac arteries." *J Vasc Res* (1992) 29(6): 426-34.
- van Gestel, M. A., J. W. Heemskerk, D. W. Slaaf, V. V. Heijnen, R. S. Reneman et M. G. oude Egbrink. "In vivo blockade of platelet ADP receptor P2Y₁₂ reduces embolus and thrombus formation but not thrombus stability." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2003) 23(3): 518-23.
- van Mourik, J. A., T. Romani de Wit et J. Voorberg. "Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies." *Histochem Cell Biol* (2002) 117(2): 113-22.
- van Zanten, G. H., S. de Graaf, P. J. Slootweg, H. F. Heijnen, T. M. Connolly, P. G. de Groot et J. J. Sixma. "Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries." *J Clin Invest* (1994) 93(2): 615-32.
- Vandendries, E. R., J. R. Hamilton, S. R. Coughlin, B. Furie et B. C. Furie. "Par4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(1): 288-92.
- Vandeplassche, G., M. Bernier, F. Thone, M. Borgers, Y. Kusama et D. J. Hearse. "Singlet oxygen and myocardial injury: ultrastructural, cytochemical and electrocardiographic consequences of photoactivation of rose bengal." *J Mol Cell Cardiol* (1990) 22(3): 287-301.
- Verbeuren, T. J., S. Simonet et J. J. Descombes. "Pharmacology of S 188886 a new potent, long acting, orally active TP-receptor antagonist." *Fundam Clin Pharmacol* (1999) 13: 277.
- Vesvres, M. H., F. Doutremepuich, M. C. Lalanne et C. Doutremepuich. "Effects of aspirin on embolization in an arterial model of laser-induced thrombus formation." *Haemostasis* (1993) 23(1): 8-12.
- Vial, C., B. Hechler, C. Leon, J. P. Cazenave et C. Gachet. "Presence of P2X₁ purinoceptors in human platelets and megakaryoblastic cell lines." *Thromb Haemost* (1997) 78(6): 1500-4.
- 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.
- von der Thusen, J. H., T. J. van Berkel et E. A. Biessen. "Induction of rapid atherogenesis by perivascular carotid collar placement in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice." *Circulation* (2001) 103(8): 1164-70.
- Vu, T. K., D. T. Hung, V. I. Wheaton et S. R. Coughlin. "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation." *Cell* (1991) 64(6): 1057-68.
- Wang, K., X. Zhou, Z. Zhou, K. Tarakji, M. Carneiro, M. S. Penn, D. Murray, A. Klein, R. G. Humphries, J. Turner, J. D. Thomas, E. J. Topol et A. M. Lincoff. "Blockade of the

- platelet P2Y₁₂ receptor by AR-C69931MX sustains coronary artery recanalization and improves the myocardial tissue perfusion in a canine thrombosis model." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2003a) 23(2): 357-62.
- Wang, L., O. Ostberg, A. K. Wihlborg, H. Brogren, S. Jern et D. Erlinge. "Quantification of ADP and ATP receptor expression in human platelets." *J Thromb Haemost* (2003b) 1(2): 330-6.
- Wang, X. et L. Xu. "An optimized murine model of ferric chloride-induced arterial thrombosis for thrombosis research." *Thromb Res* (2005) 115(1-2): 95-100.
- 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 I α . Identification of the sulfated tyrosine/anionic sequence Tyr-276-Glu-282 of glycoprotein I α as a binding site for von Willebrand factor and alpha-thrombin." *Biochemistry* (1996) 35(15): 4929-38.
- Ware, J. "Dysfunctional platelet membrane receptors: from humans to mice." *Thromb Haemost* (2004) 92(3): 478-85.
- Weichert, W., V. Pauliks et H. K. Breddin. "Laser-induced thrombi in rat mesenteric vessels and antithrombotic drugs." *Haemostasis* (1983) 13(1): 61-71.
- Weiler, H. et B. H. Isermann. "Thrombomodulin." *J Thromb Haemost* (2003) 1(7): 1515-24.
- Weiss, H. J., V. T. Turitto et H. R. Baumgartner. "Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins IIb-IIIa, Ib, and storage granules." *Blood* (1986) 67(2): 322-30.
- Wessler, S. "Thrombosis in the presence of vascular stasis." *Am J Med* (1962) 33: 648-66.
- White, J. G. "An overview of platelet structural physiology." *Scanning Microsc* (1987) 1(4): 1677-700.
- Wihlborg, A. K., L. Wang, O. O. Braun, A. Eyjolfsson, R. Gustafsson, T. Gudbjartsson et D. Erlinge. "ADP receptor P2Y₁₂ is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2004) 24(10): 1810-5.
- Wilcox, J. N., K. M. Smith, S. M. Schwartz et D. Gordon. "Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989) 86(8): 2839-43.
- Williams, R. L. "Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C." *Biochim Biophys Acta* (1999) 1441(2-3): 255-67.
- 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 I α and filamin-1 is essential for glycoprotein Ib/IX receptor anchorage at high shear." *J Biol Chem* (2002) 277(3): 2151-9.
- Wootton, D. M. et D. N. Ku. "Fluid mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis." *Annu Rev Biomed Eng* (1999) 1: 299-329.
- Wu, D., M. Meiring, H. F. Kotze, H. Deckmyn et N. Cauwenberghs. "Inhibition of platelet glycoprotein Ib, glycoprotein IIb/IIIa, or both by monoclonal antibodies prevents arterial thrombosis in baboons." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2002) 22(2): 323-8.
- Wu, X. X., R. E. Gordon, R. W. Glanville, H. J. Kuo, R. R. Uson et J. H. Rand. "Morphological relationships of von Willebrand factor, type VI collagen, and fibrillin in human vascular subendothelium." *Am J Pathol* (1996) 149(1): 283-91.
- 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.

- Xu, W. F., H. Andersen, T. E. Whitmore, S. R. Presnell, D. P. Yee, A. Ching, T. Gilbert, E. W. Davie et D. C. Foster. "Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95(12): 6642-6.
- Yagisawa, H., M. Hirata, T. Kanematsu, Y. Watanabe, S. Ozaki, K. Sakuma, H. Tanaka, N. Yabuta, H. Kamata, H. Hirata et et al. "Expression and characterization of an inositol 1,4,5-trisphosphate binding domain of phosphatidylinositol-specific phospholipase C-delta 1." *J Biol Chem* (1994) 269(31): 20179-88.
- 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.
- Yamashita, T., T. Tsuji, A. Matsuoka, J. C. Giddings et J. Yamamoto. "The antithrombotic effect of synthetic low molecular weight human factor Xa inhibitor, DX-9065a, on He-Ne laser-induced thrombosis in rat mesenteric microvessels." *Thromb Res* (1997) 85(1): 45-51.
- Yao, S. K., J. McNatt, K. Cui, H. V. Anderson, J. P. Maffrand, L. M. Buja et J. T. Willerson. "Combined ADP and thromboxane A2 antagonism prevents cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries in nonhuman primates." *Circulation* (1993) 88(6): 2888-93.
- Yao, S. K., J. C. Ober, J. J. Ferguson, J. P. Maffrand, H. V. Anderson, L. M. Buja et J. T. Willerson. "Clopidogrel is more effective than aspirin as adjuvant treatment to prevent reocclusion after thrombolysis." *Am J Physiol* (1994a) 267(2 Pt 2): H488-93.
- 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* (1994b) 89(6): 2822-8.
- Yao, S. K., J. C. Ober, J. McNatt, C. R. Benedict, M. Rosolowsky, H. V. Anderson, K. Cui, J. P. Maffrand, W. B. Campbell, L. M. Buja et et al. "ADP plays an important role in mediating platelet aggregation and cyclic flow variations in vivo in stenosed and endothelium-injured canine coronary arteries." *Circ Res* (1992) 70(1): 39-48.
- Yeh, C. H., M. C. Chang, H. C. Peng et T. F. Huang. "Pharmacological characterization and antithrombotic effect of agkistin, a platelet glycoprotein Ib antagonist." *Br J Pharmacol* (2001) 132(4): 843-50.
- 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.
- Zhang, S. H., R. L. Reddick, J. A. Piedrahita et N. Maeda. "Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E." *Science* (1992) 258(5081): 468-71.
- Zhu, T., H. Zhao, J. Wu et M. F. Hoylaerts. "Three-dimensional reconstruction of thrombus formation during photochemically induced arterial and venous thrombosis." *Ann Biomed Eng* (2003) 31(5): 515-25.
- Zhu, Y., P. Carmeliet et W. P. Fay. "Plasminogen activator inhibitor-1 is a major determinant of arterial thrombolysis resistance." *Circulation* (1999) 99(23): 3050-5.