



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

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

Par

Sandra ELIAUTOU

**Signalisation déclenchée par le complexe GPIb-V-IX  
et émission de filopodes dans la plaquette sanguine**

Directeur de Thèse

**Dr. François LANZA**

**Présentée et soutenue publiquement le 30 octobre 2009**

**Membres du jury:**

Directeur de Thèse	Dr. François LANZA, Strasbourg.
Rapporteur externe	Dr. Cécile DENIS, Paris.
Rapporteur externe	Dr. Christophe LAMAZE, Paris.
Rapporteur interne	Dr. Jean-Etienne FABRE, Strasbourg.

**Unité de Recherche**

INSERM UMR\_S949

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

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

Email : [u949@efs-alsace.fr](mailto:u949@efs-alsace.fr)

**Direction de thèse :**

Dr. François Lanza

Email : [francois.lanza@efs-alsace.fr](mailto:francois.lanza@efs-alsace.fr)

## Remerciements

Que le Docteur Cécile Denis, Jean-Etienne Fabre et Christophe Lamaze reçoivent l'expression de toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie.

Je tiens à remercier le Professeur Jean-Pierre Cazenave de m'avoir accueillie au sein de l'Etablissement Français du Sang-Alsace et de m'avoir donnée les moyens de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont également au Docteur Christian Gachet, Directeur de l'Unité 949 de l'INSERM. Il a porté un regard pertinent et constructif sur mon travail.

Un grand merci au Docteur François Lanza de m'avoir accueillie dans son équipe et encadrée, pour ses nombreux conseils et pour m'avoir aidée et soutenue au cours de ce travail.

Merci à Pierre pour m'avoir fait partager ses connaissances et m'avoir aidée à réaliser ce travail.

Je remercie particulièrement Marie-Jeanne pour tout le temps consacré à m'aider et à m'expliquer les joies de la culture cellulaire et de bien d'autres techniques. Merci pour ta patience et tes conseils. Merci à Murielle pour tes conseils sur à peu près tous les sujets et de m'avoir supportée dans le pôle nord du bureau des étudiants ☺. Je n'oublierai pas le soutien que vous m'avez apportée dans les moments difficiles.

Au labo 234 : Merci à Nico, qui se veut Shiva, pour ses compliments en tout genre et sa bonne humeur (ca c'est vrai ☺). Je tiens d'ailleurs à solliciter à son égard une prime de risque pour avoir manipulé à mes côtés, et avoir survécu. Sincèrement, merci pour tes précieux conseils et ton aide dans ce travail. Merci à Sylvie de m'avoir écoutée parler et calculer pendant les manips, je suis sûre que ca va te manquer... et plus sérieusement merci pour tes conseils. Merci à Catherine pour les nombreuses doses d'anesthésiant injectées ! ainsi que ton aide au cours de ce travail.

Je tiens également à remercier l'équipe de microscopie électronique ; Jean-Yves, Fabienne et Anita pour m'avoir accueillie, conseillée et aidée au cours de ce travail. Merci également à toute l'équipe de l'animalerie pour votre aide et disponibilité.

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe U949, pour votre aide, votre disponibilité et vos conseils au cours de ces 3 années.

Merci à mes amies le beau Benoit, Laurence, Claire et Milou.

Merci également à ma famille et surtout à mes parents pour leur soutien et encouragements au cours de ces longues études.

Merci à mes deux compagnons de route Mica et Loona qui ont été là pour moi, au quotidien. Merci à toi Mica pour ta patience et le bonheur que tu m'apportes jour après jour. Ce travail n'aurait pu voir li jour sans ton soutien.

Et je ne pourrais finir ses remerciements sans parler de mes invités de dernière minute, les asticots, qui m'ont beaucoup aidé à la rédaction de cette thèse ! ☺





# **Sommaire**



<b>I) Figures et abréviations</b>	<b>15</b>
<b>II) Revue bibliographique</b>	<b>23</b>
<b>A) Changements morphologiques plaquettaires :</b>	<b>24</b>
<b>1) Forme discoïde des plaquettes au repos : rôle du cytosquelette</b>	<b>24</b>
<b>1.1 Les microtubules</b>	<b>24</b>
<b>1.2 Rôle du cytosquelette d'actine</b>	<b>27</b>
1.2.1 Cytosquelette intracellulaire	29
1.2.2 Cytosquelette sous-membranaire	29
<b>2) Changements morphologiques lors de l'activation plaquettaire</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Réarrangement du cytosquelette d'actine</b>	<b>31</b>
<b>2.2 Filopodes</b>	<b>35</b>
2.2.1 Activation par les agonistes solubles	35
2.2.2 Activation au contact d'une protéine adhésive	36
<b>2.3 Lamellipodes et étalement</b>	<b>37</b>
<b>2.4 Contraction et transition disque-sphère</b>	<b>39</b>
2.4.1 Rôle du complexe acto-myosine	39
2.4.2 Rôle des microtubules	41
<b>2.5 Rôles dans l'hémostase</b>	<b>43</b>
<b>B) Signalisation via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire</b>	<b>44</b>
<b>1) Structure du complexe GPIb-V-IX</b>	<b>44</b>
<b>2) Ligands</b>	<b>46</b>
2.1 Le Facteur Willebrand	46
2.2 La thrombine	47
2.3 Autres ligands	48
<b>3) Partenaires intracellulaires</b>	<b>49</b>
<b>4) Signalisation en réponse au FW</b>	<b>51</b>
4.1 GPIb-V-IX est plus qu'un récepteur d'adhésion	51
4.2 Signalisation GPIb-V-IX spécifique	52
4.3 Signalisation en condition d'adhésion	53
4.4 Signalisation en condition d'agrégation	54
4.5 Signalisation GPIb-V-IX et activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$	54
<b>C) Mécanismes conduisant à l'émission de filopodes</b>	<b>55</b>
<b>1) Dans la plaquette</b>	<b>55</b>
<b>2) Dans d'autres types cellulaires</b>	<b>56</b>
2.1 Mécanismes généraux	56
2.2 Protéines impliquées	60
2.2.1 Kinases	60
2.2.2 GTPases	61
2.2.3 Ena/VASP	63
<b>III) But du travail et approches expérimentales</b>	<b>69</b>
<b>IV) Matériel et Méthodes :</b>	<b>75</b>

<b>A) Matériel</b>	<b>75</b>
<b>B) Etudes plaquettaires</b>	<b>77</b>
1) Inhibiteurs	77
2) Modèles murins	77
3) Prélèvement et lavage des plaquettes	79
4) Activation en suspension	80
5) Agrégation	80
6) Cytométrie de flux (FACS)	80
7) Temps de saignement	81
8) Thrombose après lésion au FeCl <sub>3</sub>	81
9) Immunoprécipitation et immunoempreinte	82
<b>C) Lignées cellulaires</b>	<b>83</b>
1) Transfection du complexe GPIb-IX dans les cellules HEK	83
2) shRNA	83
2.1 Transfection stable des shRNA	83
2.2 Lysats cellulaires et immunoempreinte	84
<b>D) Adhésion statique</b>	<b>84</b>
<b>E) Microscopie</b>	<b>85</b>
1) Contraste Interférentiel Différentiel	85
2) Microscopie Confocale	85
3) Microscopie électronique à balayage	85
<b>F) Analyse statistique</b>	<b>86</b>
<b>V) Résultats expérimentaux :</b>	<b>89</b>
<b>A) Systèmes d'étude du changement de forme</b>	<b>89</b>
<b>B) Rôle des Kinases</b>	<b>101</b>
<b>1) Tyrosine kinases :</b>	<b>102</b>
<b>1.1 Src kinase : Lyn</b>	<b>102</b>
1.1.1 Etude des souris Lyn <sup>-/-</sup>	103
a) Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante	103
b) Etude d'autres fonctions plaquettaires et de la thrombose	105
1.1.2 Etude des souris Lyn <sup>up/up</sup>	111
a) Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante	112
b) Etude d'autres fonctions plaquettaires, de l'hémostase et de la thrombose	113
1.1.3 Conclusion	119
<b>1.2 Tec kinase : Btk</b>	<b>120</b>
1.2.1 Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante	121
1.2.2 Etude de l'activation après adhésion sur fibrinogène	124
1.2.3 Conclusion	125
<b>2) Sérine thréonine kinase : PKCδ</b>	<b>126</b>
2.1 Effet du Rottlerin sur les plaquettes non activées et en réponse au collagène	127
2.2 Effet du Rottlerin sur l'émission de filopodes	128

<b>2.3 Conclusion</b>	<b>129</b>
<b>C) Rôle des GTPases</b>	<b>129</b>
<b>1) Rho GTPases</b>	<b>130</b>
<b>1.1 Cdc42</b>	<b>130</b>
1.1.1 Effets de la Secramine A	130
1.1.2 Etude des souris Cdc42 <sup>-/-</sup>	132
1.1.3 Etude de l'adhésion sur fibrinogène	134
1.1.4 Evaluation de l'interaction entre Cdc42 et le complexe GPIb-V-IX	135
1.1.5 Annexe 1 : Increased granule secretion and accelerated thrombus formation in mice lacking Cdc42 in platelets	137
1.1.6 Conclusion	173
<b>1.2 Rac1</b>	<b>175</b>
1.2.1 Effet de NSC23766	175
1.2.2 Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante	176
1.2.3 Conclusion	180
<b>1.3 RhoA</b>	<b>180</b>
1.3.1 Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante	180
1.3.2 Conclusion	182
<b>2) Ras GTPase : RalA</b>	<b>182</b>
2.1 Développement d'une lignée HEK exprimant le complexe GPIb-IX	182
2.2 Etude de l'émission de filopodes en présence de shRNA de RalA	186
2.2.1 Obtention d'une lignée HEKGPIb-IX/RalA-	186
2.2.2 Effet de l'absence de RalA sur l'émission de filopodes	187
2.3 Conclusion	189
<b>D) Famille Ena/VASP : Rôle de VASP</b>	<b>189</b>
<b>1) Etude de l'émission de filopodes plaquettaire</b>	<b>190</b>
1.1 Annexe 2: Normal filopodia extension in VASP-deficient platelets upon activation by adhesive matrices or soluble agonists	190
1.2 Résultats supplémentaires	196
<b>2) Rôle dans l'activation plaquettaire</b>	<b>198</b>
<b>3) Conclusion</b>	<b>201</b>
<b>E) Rôle de la Myosine IIA</b>	<b>202</b>
<b>1) Activation en suspension en réponse à l'ADP</b>	<b>203</b>
<b>2) Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante</b>	<b>204</b>
<b>3) Etude des changements morphologiques après adhésion sur fibrinogène</b>	<b>205</b>
<b>4) Conclusion</b>	<b>207</b>
<b>VI) Discussion et perspectives</b>	<b>211</b>
<b>VII) Références</b>	<b>225</b>



## **Figures et Abréviations**



## **I) Figures et abréviations**

### **Figures**

<b><u>Figure 1</u></b> Changements morphologiques d'une plaquette humaine mise au contact d'une surface recouverte de protéines adhésives	<b>12</b>
<b><u>Figure 2</u></b> Réseau sous-membranaire de microtubules d'une plaquette au repos	<b>13</b>
<b><u>Figure 3</u></b> Organisation du réseau de microtubules plaquettaires	<b>14</b>
<b><u>Figure 4</u></b> Cytosquelette d'actine d'une plaquette au repos	<b>15</b>
<b><u>Figure 5</u></b> Cytosquelettes sous-membranaire et intracellulaire	<b>16</b>
<b><u>Figure 6</u></b> Changements morphologiques observés lors de l'activation des plaquettes en suspension par des agonistes solubles et lors de l'adhésion sur une surface recouverte de protéines adhésives	<b>19</b>
<b><u>Figure 7</u></b> Cytosquelette d'actine d'une plaquette adhérente	<b>20</b>
<b><u>Figure 8</u></b> Réarrangement du cytosquelette d'actine après activation plaquettaire	<b>21</b>
<b><u>Figure 9</u></b> Filopodes plaquettaires	<b>23</b>
<b><u>Figure 10</u></b> Lamellipodes plaquettaires	<b>25</b>
<b><u>Figure 11</u></b> Fibres de stress plaquettaires	<b>27</b>
<b><u>Figure 12</u></b> Structure de la Myosine conventionnelle IIA non musculaire	<b>28</b>
<b><u>Figure 13</u></b> Activité contractile de la myosine après interaction avec les filaments d'actine F : formation du complexe acto-myosine	<b>29</b>
<b><u>Figure 14</u></b> Microtubules plaquettaires	<b>30</b>
<b><u>Figure 15</u></b> Centralisation des granules	<b>30</b>
<b><u>Figure 16</u></b> Rôle du complexe GPIb-V-IX dans l'adhésion et l'activation des plaquettes au site de lésion vasculaire	<b>32</b>
<b><u>Figure 17</u></b> Représentation schématique du complexe GPIb-V-IX	<b>33</b>
<b><u>Figure 18</u></b> Partenaires intracellulaires directs et indirects du complexe GPIb-V-IX	<b>37</b>
<b><u>Figure 19</u></b> Signalisation déclenchée par l'interaction du FW avec le complexe GPIb-V-IX menant à l'émission de filopodes	<b>41</b>
<b><u>Figure 20</u></b> Formation de filopodes : modèle de l'élongation convergente	<b>45</b>
<b><u>Figure 21</u></b> Formation de filopodes : modèle de nucléation « de novo » des filaments d'actine	<b>46</b>
<b><u>Figure 22</u></b> Formation de filopodes : évolution du modèle d'élongation convergente	<b>47</b>

<b><u>Figure 23</u></b> Protéines impliquées dans l'émission de filopodes dans différents types cellulaires	<b>48</b>
<b><u>Figure 24</u></b> a) Cycle d'activation des GTPases ; b) Implication de Cdc42 dans l'émission de filopodes	<b>49</b>
<b><u>Figure 25</u></b> a) Différents modes d'activation de RalA ; b) Cdc42 et RalA dans l'émission de filopodes	<b>51</b>
<b><u>Figure 26</u></b> Implication et régulation de VASP dans l'émission de filopodes	<b>52</b>
<b><u>Figure 27</u></b> Régulation de la phosphorylation de VASP dans la plaquette et rôle de VASP dans l'activation plaquettaire	<b>53</b>
<b><u>Figure 28</u></b> Changements morphologiques de plaquettes humaines et murines	<b>78</b>
<b><u>Figure 29</u></b> Système d'adhésion sur FW adapté aux plaquettes murines	<b>79</b>
<b><u>Figure 30</u></b> Système d'adhésion après immunocapture de FWm selon la méthode de la figure 29	<b>80</b>
<b><u>Figure 31</u></b> Adhésion et activation des plaquettes de souris sur une surface recouverte de FW humain ou murin	<b>83</b>
<b><u>Figure 32</u></b> L'adhésion des plaquettes de souris sur FWm est dépendante du complexe GPIb-V-IX	<b>85</b>
<b><u>Figure 33</u></b> Effet d'inhibiteurs de src-kinase et de PLC sur l'émission de filopodes de plaquettes murines adhérant sur une surface recouverte de FW murin	<b>87</b>
<b><u>Figure 34</u></b> Récapitulatif des techniques d'adhésion utilisées en fonction des protéines adhésives et de l'origine des plaquettes	<b>87</b>
<b><u>Figure 35</u></b> Rôle potentiel des kinases Lyn, Btk et PKC $\delta$ dans la signalisation GPIb-V-IX	<b>90</b>
<b><u>Figure 36</u></b> Etude de l'émission de filopodes dans la lignée de souris Lyn <sup>-/-</sup>	<b>93</b>
<b><u>Figure 37</u></b> Changements morphologiques des plaquettes Lyn <sup>-/-</sup> après adhésion sur fibrinogène	<b>94</b>
<b><u>Figure 38</u></b> Effet de l'absence de Lyn sur l'exposition de P-sélectine, l'agrégation et la liaison de fibrinogène	<b>97</b>
<b><u>Figure 39</u></b> Effet de l'absence de Lyn sur la thrombose artérielle	<b>99</b>
<b><u>Figure 40</u></b> Effet de l'expression de Lyn constitutivement active (Lyn <sup>up/up</sup> ) sur l'émission de filopodes après adhésion des plaquettes sur FW	<b>101</b>
<b><u>Figure 41</u></b> Changements morphologiques des plaquettes de souris Lyn <sup>up/up</sup> après adhésion sur fibrinogène	<b>103</b>
<b><u>Figure 42</u></b> Effet de l'activation constitutive de Lyn sur l'exposition de P-sélectine et la liaison du fibrinogène	<b>105</b>
<b><u>Figure 43</u></b> Effet d'une augmentation de l'activité kinase de Lyn sur le temps de saignement et la thrombose artérielle	<b>107</b>
<b><u>Figure 44</u></b> Etude du rôle de Btk dans l'émission de filopodes après adhésion sur FW	<b>111</b>

<b><u>Figure 45</u></b> Changements morphologiques des plaquettes de souris CBA/CaHN Btk <sup>Xid</sup> après adhésion sur fibrinogène	<b>113</b>
<b><u>Figure 46</u></b> Rottlerin : inhibiteur pharmacologique de PKC $\delta$	<b>114</b>
<b><u>Figure 47</u></b> Effet du Rottlerin sur les plaquettes humaines au repos ou activées par le collagène	<b>115</b>
<b><u>Figure 48</u></b> Effet du Rottlerin sur les changements morphologiques des plaquettes humaines adhérant sur FW ou fibrinogène	<b>116</b>
<b><u>Figure 49</u></b> Rôle potentiel des GTPases Cdc42, Rac1, RhoA et RalA dans l'émission de filopodes en aval de la signalisation GPIb-V-IX	<b>118</b>
<b><u>Figure 50</u></b> Secramine A : inhibiteur pharmacologique de Cdc42	<b>119</b>
<b><u>Figure 51</u></b> Effet de la Secramine A sur les plaquettes humaines au repos ou qui ont adhéré sur FW	<b>120</b>
<b><u>Figure 52</u></b> Etude de l'émission de filopodes dépendante du complexe GPIb-V-IX dans la lignée de souris Cdc42 <sup>-/-</sup>	<b>121</b>
<b><u>Figure 53</u></b> Etude des changements morphologiques des plaquettes Cdc42 <sup>-/-</sup> lors de l'adhésion sur fibrinogène	<b>123</b>
<b><u>Figure 54</u></b> Etude de l'interaction entre Cdc42 et le complexe GPIb-V-IX ou ses partenaires intracellulaires (filamine A et 14-3-3)	<b>124</b>
<b><u>Figure 55</u></b> NSC23766 : inhibiteur pharmacologique de Rac1	<b>163</b>
<b><u>Figure 56</u></b> Effet de l'inhibiteur de Rac1, NSC23766, sur les plaquettes non activées ou qui adhèrent sur fibrinogène	<b>164</b>
<b><u>Figure 57</u></b> Effet de l'inhibiteur de Rac1, NSC23766, sur l'émission de filopodes et l'étalement après adhésion sur FW	<b>165</b>
<b><u>Figure 58</u></b> Effet de l'absence de Rac1 sur l'émission de filopodes après adhésion des plaquettes sur FW	<b>167</b>
<b><u>Figure 59</u></b> Effet de l'absence simultanée de Cdc42 et Rac1 sur l'émission de filopodes après adhésion des plaquettes sur FW	<b>167</b>
<b><u>Figure 60</u></b> Effet de l'absence de RhoA sur l'émission de filopodes après adhésion des plaquettes sur FW	<b>169</b>
<b><u>Figure 61</u></b> Mesure de l'expression de GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ et GPIX dans les cellules HEK <sup>GPIb-IX</sup> par cytométrie de flux	<b>171</b>
<b><u>Figure 62</u></b> Adhésion des cellules HEK <sup>GPIb-IX</sup> sur FW	<b>172</b>
<b><u>Figure 63</u></b> Adhésion des cellules HEK <sup>GPIb-IX</sup> en présence d'un anticorps bloquant l'interaction FW / GPIb-V-IX	<b>173</b>
<b><u>Figure 64</u></b> Adhésion des cellules HEK <sup>GPIb-IX</sup> en présence de l'inhibiteur des src kinases PP2	<b>174</b>
<b><u>Figure 65</u></b> Inhibition de l'expression de RalA dans les cellules HEK <sup>GPIb-IX</sup> transfectées par un shRNA RalA	<b>175</b>

<b><u>Figure 66</u></b> Effet de l'absence de RalA sur l'adhésion et l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendantes	<b>176</b>
<b><u>Figure 67</u></b> Rôle potentiel de VASP dans la signalisation GPIb-V-IX	<b>178</b>
<b><u>Figure 68</u></b> Effet de l'absence de VASP sur l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante à différents temps d'adhésion sur FW	<b>183</b>
<b><u>Figure 69</u></b> Effet de l'absence de VASP sur l'émission de filopodes et l'étalement des plaquettes sur fibrinogène après stimulation par l'ADP ou la thrombine	<b>184</b>
<b><u>Figure 70</u></b> Effet de l'absence de VASP sur la liaison de fibrinogène, l'activation de l'intégrine $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et l'exposition de P-sélectine	<b>186</b>
<b><u>Figure 71</u></b> Effet de l'absence de VASP sur l'agrégation des plaquettes en réponse au collagène en présence d'agents qui augmentent le taux d'AMPc ou de GMPc	<b>189</b>
<b><u>Figure 72</u></b> Effet de l'absence de Myosine IIA sur l'émission de filopodes après activation en suspension par l'ADP	<b>191</b>
<b><u>Figure 73</u></b> Effet de l'absence de Myosine IIA sur l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante	<b>192</b>
<b><u>Figure 74</u></b> Effet de l'absence de Myosine IIA sur les changements morphologiques des plaquettes après adhésion sur fibrinogène	<b>195</b>
<b><u>Figure 75</u></b> Mécanismes possibles de l'activation et de l'implication de Cdc42 dans la signalisation GPIb-V-IX	<b>205</b>
<b><u>Figure 76</u></b> Schéma récapitulatif des protéines évaluées et leur implication dans l'émission de filopodes GPIb dépendante	<b>208</b>

## **Annexes (publications)**

<b><u>Annexe 1</u></b> Increased granule secretion and accelerated thrombus formation in mice lacking Cdc42 in platelets	<b>125</b>
<b><u>Annexe 2</u></b> Normal filopodia extension in VASP-deficient platelets upon activation by adhesive matrices or soluble agonists	<b>179</b>

## Abréviations

ABD	Actin Binding Domain
ADF	Actin Depolymerisation Factor
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
AMPc	Adénosine-3',5'-monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Bovine serum albumin
BHK	Baby Hamster Kidney
CHO	Cellules d'ovaires de hamster
CRP	Collagen related peptide
DAG	Diacylglycérol
DMEM	Dulbecco's modified essential media
EB3-GFP	End-Binding protein 3 liée à la GFP
ECL	Enhanced Chemiluminescence
FAK	Focal Adhesion Kinase
Fg	Fibrinogène
FW	Facteur Willebrand
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanosine 5'-DiPhosphate
GDI	Guanosine Dissociation Inhibitor
GEF	Guanosine Exchange Factor
GDF	GDI Displacement Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GMPc	Guanosine 5'-MonoPhosphate cyclique
GTP	Guanosine-TriPhosphate
GP	Glycoprotéine
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobuline
IP <sub>3</sub>	Inositol Triphosphate
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
KO	Knock out
KI	Knock in

LAT	Linker of Activation of T cells
LR	Élément répété riche en Leucine
MAP	Microtubule Associated Protein
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
MT	Microtubule
NO	Monoxyde d'azote
PAR	Protease Activated Receptor
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandine E1
PGI <sub>2</sub>	Prostacycline
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques
RTK	Récepteur à Tyrosine Kinase
SDS	Sodium dodécylsulfate
SH(2 ou 3)	Domaine d'homologie à src (2 ou 3)
SHIP	SH2 domain-containing Inositol-5-Phosphatase
TRAP	Thrombin Receptor Activating Peptide
TxA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
VASP	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
γR <sub>Fc</sub>	Chaîne gamma des récepteurs Fc

# **Revue Bibliographique**



## **II) Revue bibliographique**

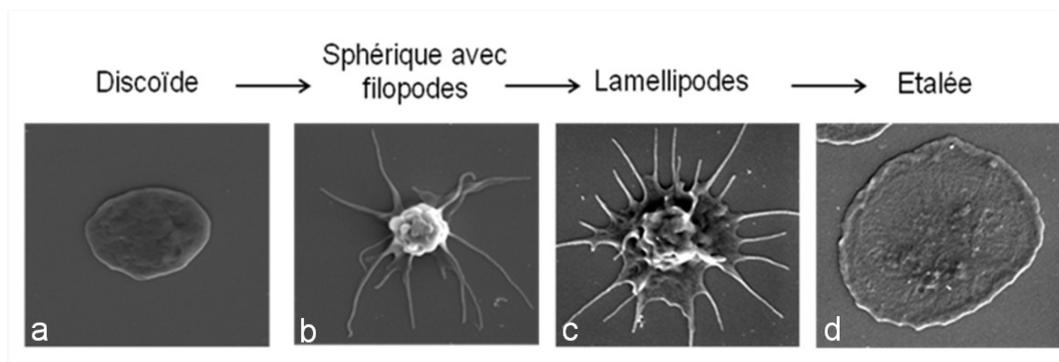
L'hémostase est un processus physiologique qui contribue au maintien de l'intégrité vasculaire. Trois étapes la caractérisent : l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse. L'hémostase primaire est la première étape du processus de réparation tissulaire lors d'une lésion de la paroi vasculaire. Elle permet la constriction du vaisseau lésé et la formation d'un clou plaquettaire qui obstrue la brèche vasculaire. L'activation du système de la coagulation entraîne la formation d'un réseau de fibrine permettant de consolider le thrombus plaquettaire. Enfin, la fibrinolyse permet de rétablir une circulation sanguine normale en dissolvant le thrombus fibrino-plaquettaire (B.Boneu et J.P Cazenave).

Lors d'une lésion vasculaire, les plaquettes non activées circulantes adhèrent au sous-endothélium qui expose notamment deux protéines adhésives : le Facteur Willebrand (FW) et le collagène. Dans des conditions de flux sanguin élevé, rencontré dans la microcirculation ou les artères, les plaquettes sont capturées et ralenties grâce à l'interaction du complexe GPIb-V-IX plaquettaire avec le FW. Les plaquettes s'activent et changent de forme. Elles passent d'un état discoïde à sphérique avec émission de filopodes. Les plaquettes activées adhèrent de manière stable, forment des lamellipodes et s'étalent par liaison du FW avec l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  et du collagène avec les récepteurs GPVI et intégrine  $\alpha 2\beta 1$ . Les plaquettes activées sécrètent des agonistes solubles tels que l'ADP et le Thromboxane A2 qui amplifient la réponse et permettent la croissance de l'agrégat plaquettaire par liaison du fibrinogène avec l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  activée. Dans des conditions de flux sanguin plus faible, rencontrées dans les grandes artères et les veines, l'adhésion des plaquettes peut être assurée efficacement par le collagène et ses récepteurs.

Les grandes fonctions plaquettaires nécessaires à l'hémostase primaire sont donc : l'adhésion, la sécrétion et l'agrégation. Plusieurs de ces étapes s'accompagnent également de changements morphologiques des plaquettes.

## A) Changements morphologiques plaquettaires :

Dans des conditions normales, les plaquettes sont dans un état non activé et circulent sous forme discoïde. L'endothélium vasculaire participe à cette inactivation en libérant dans la circulation des agents vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote et la prostacycline. Ces composés augmentent respectivement les taux intracellulaires de GMPc et d'AMPc et inhibent l'activation plaquettaire. La forme discoïde est en grande partie assurée par un réseau circonférentiel de microtubules situé sous la membrane plasmique (Figure 2). Les plaquettes activées au contact d'agonistes solubles ou de protéines adhésives subissent différents types de changements morphologiques. Une étape initiale est le passage à une forme globalement sphérique avec formation d'extensions membranaires appelées filopodes. Au contact d'une surface, peuvent se développer des feuillettes membranaires appelés lamellipodes pouvant aboutir à l'étalement complet des plaquettes (Figure 1). Chacun de ces changements morphologiques nécessite une réorganisation importante du cytosquelette d'actine faisant intervenir des effecteurs moléculaires plus ou moins spécifiques de certaines voies d'activation (cf Chapitre I C 1)).

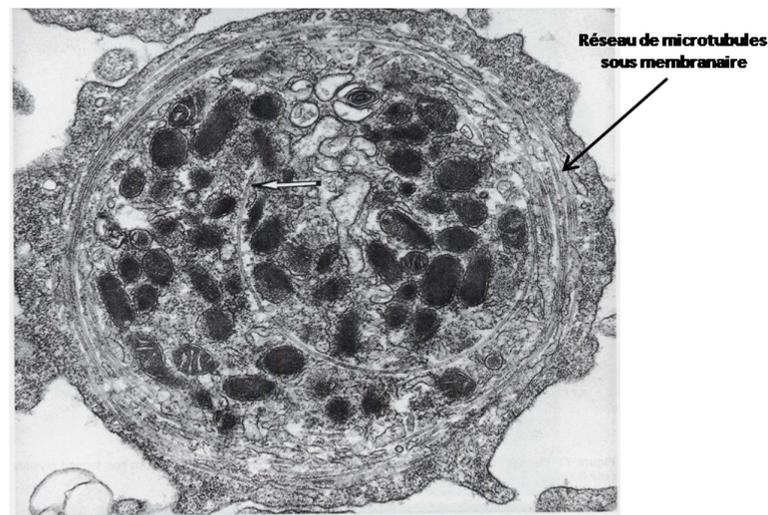


**Figure 1** Changements morphologiques d'une plaquette humaine mise au contact d'une surface recouverte de protéines adhésives. Des plaquettes humaines lavées ont été mises à adhérer sur du fibrinogène durant 30 min (b-d), fixées au glutaraldéhyde 2,5 % et observées au microscope électronique à balayage. (Anita Eckly, U949, Strasbourg)

### 1) Forme discoïde des plaquettes au repos : rôle du cytosquelette

#### 1.1 Les microtubules

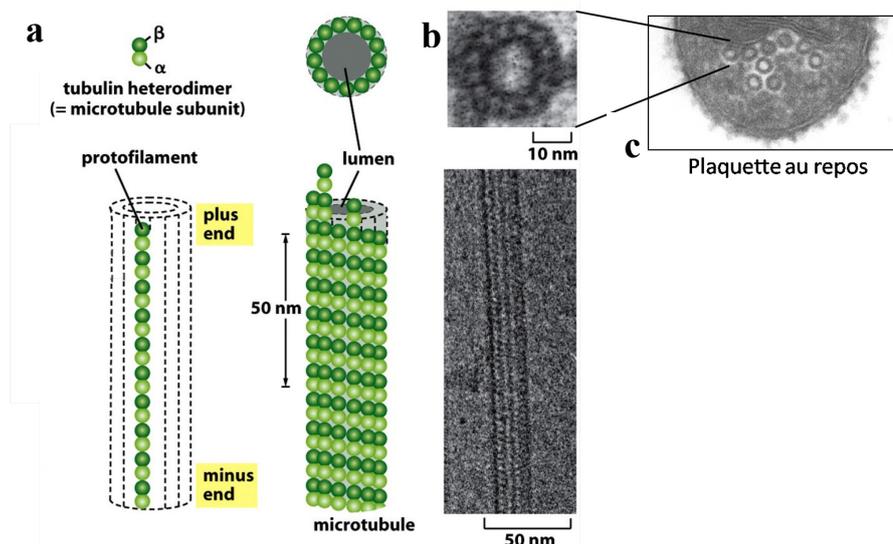
La forme discoïde des plaquettes au repos dépend en grande partie d'un réseau circulaire de microtubules sous-membranaires formant 8 à 12 tours sur lui-même (Figure 2). Deux modèles ont été proposés: le premier propose l'existence d'un seul microtubule enroulé plusieurs fois sur lui-même (Behnke and Zelandar, 1967; Nachmias, 1980; White, 1968), le deuxième propose l'association de plusieurs microtubules associés à un microtubule enroulé sur lui-même (Patel-Hett et al., 2008). Ces deux modèles dérivent d'observations microscopiques de plaquettes fixées et perméabilisées. Le deuxième s'appuie également sur l'observation cinématographique (temps-réel) de plaquettes exprimant la protéine EB3-GFP (End-binding protein 3) qui indique que ce réseau est très dynamique et en constante polymérisation et dépolymérisation (Patel-Hett et al., 2008).



**Figure 2 Réseau sous-membranaire de microtubules d'une plaquette au repos.** Observation par microscopie électronique à transmission d'une plaquette en coupe sagittale. Flèche blanche : microtubules (livre Atlas of Blood Cells)

Les microtubules sont constitués de protofilaments formés par l'assemblage d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . Les protofilaments sont linéaires et associés de façon parallèle au nombre de 13 pour former un tube creux caractéristique (Figure 3). Dans les plaquettes, la tubuline  $\beta$ 1 est majoritaire et 60 % de la tubuline est sous forme polymérisée. Le rôle du réseau de microtubules dans le maintien de la forme discoïde des plaquettes a été mis en évidence dans plusieurs études. Très tôt il avait été montré que la colchicine, un agent déstabilisant les microtubules, entraînait le passage à une forme

sphérique des plaquettes au repos (Menche et al., 1980; White, 1968). Plus récemment, il a été montré que les souris déficientes pour la tubuline  $\beta 1$  (Italiano et al., 2003) ou que des patients présentant un polymorphisme Q43P de la tubuline  $\beta 1$  (Freson et al., 2005) présentaient des plaquettes sphériques au repos. Ces défauts ont des conséquences fonctionnelles. Le traitement par la colchicine entraîne une diminution de la sécrétion et de l'agrégation (Menche et al., 1980). Dans la déficience en tubuline  $\beta 1$ , où subsiste un réseau minimal de 2 à 3 tours de microtubules, les plaquettes agrègent et sécrètent normalement et sont capables de former normalement des agrégats *in vivo*. Ces résultats suggèrent que la forme discoïde des plaquettes ne serait pas absolument requise pour assurer une hémostase primaire normale. Cependant, il est envisageable que la forme discoïde des plaquettes offre une géométrie facilitant leur contact avec la paroi vasculaire lésée (Mody and King, 2007).



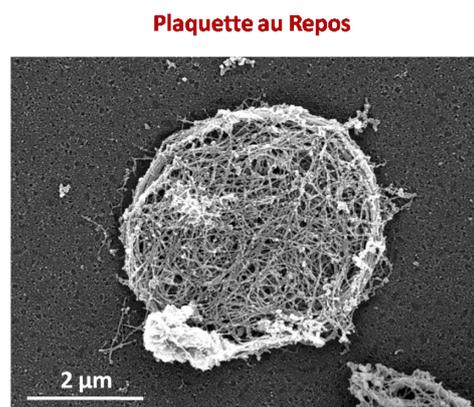
**Figure 3** Organisation du réseau de microtubules plaquettaires a) schéma d'un microtubule composé de plusieurs protofilaments associés de façon parallèle ; b) images de microscopie électronique à transmission d'un microtubule et des protofilaments c) du réseau de microtubule sous membranaire d'une plaquette discoïde au repos (The Cell 5eme édition et Anita Eckly, U949 Strasbourg)

Les protofilaments des microtubules s'organisent de manière dynamique avec une extrémité positive de polymérisation et une extrémité négative de dépolymérisation. Des plaquettes exprimant la protéine EB3-GFP, qui marque les extrémités positives de polymérisation, ont permis de visualiser plusieurs foyers de polymérisation allant dans des sens opposés (Patel-Hett et al., 2008). Il existe également des régions stables qui ne subissent pas de polymérisation ni de dépolymérisation et qui

pourraient correspondre au microtubule seul enroulé plusieurs fois sur lui-même. Plusieurs protéines participent à la stabilisation des protofilaments dont les protéines de la famille MAP (microtubule-associated proteins) comme MAP2 qui participe à l'extension de longs filaments moins dynamiques. D'autres protéines, possédant des propriétés motrices, comme la kinésine et la dynéine, entraînent plutôt la formation de filaments courts et plus dynamiques. Ces deux protéines se déplacent le long des filaments par un mécanisme ATP-dépendant. Elles jouent un rôle particulier dans la biogénèse des plaquettes lors des étapes finales de la mégacaryocytopoïèse. Lors de ses déplacements, la kinésine participe au transport des organelles (mitochondries, granules  $\alpha$ ...) le long des proplaquettes et vers leurs extrémités qui sont les futures plaquettes (Patel et al., 2005). La dynéine se déplace vers les extrémités négatives et fait glisser un second microtubule dans la direction opposée (Richardson et al., 2005). Hormis leur rôle dans la formation des futures plaquettes, le rôle des protéines associées aux protofilaments de microtubules dans les plaquettes circulantes n'est pas vraiment connu à ce jour.

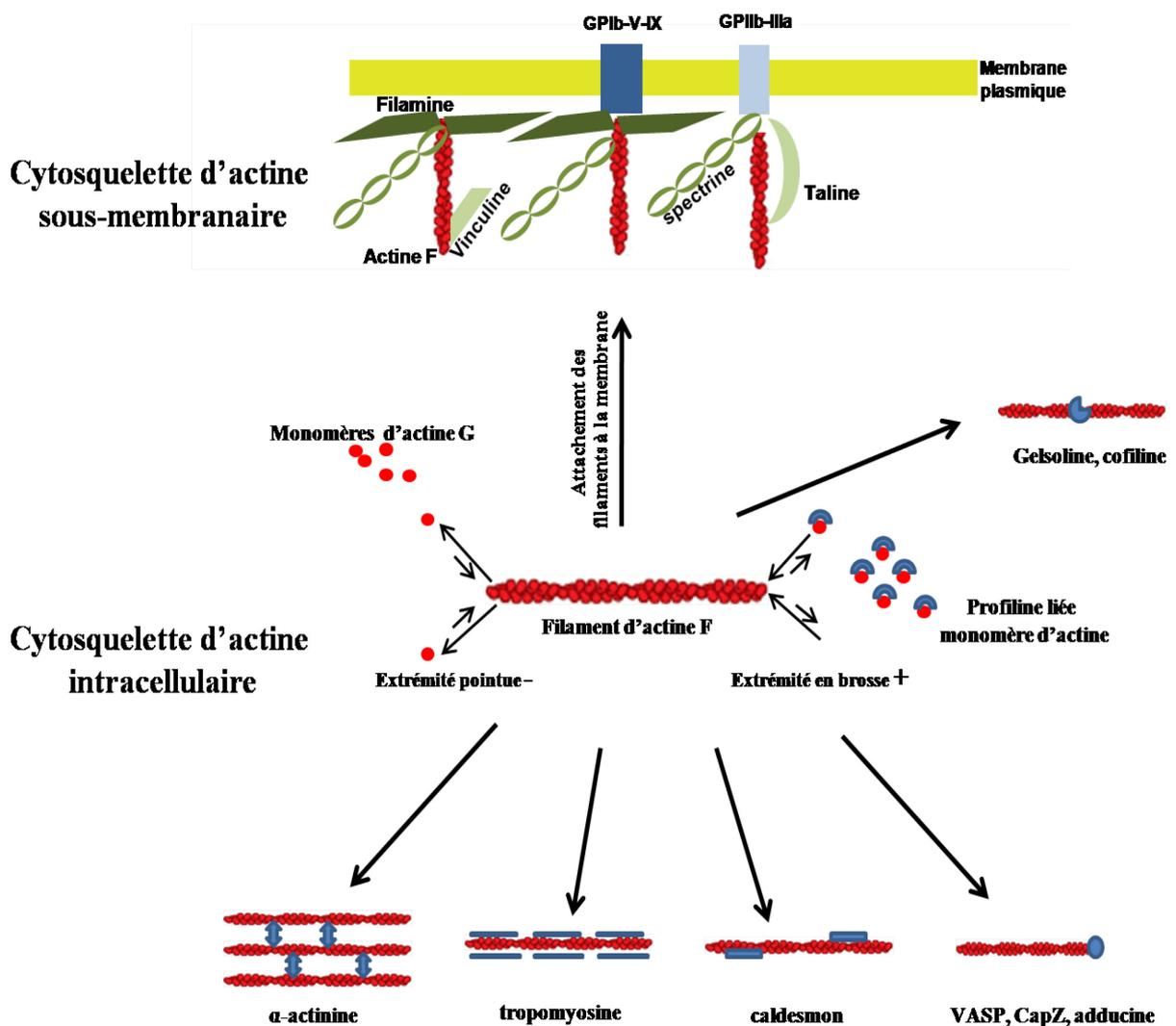
## 1.2 Rôle du cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine joue également un rôle dans le maintien de la forme discoïde des plaquettes par sa capacité à s'organiser en réseau tridimensionnel intracellulaire dense et flexible. Ceci permet à la plaquette au repos de résister à la déformation (Figure 4).



**Figure 4** Cytosquelette d'actine d'une plaquette au repos Plaquette humaine au repos, fixée puis capturée sur une surface de poly-L-lysine. La membrane plasmique est découpée (Triton X-100 0,75%) pour visualiser le cytosquelette d'actine. Observation par microscopie électronique à balayage (Anita Eckly, U949 Strasbourg)

L'actine est la protéine la plus abondante dans la plaquette, où elle est présente à une concentration de 0,55 mM et constitue environ 14 à 20 % des protéines totales. Elle existe sous forme de monomères globulaires (actine-G) et de polymères d'actine-G organisés en filaments (actine-F). Dans la plaquette au repos, plus de 60 % est sous forme d'actine-G. L'actine-F possède une extrémité en brosse (+), de polymérisation, et une extrémité pointue (-), de dépolymérisation. La polymérisation d'actine s'accompagne d'une hydrolyse d'ATP en ADP + Pi. On retrouve plusieurs tailles de filaments d'actines (de 0,1 à 5 µm) organisés de façons différentes.



**Figure 5** Cytosquelettes sous-membranaire et intracellulaire Indications des différentes protéines impliquées dans les deux types de cytosquelette.

On distingue classiquement deux cytosquelettes d'actine : le cytosquelette intracellulaire et sous-membranaire (Figure 5). Ils peuvent être séparés par centrifugation différentielle sur la base de leur densité après lyse des plaquettes par le Triton X-100. Des protéines effectrices et des récepteurs sont associés à ces deux réseaux d'actine dont le répertoire varie selon l'état d'activation.

### 1.2.1 Cytosquelette intracellulaire

Le cytosquelette intracellulaire est composé de longs filaments qui traversent la plaquette de part en part. Il est récupéré par centrifugation à faible vitesse (15 600 g). Au repos, y sont associés la tropomyosine, l' $\alpha$ -actinine, VASP (Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein) et caldesmon (Fox, 2001). La tropomyosine et l' $\alpha$ -actinine participent à l'association des filaments d'actine entre eux ainsi qu'à leur stabilisation. VASP et caldesmon favorisent l'interaction des filaments d'actine avec d'autres protéines telles que la profiline et la myosine (Figure 5) (Hemric et al., 1994; Kang et al., 1997).

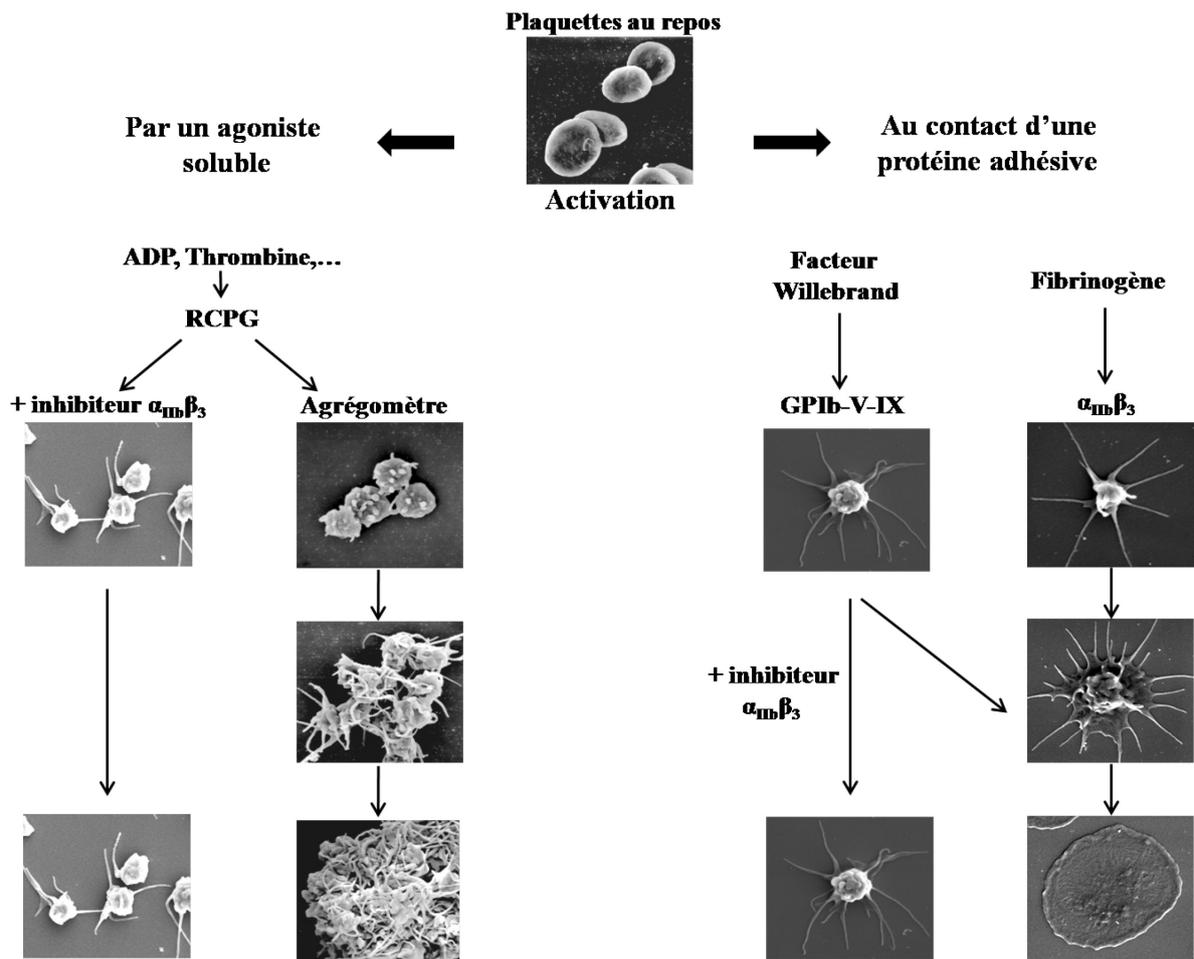
### 1.2.2 Cytosquelette sous-membranaire

Le cytosquelette sous-membranaire, constitué d'un maillage de filaments courts, tapisse la face interne de la membrane plasmique et du système canaliculaire ouvert lorsque la plaquette est au repos. Il joue un rôle crucial car il ancre l'ensemble du cytosquelette à la membrane plasmique. Il est récupéré par centrifugation à forte vitesse (100 000 g) et est composé de protéines « du cytosquelette », de récepteurs membranaires et de protéines de signalisation. Les protéines du cytosquelette sont notamment la spectrine, la taline, la filamine, la vinculine et la moésine (Fox, 2001). La plupart des protéines associées à l'actine au niveau de la membrane plasmique ont des domaines de liaisons, tels que SH3 et PH, pour des protéines de signalisation (src, Syk, 14-3-3). De plus, le cytosquelette membranaire participe à l'ancrage de récepteurs glycoprotéiques et contient des protéines qui coiffent les extrémités des filaments d'actines telles que CapZ et adducine (Figure 5).

## **2) Changements morphologiques lors de l'activation plaquettaire**

Une des premières manifestations de l'activation des plaquettes est leur changement de forme, en réponse à un agoniste soluble ou au contact d'une surface adhérente. Dans les deux cas et très

rapidement, les plaquettes se contractent et émettent de fines protrusions membranaires, les filopodes, alors que la formation de lamellipodes et l'étalement s'observent uniquement en condition d'adhésion (Figure 6). La contraction et l'émission de filopodes sont souvent difficiles à distinguer car ce sont des évènements quasi simultanés. Plusieurs voies d'activation régulent ces changements morphologiques. Les agonistes solubles activent des voies faisant intervenir essentiellement des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG), notamment par des voies Gq et G12/G13. Les récepteurs d'adhésion du FW, du fibrinogène ou du collagène activent des Tyrosine et Sérine kinases, PLC $\gamma$  et mobilisent le calcium intracellulaire. Ces différentes voies s'accompagnent d'un processus d'amplification qui aboutit à l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 conduisant à l'agrégation et à l'étalement en condition d'adhésion. L'agrégation et l'étalement sont inhibés par un agent bloquant l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 comme l'Abciximab ou l'Intégrilin.

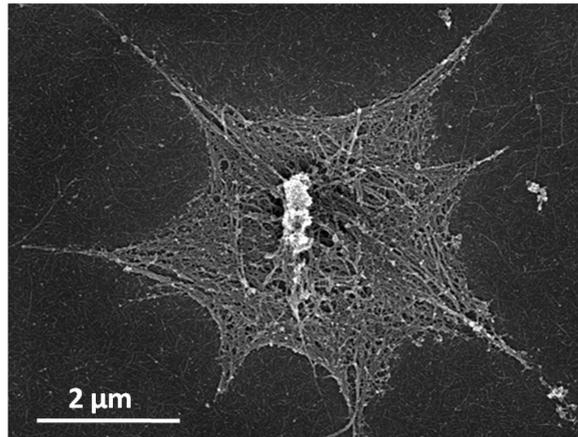


**Figure 6** Changements morphologiques observés lors de l'activation des plaquettes en suspension par des agonistes solubles et lors de l'adhésion sur une surface recouverte de protéines adhésives. Image de microscopie électronique à balayage (Anita Eckly, U949 Strasbourg)

## 2.1 Réarrangement du cytosquelette d'actine

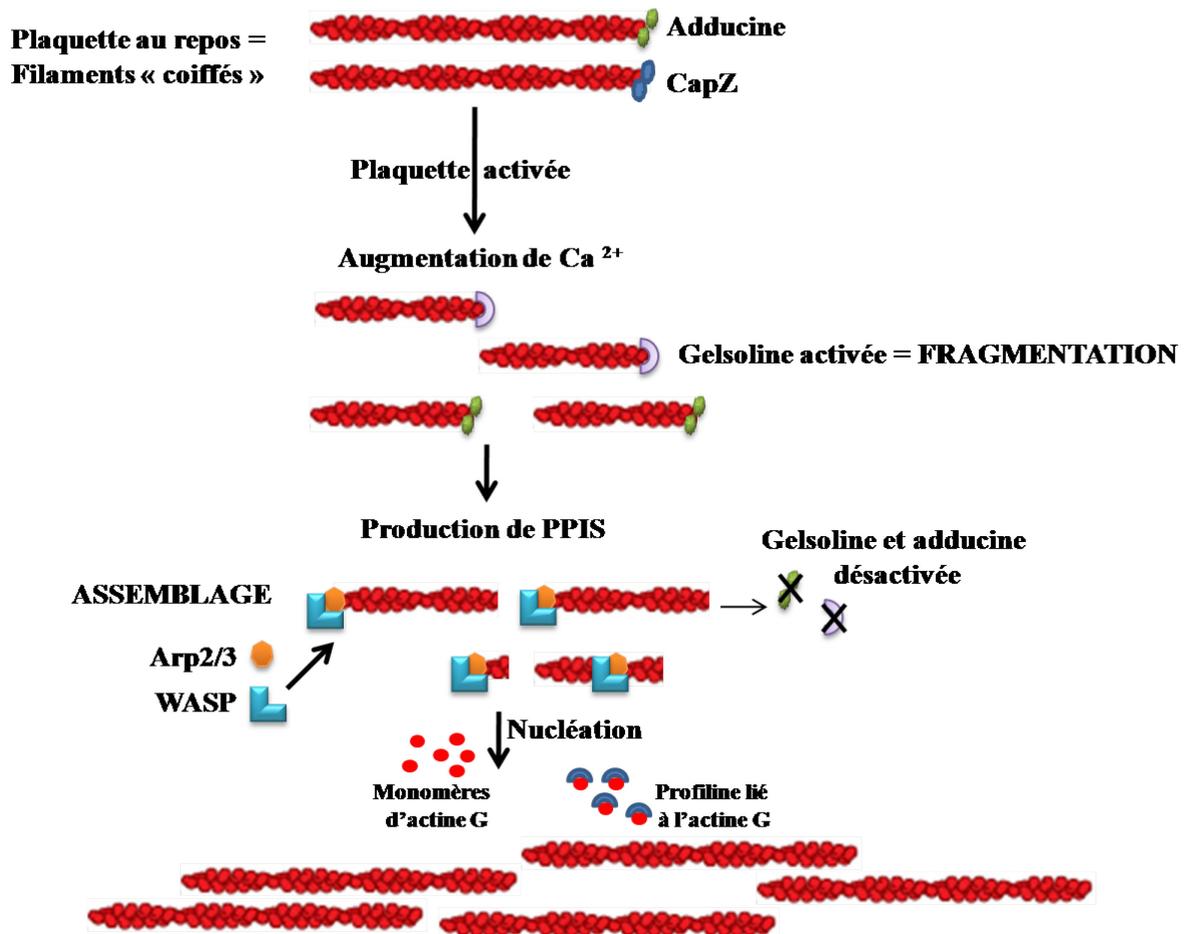
Lors de l'activation, le cytosquelette d'actine se réorganise et va promouvoir les différentes formes de la plaquette (Figure 7). Un processus d'élongation ou de branchement des filaments d'actine exerce des forces au niveau de la membrane plasmique aboutissant à l'extension respectivement de filopodes ou de lamellipodes. L'actine participe également à une fonction motrice de par son interaction avec la myosine pour former le complexe acto-myosine. Ce dernier participe à la contraction du corps plaquettaire et à la formation des fibres de stress dans la plaquette étalée.

### Plaquette adhérente



**Figure 7** Cytosquelette d'actine d'une plaquette adhérente Plaquette humaine adhérente sur une surface de fibrinogène. La membrane plasmique est décapée (Triton X-100 0,75%) pour visualiser le cytosquelette d'actine. Observation par microscopie électronique à balayage (Anita Eckly, U949 Strasbourg)

Le réarrangement du cytosquelette nécessite sa fragmentation préalable avec dépolymérisation des filaments d'actine-F, exposant de nombreuses extrémités libres. Les extrémités libres représentent des foyers de polymérisation (extrémités en brosse) pour l'assemblage de nouveaux filaments par recrutement d'actine-G à partir du stock cytosolique (Figure 8).



**Figure 8 Réarrangement du cytosquelette d'actine après activation plaquettaire** Etapes de fragmentation et d'assemblage lors de la réorganisation du cytosquelette d'actine. PPIS = Phosphoinositides.

La fragmentation est contrôlée par la concentration de calcium intracellulaire. Lors de l'activation, le calcium augmente par mobilisation des stocks internes et par influx, activant des calciprotéines impliquées dans la fragmentation de l'actine-F (Figure 8). Parmi elles, la gelsoline, qui lorsque le taux de calcium augmente, change de conformation, se lie et clive l'actine-F. Elle contribue, en fragmentant les filaments d'actine, à déstabiliser leur association avec la filamine ou la spectrine qui participent au maintien du cytosquelette sous-membranaire. Des plaquettes de souris déficientes pour la gelsoline ont une moindre capacité de polymérisation d'actine (Hartwig, 2006). L'étape de fragmentation est très rapide (5s) et est suivie d'une inactivation de la gelsoline qui se détache des filaments d'actine. Cette inactivation est la conséquence de la génération de nombreux phosphoinositides au niveau de la membrane plasmique via l'activation des Rho GTPases Cdc42 et

Rac lors de l'activation plaquettaire. La cofiline ou ADF (Actin Depolymerisation Factor) causent également la dépolymérisation des filaments existants en les désassemblant ou en les libérant des monomères d'actine de l'extrémité pointue. Cette protéine est inactivée lorsqu'elle est phosphorylée et liée aux phosphoinositides membranaires.

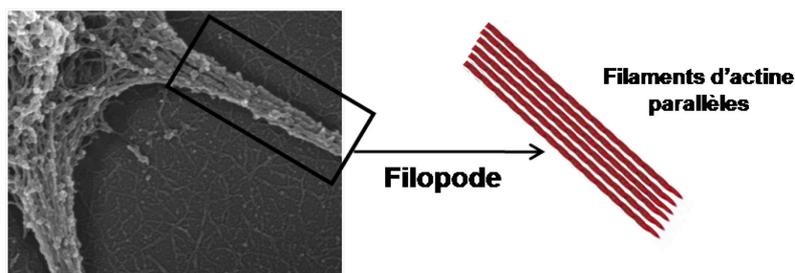
La fragmentation est suivie d'une étape d'assemblage avec création de nouveaux filaments. La production de phosphoinositides  $PI_{4,5}P_2$  et l'activation des GTPases contribuent à activer les protéines impliquées dans la formation de nouveaux filaments d'actine-F telles que les protéines de la famille Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP, WASP et Scar/WAVE 1-3) et le complexe Arp2/3 (Carlier et al., 1999; Higgs and Pollard, 1999). L'absence de WASP est responsable du syndrome de Wiskott-Aldrich caractérisé par une thrombocytopénie et des plaquettes de petite taille. La contribution de WASP dans les changements morphologiques des plaquettes n'est pas vraiment établie. En effet, les plaquettes de patients Wiskott-Aldrich ou de souris invalidées pour WASP sont capables d'émettre des filopodes et de former des lamellipodes (Falet et al., 2002a; Falet et al., 2002b; Gross et al., 1999). Le complexe Arp2/3, formé de sept sous-unités, s'associe aux extrémités libres des filaments d'actine où il forme un complexe de nucléation pour permettre l'élongation d'un second filament (Falet et al., 2002b). *In vitro*, le complexe Arp2/3 catalyse la polymérisation d'actine en un réseau de filaments avec des branchements à 70°. Cette organisation explique qu'il contribue à la formation des lamellipodes qui sont constitués d'un réseau de filaments orthogonaux organisés en branches.

La profiline intervient également dans le processus de polymérisation d'actine par recrutement de monomères d'actine au niveau des extrémités en brosse. Son activité est régulée par le lipide membranaire  $PIP_2$  dont le site de liaison chevauche celui de l'actine monomérique. L'hydrolyse du  $PIP_2$  par la phospholipase C libère la profiline, qui peut alors interagir avec les monomères d'actine.

## 2.2 Filopodes

Le filopode correspond à une protrusion de la membrane plasmique par élongation de filaments parallèles d'actine (Figure 9). L'élongation de ces filaments débute par les extrémités libérées notamment par la gelsoline. Ces filopodes résultent d'un processus actif qui se distingue des étirements membranaires observés à l'arrière des plaquettes adhérentes soumises aux flux (Dopheide et al., 2002). En pratique, il est difficile de dissocier la transformation en sphère et l'émission de filopodes, bien qu'elles semblent obéir à des mécanismes distincts (Gear, 1984). L'observation en temps réel de plaquettes adhérentes permet cependant de visualiser quelques plaquettes encore discoïdes émettant des filopodes.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des filopodes dans la plaquette restent mal connus. Un certain nombre d'effecteurs ont été identifiés dans d'autres types cellulaires mais leur rôle a rarement été évalué dans la plaquette (cf Chapitre II C)).



**Figure 9 Filopodes plaquettaire.** Image d'une plaquette de souris ayant adhéré sur fibrinogène, dont la membrane plasmique a été décapée et observée en microscopie électronique à balayage (Anita Eckly, U949 Strasbourg).

### 2.2.1 Activation par les agonistes solubles

Les filopodes sont observés lors de l'activation des plaquettes en suspension par la grande majorité des agonistes solubles (Figure 6). La stimulation par trois des principaux agonistes physiologiques (ADP, thrombine et Thromboxane A2 (TxA2)) entraîne la contraction et l'émission de filopodes des plaquettes. Dans un agrégomètre et en présence de fibrinogène, les plaquettes forment rapidement un agrégat dans lequel il devient difficile de distinguer les filopodes (Figure 6). Dans des

conditions où l'agrégation est empêchée par l'ajout d'un inhibiteur de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  on peut observer que toutes les plaquettes émettent de nombreux filopodes (Figure 6).

Ces agonistes induisent une augmentation du calcium intracellulaire et la production de phospholipides nécessaires aux réarrangements du cytosquelette. L'addition d'inhibiteurs généraux de l'activation plaquettaire, comme la PGE1 ou le NO, permet de prévenir l'émission de filopodes en réponse à ces agonistes. En augmentant les taux d'AMPc (PGE1) ou de GMPc (NO), ces composés empêchent la production de PI(3,4)P2 et l'augmentation de calcium intracellulaire. Les voies de signalisation déclenchées par les agonistes solubles sont le plus souvent en aval des récepteurs de types RCPG ou tyrosine kinases et impliquent différents effecteurs comme PLC et PKC qui contribuent à réguler notamment le calcium intracellulaire (cf Chapitre II C1)).

### 2.2.2 Activation au contact d'une protéine adhésive

Les filopodes s'observent également après adhésion des plaquettes sur une surface recouverte de protéines adhésives. Cette réponse est notamment observée sur deux protéines qui ont un rôle physiologique avéré : le Facteur Willebrand (FW) et le fibrinogène.

En conditions de flux, les plaquettes circulantes sont capables d'interagir, via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire, avec le FW immobilisé. En conditions statiques, l'adhésion des plaquettes nécessite l'addition d'un inducteur comme la botrocétine. Dans les conditions de flux ou statiques cette interaction s'accompagne d'une signalisation permettant aux plaquettes de se contracter et d'émettre des filopodes (Figure 6) (cf Chapitre II B)). Cette signalisation de faible intensité est amplifiée par les agonistes produits par la plaquette pour aboutir à l'activation de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  et à l'étalement.

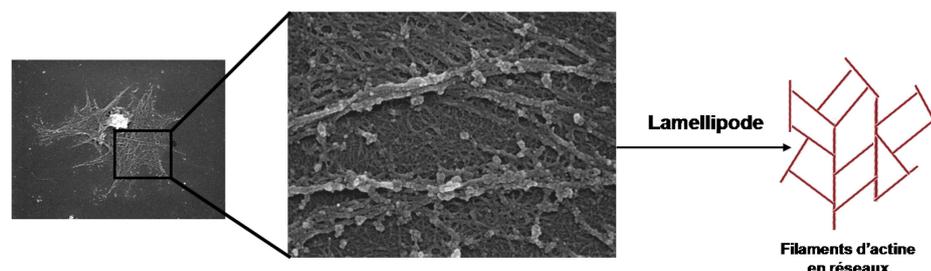
L'adhésion des plaquettes sur une surface recouverte de fibrinogène se fait via l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . La signalisation mène à la contraction, l'émission de filopodes, la formation de lamellipodes et l'étalement des plaquettes (Figure 6). Une boucle d'amplification de l'activation plaquettaire est induite par la sécrétion du contenu des granules avec notamment la libération d'ADP et de TxA2.

Ces changements morphologiques sont également observés lors de l'adhésion sur des fibres de collagène via l'interaction avec deux récepteurs plaquettaire : la GPVI et l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ . Dans ce cas, le niveau d'activation est plus élevé que sur le fibrinogène et l'on observe une deuxième vague de filopodes qui s'étendent à partir des lamellipodes. Le mécanisme d'émission de filopodes semble être distinct de celui des filopodes précoces. Expérimentalement l'observation des filopodes sur les fibres de collagène est plus délicate du fait de l'organisation en 3 dimensions de cette matrice qui forme une surface hétérogène.

La formation de filopodes a également été observée lors de l'adhésion des plaquettes via  $\alpha 6\beta 1$  sur une surface de laminine et via  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$  sur la fibronectine (Inoue et al., 2006; McCarty et al., 2004).

### 2.3 Lamellipodes et étalement

Les lamellipodes ont une structure très différente. Contrairement aux longs filaments parallèles d'actine qui constituent les filopodes, ils sont formés de filaments organisés en réseaux (Figure 10). Des filaments courts d'actine générés par la gelsoline se réarrangent en branchements orthogonaux formant un feuillet membranaire large et plat (Figure 10).

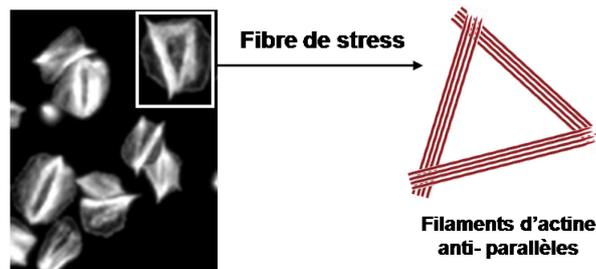


**Figure 10 Lamellipodes plaquettaires.** Plaquette de souris ayant adhéré sur du fibrinogène, dont la membrane plasmique a été décapée, prise en microscopie électronique à balayage (Anita Eckly, U949 Strasbourg). Représentation schématique des filaments d'actines organisés en réseaux.

Les lamellipodes sont également observés dans les cellules qui migrent et qui s'organisent en tapis. Contrairement à ces types cellulaires, la plaquette n'a pas de propriété migratoire mais est capable, grâce aux lamellipodes, de s'étaler et de recouvrir la surface adhésive. Les premières observations d'étalement ont été faites sur des plaquettes mises au contact d'une lame de verre (White

et al., 1985). Les lamellipodes peuvent atteindre plusieurs  $\mu\text{m}^2$  pour aboutir après étalement complet à une multiplication de la surface de 4 fois par comparaison à la plaquette au repos (Figure 1, 6 et 7). Les acteurs intracellulaires qui interviennent dans la formation des lamellipodes plaquettaires sont assez peu connus. Dans d'autres cellules, un rôle du complexe Arp2/3 et de WASP a été mis en évidence dans la formation du réseau orthogonal d'actine. Dans la plaquette, Arp2/3 amplifie la polymérisation d'actine d'un court filament et permet de débiter une autre branche de filament formant ainsi le réseau (Li et al., 2002). Ce complexe a été localisé dans les lamellipodes. La contribution de WASP dans la plaquette n'est pas clairement établie. En effet, les plaquettes de patients Wiskott-Aldrich ou de souris invalidées pour WASP sont capables de former des lamellipodes (Falet et al., 2002a; Gross et al., 1999). Les protéines de coiffe comme CapZ sont importantes car elles s'associent aux extrémités en brosse afin de limiter la polymérisation et favoriser la formation de réseaux en branches (Barkalow et al 1996). La GTPase Rac1 a également été décrite pour jouer un rôle important au vu de l'incapacité des plaquettes de souris déficientes pour Rac1 de former des lamellipodes et de s'étaler (Pleines et al., 2009).

A la fin de ce processus la plaquette étalée forme des fibres de stress caractérisées par l'organisation anti-parallèle des filaments d'actine (Figure 11) maintenus par le complexe actomyosine. Les fibres de stress sont sous le contrôle de la Myosine IIA et de la Rho Kinase. Les plaquettes de souris MYH9, qui n'expriment plus la Myosine IIA sont capables de s'étaler mais ne forment pas de fibres de stress (Leon et al., 2007). Ces fibres de stress s'ancrent à la membrane plaquettaire au niveau des points focaux d'adhésion organisés autour des intégrines et régulés notamment par la Focal Adhesion Kinase (FAK) (Hitchcock et al., 2008).



**Figure 11 Fibres de stress plaquettaires.** Plaquettes lavées de souris qui ont adhéré sur une surface de fibrinogène et marquées par la phalloïdine (actine F). Image prise par microscopie à fluorescence (Catherine Léon, U949 Strasbourg).

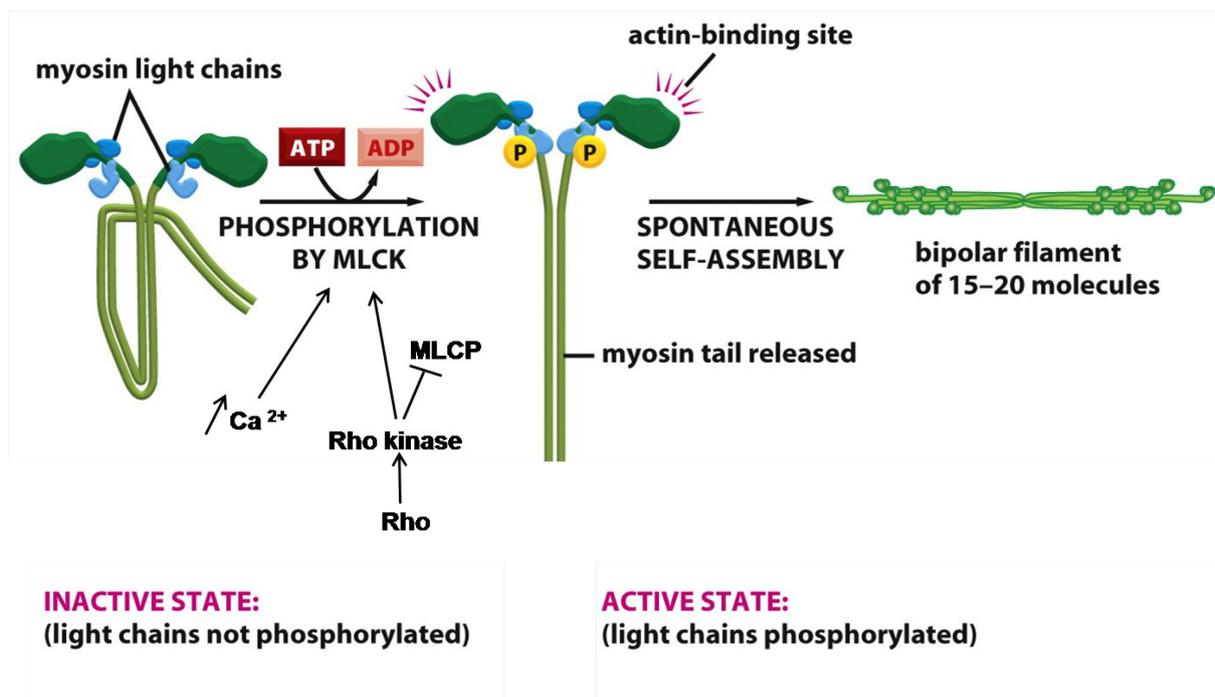
## 2.4 Contraction et transition disque-sphère

L'étape initiale de l'activation plaquettaire implique également une contraction du corps plaquettaire. Plusieurs études se sont intéressées à cette étape du changement de forme. La majorité se sont focalisées sur les réponses dans l'agrégomètre, basée sur la diminution de la transmission lumineuse, qui ne permettent pas de distinguer contraction et émission de filopodes, et analysent globalement le passage disque à sphère. L'analyse microscopique en temps réel a permis d'apprécier plus finement la morphologie des plaquettes. Deux séquences sont observées : i) des plaquettes discoïdes émettent des filopodes puis deviennent sphériques et continuent l'émission de filopodes, ii) des plaquettes deviennent sphériques et émettent des filopodes. Bien que la contraction et l'émission de filopodes soient très rapprochées et difficilement distinguables, elles ne sont pas régies par les mêmes mécanismes. La contraction du corps plaquettaire est dépendante du complexe acto-myosine et de la réorganisation du réseau de microtubules.

### 2.4.1 Rôle du complexe acto-myosine

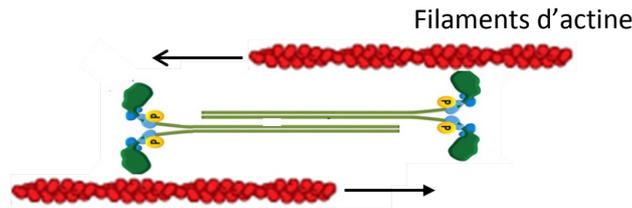
L'actine se lie à la myosine, une protéine motrice, pour former le complexe acto-myosine. Parmi les Myosines conventionnelles, il existe plusieurs isoformes : Myosine IIA, IIB et IIC. A ce jour, seule la Myosine IIA non musculaire a été décrite dans la plaquette. Elle est constituée de quatre chaînes légères et de deux chaînes lourdes. Les chaînes légères se distinguent par leur fonction: deux sont appelées « chaînes légères essentielles » et ont un rôle de structure et deux sont appelées « chaînes légères régulatrices » et régulent l'activation de l'ensemble des chaînes de la

myosine en se phosphorylant. Les chaînes lourdes ont une tête globulaire à leur extrémité N-terminale où se trouve le site de liaison à l'actine. L'augmentation du calcium intracellulaire active la kinase de la chaîne légère de la myosine, Myosin Light chain kinase ou MLCK, qui à son tour active la myosine en phosphorylant les chaînes légères régulatrices. Cet état phosphorylé provoque un changement de conformation de la myosine qui peut alors se lier à l'actine (Figure 12). Il a également été décrit une activation indépendante du calcium qui passe par la voie de signalisation Rho/ Rho kinase. Rho kinase phosphoryle et inactive la phosphatase de la chaîne légère de la myosine Myosin light chain phosphatase ou MLCP ce qui entraîne une stabilisation de la myosine dans son état phosphorylé (Johnson et al., 2007).



**Figure 12** Structure de la Myosine conventionnelle IIA non musculaire (The Cell 5eme édition)

La myosine interagit avec l'actine pour former un complexe contractile (Figure 13). Dans les plaquettes au repos, la myosine est répartie de manière homogène. Lors de l'activation plaquettaire, elle est relocalisée au centre de la plaquette.



**Figure 13** Activité contractile de la myosine après interaction avec les filaments d'actine F : formation du complexe acto-myosine (The Cell 5eme édition)

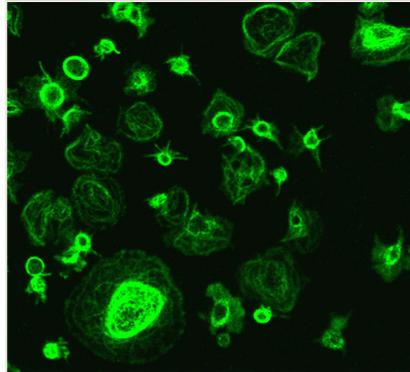
Les souris chez lesquelles la myosine IIA a été spécifiquement inactivée au niveau de la lignée mégacaryocytaire (MYH9 $\Delta$ ) présentent une macrothrombocytopénie, ont un temps de saignement allongé, et une absence de rétraction du caillot. Leurs plaquettes ne se contractent pas après activation alors que l'agrégation et la sécrétion sont pratiquement normales (Leon et al., 2007). La formation de filopodes est affectée dans les plaquettes de ces souris (cf Chapitre Résultats). Après adhésion sur une matrice de fibrinogène, les plaquettes MYH9 sont toujours capables de former des lamellipodes. Elles sont également capables de s'étaler mais sans former des fibres de stress.

Il est assez facile dans des conditions contrôlées, *in vitro*, de découpler les étapes de contraction émission de filopodes des étapes d'étalement, d'agrégation et de sécrétion en utilisant des agonistes faibles tel que l'ADP ou l'adhésion sur FW en conditions de blocage de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Cependant, il est difficile de découpler les étapes de contraction et d'émission de filopodes qui sont des événements quasi concomitants. Même des inhibiteurs spécifiques de la myosine comme la blébbistatine inhibent à la fois la contraction des plaquettes et l'émission de filopodes (cf Chapitre Résultats).

#### 2.4.2 Rôle des microtubules

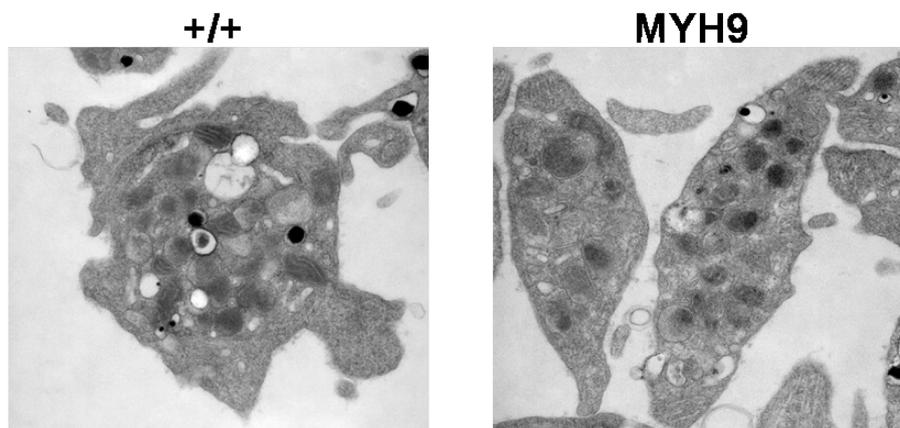
Lors de l'activation plaquettaire, le réseau de microtubules se réorganise de manière importante. Les microtubules se dépolymérisent et l'anneau sous-membranaire se dissocie. Puis une repolymérisation forme un anneau central serré avec tout autour des filaments de microtubules qui rayonnent jusque dans les filopodes (Figure 14) (Patel-Hett et al., 2008; White et al., 1985). Cet

anneau central regroupe les organelles plaquettaires dont les granules alpha et denses ce qui pourrait faciliter leur sécrétion lors de l'activation plaquettaire.



**Figure 14 Microtubules plaquettaires** Adhésion de plaquettes humaines lavées préstimulées par l'ADP (10  $\mu$ M) sur une surface recouverte de fibrinogène. Fixation des plaquettes et immunomarquage de la tubuline  $\beta$ 1. Observation en microscopie à fluorescence (C. Strassel, U949 Strasbourg).

La  $\gamma$ -tubuline participe dans les cellules nucléées à la formation du centrosome et est associée au fuseau mitotique. Dans la plaquette, qui ne possède pas de centrosome, elle participe à la relocalisation des microtubules et à la formation de l'anneau central (Patel-Hett et al., 2008). Les microtubules n'ayant pas d'activité contractile, il a été proposé que la centralisation implique la myosine qui pourrait interagir directement ou par le complexe acto-myosine (Nakata and Hirokawa, 1987; Rosner et al., 2007). En faveur de ce mécanisme, il a été observé une absence de centralisation dans les plaquettes déficientes pour la Myosine IIA (figure 15). Un autre rôle des microtubules pourrait être d'apporter une architecture aux filopodes (Patel-Hett et al., 2008; White et al., 1985).



**Figure 15 Centralisation des granules** Plaquettes lavées de souris ++ ou MYH9 activées en suspension par l'ADP (5  $\mu$ M), fixées au glutaraldéhyde 2,5 % et observées au microscope électronique à transmission (A. Eckly). Les plaquettes ++ deviennent sphériques, émettent des filopodes et les granules de sécrétion sont centralisés. Au contraire, les plaquettes de souris MYH9 $\Delta$  restent discoïdes, n'émettent pas de filopodes et les granules sont répartis de façon homogène.

## 2.5 Rôles dans l'hémostase

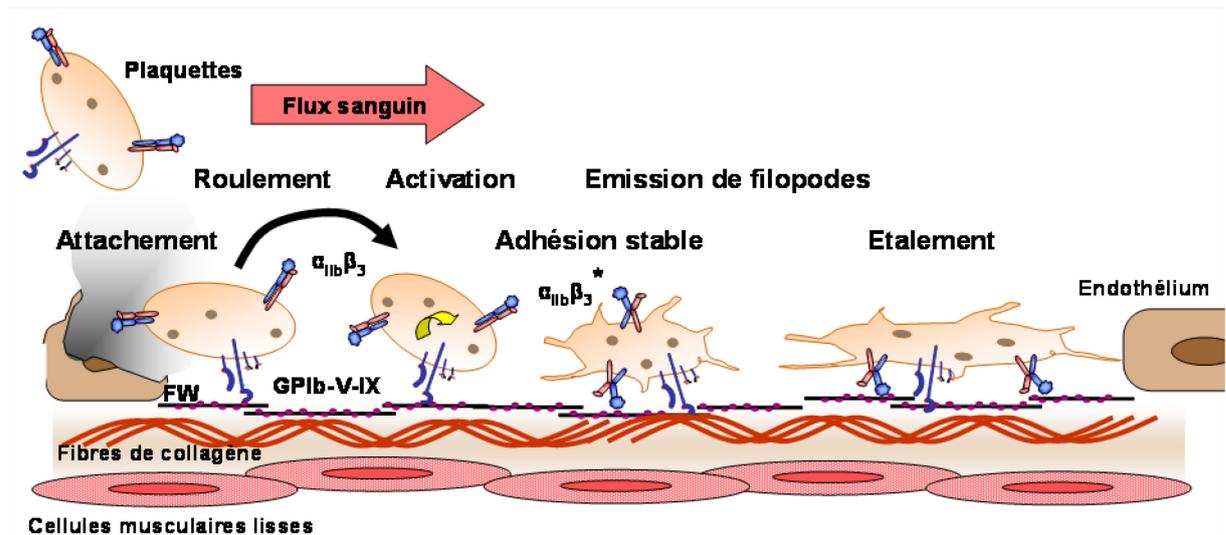
Plusieurs rôles ont été proposés. En suspension et en réponse aux agonistes solubles, l'émission de filopodes plaquettaire augmenterait l'interaction entre l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et ses ligands, notamment le fibrinogène, favorisant ainsi l'agrégation plaquettaire (Hensler et al., 1992). Des études utilisant la cytochalasine D, un agent qui inhibe la polymérisation d'actine, ont montré que la réorganisation du cytosquelette contribue à la stabilité des agrégats (May et al., 1998; Natarajan et al., 2000). Lors de l'adhésion en condition de flux, les filopodes ralentissent le roulement des plaquettes et favoriseraient l'étape d'adhésion stable induite par les intégrines (Maxwell et al., 2006). Les filopodes et les lamellipodes offrent un moyen d'augmenter la surface de contact et l'interaction ligands / récepteurs. Il est cependant difficile d'établir le rôle des différents changements morphologiques et notamment celui des filopodes. Contrairement aux lamellipodes, il n'existe pas d'agents pharmacologiques ou de modèles murins permettant d'inhiber sélectivement l'émission de filopodes. L'inhibition d'effecteurs ubiquitaires, comme PLC et src kinases affectent d'autres fonctions et globalement les fonctions plaquettaires (activation  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, sécrétion..). A ce jour, les mécanismes moléculaires impliqués spécifiquement dans l'émission de filopodes dans la plaquette sont très mal connus, bien que l'on puisse penser que certains acteurs bien identifiés dans d'autres cellules comme la GTPases Cdc42 puissent intervenir (cf Chapitre II C) 2)).

Concernant l'étalement, le rôle d'une autre GTPase, Rac1, a été clairement établi. Les plaquettes de souris déficientes pour Rac1 ne sont plus capables d'émettre des lamellipodes et de s'étaler. Rac1 semble nécessaire à la stabilité du thrombus *in vitro* et *in vivo* suggérant une implication de ces étapes d'étalement. (McCarty et al., 2005).

## B) Signalisation via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire

L'adhésion et l'activation passant par le complexe GPIb-V-IX représente un modèle intéressant pour étudier les mécanismes impliqués dans l'émission de filopodes. L'étude de ce récepteur pose également la question du rôle de ce changement de forme dans l'adhésion des plaquettes à la paroi et le processus de réparation tissulaire.

A forts taux de cisaillement, les étapes initiales d'adhésion sont assurées par l'interaction du complexe GPIb-V-IX avec le FW. Cette interaction transitoire s'accompagne d'une adhésion stable avec la mobilisation de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , la sécrétion des granules entraînant la libération notamment d'ADP et de Thromboxane A<sub>2</sub>, et l'agrégation plaquettaire (Figure 16).

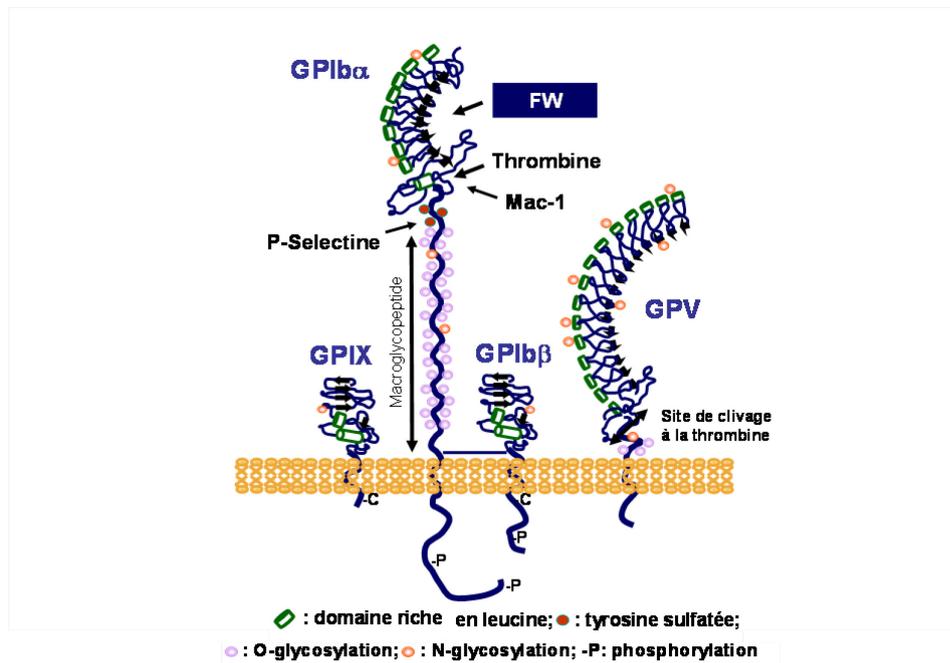


**Figure 16** Rôle du complexe GPIb-V-IX dans l'adhésion et l'activation des plaquettes au site de lésion vasculaire. Le complexe GPIb-V-IX permet le recrutement des plaquettes circulantes en conditions de flux artériel en interagissant avec le facteur Willebrand (FW) immobilisé sur les fibres de collagène. Cette adhésion réversible entraîne le roulement et le ralentissement des plaquettes. Cette étape s'accompagne d'une activation avec émission de filopodes et activation de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  ( $\alpha\text{IIb}\beta_3^*$ ) conduisant à l'adhésion stable et à l'étalement, puis au recrutement de nouvelles plaquettes.

### 1) Structure du complexe GPIb-V-IX

Le complexe GPIb-V-IX (CD42) est constitué de 4 glycoprotéines transmembranaires de type I : la GPIb $\alpha$  (CD42b, 135 kDa), la GPIb $\beta$  (CD42c, 26 kDa), la GPIX (CD42a, 20 kDa) et la GPV

(CD42d, 82 kDa). On estime qu'il y a 25 000 copies de GPIb-IX à la surface des plaquettes pour 12 000 copies de GPV (Clemetson, 1997; Lopez et al., 1998) (Figure 17).



**Figure 17** Représentation schématique du complexe GPIb-V-IX

Ces 4 glycoprotéines appartiennent à la superfamille des protéines riches en leucine (LR) qui sont caractérisées par la présence d'un domaine LR comprenant un ou plusieurs éléments répétés riches en leucine (LRR) de 20 à 29 acides aminés. Cette famille est impliquée dans des interactions moléculaires variées et dans des fonctions diverses d'adhésion, de signalisation et dans le développement (Kobe and Deisenhofer, 1994). Chaque LRR forme une boucle composée d'un feuillet  $\beta$  relié à une hélice  $\alpha$  et l'association des LRR donne une forme incurvée au domaine LR. Les sous-unités du complexe GPIb-V-IX possèdent un nombre variable de LRR (GPIb $\alpha$  : 8 ; GPV : 15 ; GPIb $\beta$  et GPIX : 1). Le domaine LR est flanqué aux extrémités N et C terminales d'une ou deux boucles peptidiques formées par l'appariement de cystéines.

La partie extracellulaire de la GPIb $\alpha$  est formée d'une région N-terminale de 45 kDa contenant le domaine LR, puis d'un court segment chargé négativement et comprenant des tyrosines sulfatées, et enfin d'une longue région fortement O-glycosylée appelé macroglycopeptide. La GPIb $\beta$  possède

ensuite un domaine transmembranaire et un segment intracellulaire de 96 acides aminés. La GPIb $\alpha$  est associée à une ou deux GPIb $\beta$  par un ou deux ponts disulfures au dessus de la membrane plasmique (Luo et al., 2007).

La GPIb $\beta$  comprend un LRR et un domaine intracellulaire de 34 acides aminés incluant une cystéine palmytoylée facilitant l'ancrage à la membrane plasmique et une sérine (S166) phosphorylée par la PKA qui pourrait moduler les propriétés adhésives (Muszbek and Laposata, 1989; Perrault et al., 2003). Un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire réduit de 50 % l'adhésion des plaquettes au FW en présence de flux et inhibe la phosphorylation PKA-dépendante de la GPIb $\beta$  (Perrault et al., 2001). Cet anticorps pourrait moduler la signalisation du complexe (Mangin et al, non publié).

La GPIX présente 60 % d'identité avec la GPIIb et contient également 1 élément LRR. La GPIX possède un court domaine intracellulaire de 6 acides aminés et se lie à la GPIIb de façon non covalente pour former le complexe GPIb-IX.

La GPV se lie au complexe GPIb-IX de façon non covalente. Sa partie extracellulaire contient 15 LRR et 8 sites de N-glycosylation. La GPV est clivée par la thrombine ce qui libère un fragment soluble de 69 kDa dans la circulation, qui est utilisé en clinique comme marqueur de thrombose (Lanza et al., 2008). La GPV peut également être clivée par la calpaïne et ADAM-17 produites par la plaquette activée.

## **2) Ligands**

Les propriétés réceptrices du complexe sont essentiellement portées par la GPIb $\alpha$  dans sa partie N-terminale de 45 kDa. Deux de ses ligands, le FW et la thrombine, jouent des rôles importants dans l'activation plaquettaire et l'hémostase. Le FW interagit avec la GPIb $\alpha$  via son domaine A1 (Huizinga et al., 2002).

### **2.1 Le Facteur Willebrand**

Le FW est une glycoprotéine multimérique de très haut poids moléculaire (500 à 20 000 kDa) circulant dans le plasma (Ruggeri, 1997), et stockée dans les granules  $\alpha$  des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. En conditions normales, les plaquettes n'interagissent pas avec le FW plasmatique. Lors d'une lésion, le FW se lie au collagène sous-endothélial permettant la capture des plaquettes via la GPIIb/IIIa. En présence de flux faible ou dans l'agrégomètre, la liaison de GPIIb/IIIa avec le FW soluble peut être induite par la ristocétine, qui est un antibiotique, ou par la botrocétine, qui est une protéine isolée d'un venin de serpent, entraînant l'agglutination des plaquettes. En conditions de flux, le FW immobilisé sur une surface passe d'une forme globulaire à une forme étendue exposant le domaine A1 favorisant l'interaction avec la GPIIb/IIIa et l'adhésion plaquettaire. Trois zones de contact entre le domaine A1 du FW et la partie N-terminale de la GPIIb/IIIa ont été déterminées par cristallographie (Dumas et al., 2004; Huizinga et al., 2002) impliquant le domaine LR et des boucles peptidiques flanquantes au niveau N et C-terminal, cette dernière modulant l'accès à la poche de liaison. L'importance physiologique du FW est soulignée par l'existence de la maladie de Willebrand, un syndrome hémorragique dû à un déficit qualitatif ou quantitatif de FW (Keeney and Cumming, 2001). Une forme particulière de type IIb est due à une affinité augmentée pour la GPIIb/IIIa entraînant une déplétion des formes plasmatiques circulantes. Une autre maladie impliquant le FW est le purpura thrombotique thrombocytopénique qui résulte de l'accumulation plasmatique de multimères de très haut poids moléculaire due à un défaut de clivage par la protéase ADAMTS13 (A Disintegrin AND Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeat). Les multimères de haut poids moléculaire, qui sont libérés par les granules de Weibel-Palade et par les plaquettes dans des conditions d'activation, sont les formes les plus efficaces pour l'adhésion des plaquettes.

## 2.2 La thrombine

La thrombine, l'enzyme clef de la coagulation, est également un puissant agoniste plaquettaire. Ses principaux récepteurs d'activation sont les PAR (Protease Activated Receptors) (PAR-1 et PAR-4 chez l'homme) couplés aux protéines G (Coughlin, 2005). La GPIIb/IIIa a été également impliquée dans

l'activation par la thrombine par un processus encore mal compris ne nécessitant pas son activité enzymatique (De Marco et al., 1994). L'étude cristallographique du complexe GPIIb-IIIa-thrombine montre une interaction des exosites I et II de la thrombine avec un motif LRR, la région flanquante C-terminale et le domaine anionique sulfaté (Celikel et al., 2003; Dumas et al., 2004). L'absence du complexe GPIIb-V-IX, chez les patients porteurs du syndrome de Bernard-Soulier, se traduit par une réponse plaquettaire diminuée à la thrombine (Lopez et al., 1988).

### 2.3 Autres ligands

La GPIIb $\alpha$  interagit également avec l'intégrine  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1), la P-sélectine et le facteur XII de la coagulation.

L'intégrine  $\alpha_M\beta_2$  leucocytaire possède un domaine similaire au domaine A1 du FW (Emsley et al., 1997) assurant sa liaison avec la partie N-terminale de la GPIIb $\alpha$ . L'intégrine  $\alpha_M\beta_2$  serait impliquée dans le recrutement des leucocytes par les plaquettes au niveau d'une lésion vasculaire (Zago et al., 2008).

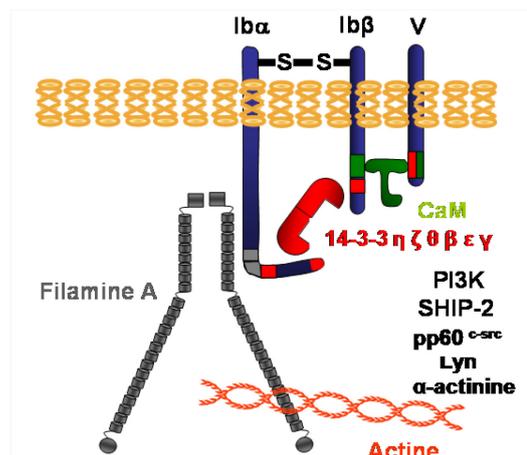
La P-sélectine est une protéine transmembranaire de 140 kDa localisée dans les corps de Weidell-Palade endothéliaux et les granules  $\alpha$  des plaquettes. Lors de l'activation, la P-sélectine est exposée à la surface de la membrane plasmique. La P-sélectine se lie à la PSGL-1 leucocytaire (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) et à la GPIIb $\alpha$  plaquettaire. L'interaction de la P-sélectine endothéliale avec ces deux récepteurs permet respectivement aux leucocytes de rouler et d'être capturés au niveau d'un site inflammatoire et thrombotique et aux plaquettes de rouler à la surface des cellules endothéliales activées (Romo et al., 1999).

Le facteur XII est une protéine plasmatique de 80 kDa qui intervient dans la phase contact. Le facteur XII est une pro-enzyme qui est clivée pour donner le facteur XIIa qui en association avec d'autres cofacteurs participe au clivage et à l'activation du facteur XI impliqué dans la voie intrinsèque menant à l'activation de la thrombine. Une interaction directe entre la région N-terminale de la GPIIb $\alpha$

et le facteur XII a été mise en évidence (Bradford et al., 2000), qui pourrait être impliquée dans la génération de thrombine à la surface des plaquettes.

### 3) Partenaires intracellulaires

Les domaines intracellulaires des 4 sous-unités du complexe GPIb-V-IX, ne portent pas de motifs connus de signalisation ni d'activité enzymatique. Il est donc vraisemblable que des partenaires intracellulaires interviennent dans la transmission du signal (cf Chapitre II) B) 4)). A ce jour, 8 partenaires directs (filamine A, 14-3-3 et calmoduline) ou indirects (PI3 kinase, SHIP-2, pp60<sup>c-src</sup>, Lyn et  $\alpha$ -actinine) ont été identifiés (Figure 18). Ils ont été identifiés par co-immunoprécipitation avec GPIb-V-IX à partir de lysats de plaquettes ou de cellules transfectées par le complexe normal ou muté.



**Figure 18** Partenaires intracellulaires directs et indirects du complexe GPIb-V-IX

La filamine 1 (280 kDa) (Lebart et al., 1994) est un homodimère qui interagit avec la région 567-571 de la GPIb $\alpha$  via sa partie C terminale et avec l'actine par son extrémité N-terminale grâce au domaine ABD (Actin Binding Domain), créant ainsi un pont avec le cytosquelette sous-membranaire. Cette interaction pourrait être impliquée dans le maintien de la forme discoïde des plaquettes. En effet, l'absence du complexe, et donc la perte du lien filamine-actine, se traduit par la formation de plaquettes beaucoup plus grandes et déformables. Ceci a été décrit dans les plaquettes de souris déficientes pour la GPIb $\alpha$  ou la GPIb $\beta$ , ainsi que chez les patients porteurs du syndrome de Bernard-

Soulier (Lopez et al., 1998). La filamine A se lie également à certaines intégrines consolidant l'ancrage au cytosquelette sous-membranaire (Calderwood et al., 2000). Elle servirait également de point de rencontre pour des protéines de signalisation en interagissant avec celles-ci (GTPases).

La famille de protéines adaptatrices 14-3-3, d'un PM compris entre 29 et 32 kDa, est exprimée dans toutes les cellules eucaryotes. Les plaquettes expriment les formes  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\varepsilon$ ,  $\zeta$  et  $\eta$  et  $\theta$  (Mangin et al., 2009; Wheeler-Jones et al., 1996). Les 14-3-3 interagissent avec des protéines de signalisation et nucléaires comme c-Raf, PKC, p130<sup>Cas</sup>, BAD, cdc25 et PI3 kinase qui sont impliquées dans de nombreuses fonctions (Aitken, 2006). Des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de mettre en évidence l'interaction du complexe GPIb-V-IX avec toutes ces isoformes dans la plaquette (Mangin et al., 2009). L'interaction de la 14-3-3  $\zeta$  avec les régions 580-590 et 606-610 de la GPIb $\alpha$ , a été montrée dans des cellules CHO transfectées avec des formes normales ou mutées du complexe GPIb-IX (Mangin et al., 2009). 14-3-3 interagit également avec la partie intracellulaire de la GPIb $\beta$ , mais la délétion de ce domaine n'empêche pas la liaison au complexe via GPIb $\alpha$ . La 14-3-3 $\zeta$  est impliquée dans l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 puisqu'une perte d'association avec la GPIb $\alpha$  inhibe cette activation et l'étalement des cellules sur FW (Gu et al., 1999; Mangin et al., 2004).

La calmoduline est une calciprotéine de 18 kDa très conservée chez les eucaryotes. Une association entre la calmoduline et les sous-unités GPIb $\beta$  et GPV a été rapportée mais son rôle fonctionnel reste à établir (Andrews et al., 2001). Cette protéine est connue pour participer au changement de forme des plaquettes lors de leur activation par sa capacité à activer la MLCK et la myosine (cf Chap II) A) 2.4).

La PI3 kinase a été décrite pour interagir indirectement avec le complexe GPIb-V-IX. La sous-unité p85 de la PI3 kinase se lierait au complexe par l'intermédiaire de la 14-3-3  $\zeta$ . La perte de liaison après activation des plaquettes pourrait participer à l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et à sa signalisation « outside-in » (Kasirer-Friede et al., 2004; Munday et al., 2000; Yap et al., 2002).

La GPIb pourrait également interagir avec deux src kinases, pp60<sup>c-src</sup> et Lyn (Wu et al., 2003). Le mécanisme proposé implique le recrutement de pp60<sup>c-src</sup> par la PI3Kinase permettant son activation. Le mode d'interaction de Lyn n'est pour l'instant pas défini.

La SH2 domain-containing inositol 5-phosphate (SHIP-2) hydrolyse en position 5 le groupement phosphate du PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> pour former du PI<sub>3,4</sub>P<sub>2</sub>. Cette enzyme a été décrite pour interagir indirectement avec le complexe GPIb-V-IX via la filamine et pour contrôler négativement le réarrangement du cytosquelette d'actine et la formation de lamellipodes (Dyson et al., 2003).

L' $\alpha$ -actinine interagit avec le complexe GPIb-V-IX dans des plaquettes soumises à des forces de cisaillement élevées dans un appareil de type viscosimètre. L' $\alpha$ -actinine présente dans le cytosquelette sous-membranaire, se lie à l'actine et intervient dans l'association des filaments d'actine entre eux. Le rôle de l' $\alpha$ -actinine serait de servir de protéine adaptatrice pour recruter des protéines de signalisation (Feng et al., 2002).

#### **4) Signalisation en réponse au FW**

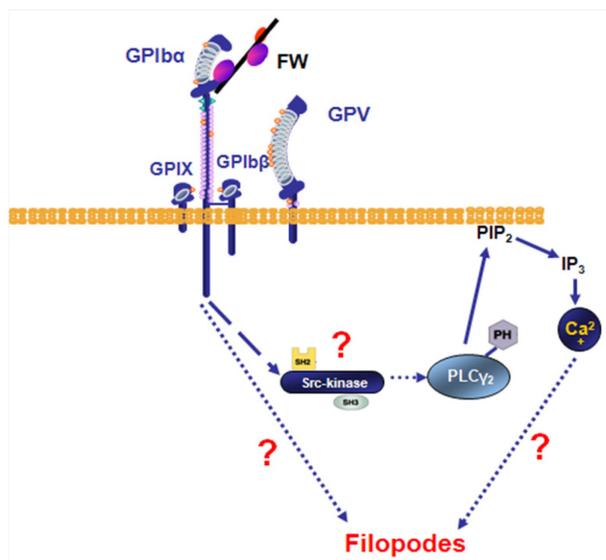
##### **4.1 GPIb-V-IX est plus qu'un récepteur d'adhésion**

Longtemps, le rôle attribué au complexe GPIb-V-IX plaquettaire a été limité à sa capacité de capturer les plaquettes au niveau de la brèche vasculaire. Sa capacité à assurer l'agglutination de plaquettes fixées était également en faveur d'un rôle passif (Allain et al., 1975). Cette vision a été modifiée tout d'abord par l'observation d'une activation des plaquettes en suspension soumises à des forces de cisaillement élevées dans un viscosimètre en présence de FW soluble (Kroll et al., 1991). Cette signalisation se manifeste par une augmentation du calcium intracellulaire, l'activation de PKC et la production de thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Plus récemment, une signalisation a également été mise en évidence lors de l'adhésion des plaquettes sur FW par leur changement de forme avec passage d'un état discoïde à sphérique avec émission de filopodes (Yuan et al., 1999). Cette signalisation conduit à l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, à l'extension de lamellipodes et à l'étalement complet. La démonstration d'une signalisation uniquement attribuable au complexe GPIb-V-IX provient

d'expériences d'adhésion de plaquettes ou de cellules CHO transfectées par le complexe dans ces conditions éliminant la contribution d'agonistes solubles ou d'autres récepteurs d'adhésions (Mangin et al., 2003).

#### **4.2 Signalisation GPIb-V-IX spécifique**

L'activation déclenchée par le complexe GPIb-V-IX est considérée selon les études comme forte (Canobbio et al., 2004), de faible intensité (Yuan et al., 1999) ou même absente (Kuwahara et al., 1999). Ces variations s'expliquent par des conditions expérimentales différentes. Celles-ci comprennent l'utilisation de différents ligands (FW humain, bovin, porcine ou recombinant), de différents inducteurs (botrocétine ou ristocétine), de plaquettes d'espèces différentes (humaines ou souris) ou préparées selon des méthodes diverses. Une variable clef pour établir une spécificité du signal concerne l'amplification par des agonistes produits par la plaquette elle-même (ADP, TXA2) et l'implication d'autres récepteurs capables de lier le FW ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et  $\alpha$ v $\beta$ 3). Tout ceci aboutit dans la littérature à une accumulation de mécanismes et de voies de signalisation attribués au complexe GPIb-V-IX sans que l'on puisse discriminer ceux qui lui sont spécifiques. Il est donc difficile d'établir un consensus sur la signalisation déclenchée par le complexe GPIb-V-IX. Plusieurs effecteurs semblent cependant clairement impliqués dans une voie en aval de GPIb-V-IX, qui comprend une src kinase, PLC $\gamma$ 2, IP3 et la mobilisation de calcium intracellulaire (Figure 19). Il reste que, notre connaissance de cette voie d'activation est encore très incomplète, nécessitant notamment d'identifier les src kinases impliquées, la séquence des événements conduisant à l'activation de PLC, et les acteurs protéiques impliqués dans l'émission de filopodes.



**Figure 19** Signalisation déclenchée par l'interaction du FW avec le complexe GPIIb-V-IX menant à l'émission de filopodes.

### 4.3 Signalisation en condition d'adhésion

Une signalisation spécifique peut être mise en évidence en système d'adhésion dans des conditions contrôlées (Mangin et al., 2003; Yuan et al., 1999). Les plaquettes capturées sur une surface recouverte de FW, en condition statique ou de flux, se contractent et émettent des filopodes. L'addition d'un antagoniste de l'intégrine  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 (abciximab ou integrilin) n'inhibe pas cette réponse mais empêche la formation des lamellipodes et l'étalement. L'émission de filopodes est observée en présence d'un FW recombinant ne possédant pas de domaine RGD liant l'intégrine  $\alpha$ IIB $\beta$ 3. Enfin, elle est observée même en présence d'antagonistes des récepteurs de l'ADP et du TXA2. Ce système permet donc d'observer une réponse spécifiquement dépendante de GPIIb-V-IX. Cette réponse se manifestant par une signalisation calcique présentant des pics transitoire de faible intensité par mobilisation des stocks intracellulaires. La signalisation et l'émission de filopodes sont inhibées par un inhibiteur de src kinase, PP2, un inhibiteur de PLC $\gamma$ , U73122, ou dans des plaquettes de souris dépourvues de PLC $\gamma$ 2, et par un antagoniste du récepteur à l'IP3 du réticulum sarcoplasmique. Par contre les inhibiteurs de PKC et de PI3 kinase n'ont pas d'effet (Mangin et al., 2003).

#### 4.4 Signalisation en condition d'agrégation

L'agrégation a également été utilisée pour étudier la signalisation du complexe GPIb-V-IX/FW. Les plaquettes en suspension dans une cuvette d'agrégomètre sont activées en présence de FW soluble et de botrocétine ou de ristocétine. Dans une première étape, l'agglutination des plaquettes est observée, même avec des plaquettes fixées ou en présence d'inhibiteurs puissants de l'activation tels que la prostacycline. Cette réaction est indépendante de l'activation des plaquettes et se distingue de l'agrégation.

Lorsque la sécrétion d'ADP, la production de TXA2 et l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ne sont pas empêchées, l'agglutination est suivie d'une activation menant à une deuxième vague d'agrégation. Cette réponse est principalement observée quand les plaquettes sont en présence de faibles concentrations de calcium extracellulaire. Cette deuxième vague d'activation survient également dans les plaquettes en suspension soumises à des taux de cisaillement très élevés ( $> 10\,000\text{ s}^{-1}$ ) (Kroll et al., 1991). Dans cette dernière condition il n'y a pas besoin d'ajout d'inducteurs pour que l'agrégation soit observée.

#### 4.5 Signalisation GPIb-V-IX et activation de l'intégrine $\alpha$ IIb $\beta$ 3

La signalisation en aval du complexe GPIb-V-IX aboutit à l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 même si les effets amplificateurs de l'ADP ou du TXA2 sont empêchés. En condition d'adhésion, ceci se manifeste par la formation de lamellipodes, l'étalement et la formation de fibres de stress. Cette étape se distingue et peut être étudiée séparément de la signalisation propre au complexe GPIb-V-IX/FW. Plusieurs mécanismes ont été proposés dans l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Le premier, s'appuyant sur des études en système d'adhésion implique la libération de la protéine 14-3-3, le recrutement d'une src kinase, de la PI3 kinase, de PKC en aval de PLC $\gamma$ 2 et de protéines adaptatrices comme ADAP et SLP-76 (Kasirer-Friede et al., 2004; Kasirer-Friede et al., 2007; Kasirer-Friede et al., 2002). D'autres modèles, s'appuyant sur l'agrégation impliquent une association du complexe avec d'autres récepteurs et notamment le récepteur Fc $\gamma$ RIIA et la chaîne gamma des récepteurs Fc (Fc $\gamma$ R).

Ceux-ci contiennent des motifs ITAM permettant l'activation de la kinase Syk, puis de PLC $\gamma$ 2 pour aboutir à la libération de calcium et l'activation de PKC (Canobbio et al., 2001; Wu et al., 2001). Une association avec des canaux calciques a été également avancée, conduisant à la libération d'agonistes comme l'ADP et le TXA2 (Mazzucato et al., 2002; Nesbitt et al., 2002) puis à l'activation de PKC.

Une voie de signalisation impliquant séquentiellement une PI3 kinase, Akt, la production de GMPc via eNOS, l'activation de PKG et finalement ERK qui active l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 a également été proposée. Le NO est un composé connu pour son rôle inhibiteur dans la plaquette ce qui soulève des questions sur ce mécanisme.

### **C) Mécanismes conduisant à l'émission de filopodes**

Les mécanismes qui mènent à l'émission de filopodes dans la plaquette sont très mal connus. Après avoir abordé les données propres à la plaquette nous nous intéresserons aux mécanismes décrits dans d'autres types cellulaires.

#### **1) Dans la plaquette**

Schématiquement, deux grandes voies sont impliquées dans l'activation plaquettaire conduisant aux changements morphologiques mais également à l'agrégation et à la sécrétion. Ces voies sont respectivement en aval de Récepteurs couplés aux Protéines G (RCPG) et de récepteurs couplés à des tyrosines kinases (RTK) (Brass et al., 1993; Watson et al., 2005). Les voies de signalisation des récepteurs couplés à Gq ou Gi et en aval du récepteur GPVI ou de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ne seront pas détaillées ici (Clemetson and Clemetson, 2004; Dowal and Flaumenhaft, ; Watson et al., 2005). Leur point commun est de déclencher ou de favoriser la mobilisation calcique (Varga-Szabo et al., 2009). Les changements morphologiques tels que l'émission de filopodes sont déjà observés pour de petites variations calciques et sont inhibés par l'introduction de chélateurs du calcium. Les effecteurs menant à la mobilisation calcique sont bien connus, mais le lien avec le réarrangement du cytosquelette d'actine n'est pas clairement établi. Les effecteurs les plus souvent proposés sont les

GTPases de la famille Rho et des protéines du cytosquelette comme la filamine qui peuvent se lier aux récepteurs.

Les protéines en amont de la signalisation calcique telles que Syk, PLCgamma2 et src kinases ont été décrites pour réguler l'émission de filopodes dans des expériences d'adhésion utilisant des souris KO ou des inhibiteurs pharmacologiques (Inoue et al., 2006; Mangin et al., 2003). PKC $\delta$  a également été décrite pour exercer un effet inhibiteur sur la formation des filopodes après adhésion des plaquettes sur collagène (Pula et al., 2006). Cependant, l'émission de filopodes dans cette étude correspond probablement à une étape qui succède à l'étalement des plaquettes et non à celle précoce qui suit immédiatement l'adhésion. Les nucléotides cycliques (AMPc ou GMPc) interviennent également de manière négative en inhibant le changement de forme des plaquettes lors de l'activation par des agonistes solubles (ADP, Thrombine). De manière surprenante, il a été montré que la PGE1, qui augmente le taux d'AMPc, n'inhiberait pas l'émission de filopodes après adhésion des plaquettes sur FW ou fibrinogène (Savage et al., 1992), des résultats que nous avons confirmés lors de ce travail (Cf Chapitre Résultats Annexe 2).

Les autres protéines importantes pour l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ou l'agrégation comme PI3kinase ne semblent pas jouer de rôle majeur dans l'émission de filopodes. En effet, des inhibiteurs de PI3kinase comme LY294002 et Wortmannin n'empêchent pas l'émission de filopodes après adhésion sur fibrinogène ou sur FW (Yuan et al., 1999).

Concernant la signalisation GPIb-V-IX, une de ses caractéristiques est la production de pics calciques transitoires et de faibles amplitudes, contrairement aux signaux plus soutenus avec d'autres agonistes ou récepteurs d'adhésion. Cette particularité suggère l'existence d'une signalisation distincte, spécifique de GPIb n'impliquant pas des effecteurs communs à d'autres voies.

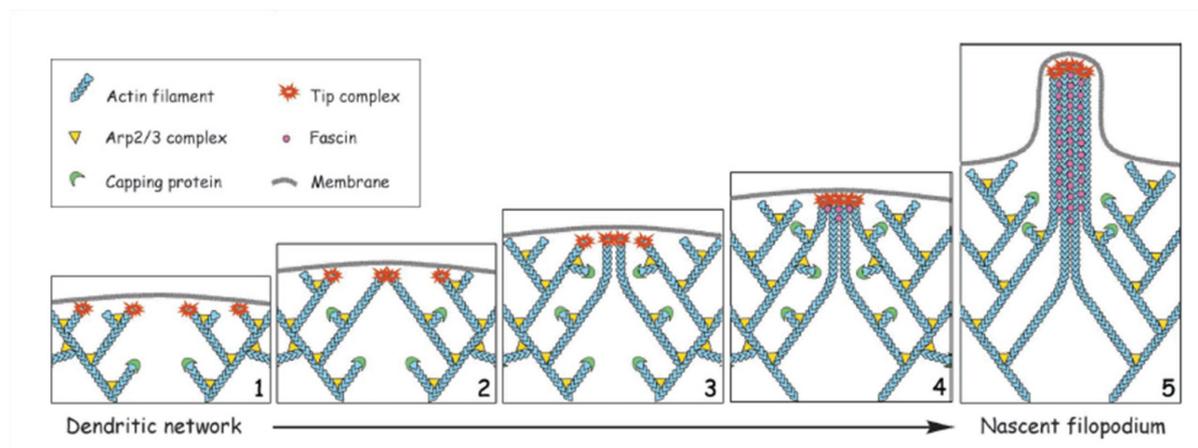
## **2) Dans d'autres types cellulaires**

### **2.1 Mécanismes généraux**

L'extension des filopodes est observée dans de nombreuses cellules où elle participe à diverses fonctions comme la migration, l'adhésion, ou la formation des cônes de croissance des neurones. Les filopodes servent également à sonder le milieu environnant permettant aux cellules de capter des signaux moléculaires plus ou moins proches d'elles.

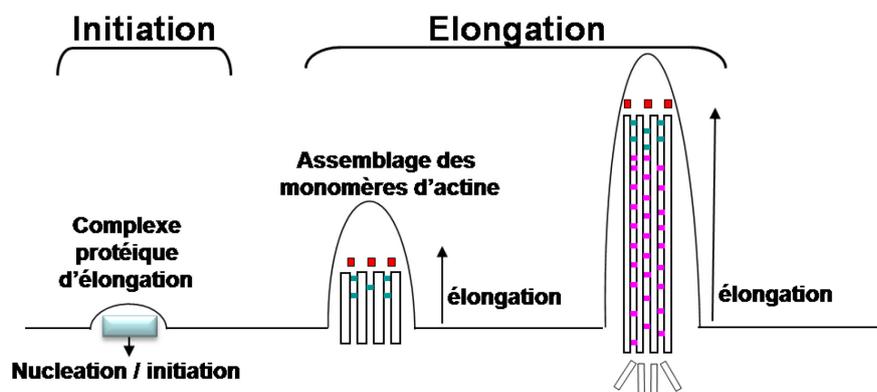
Plusieurs mécanismes ont été décrits dans la littérature. La diversité des acteurs moléculaires et leurs différents rôles selon le type cellulaire complique l'établissement d'un mécanisme unifié comme l'attestent les différents modèles proposés dans la littérature (Faix and Rottner, 2006; Gupton and Gertler, 2007; Mattila and Lappalainen, 2008).

Un premier modèle, dit d'élongation convergente, propose la formation de filopodes à partir de lamellipodes existants (Figure 20). Dans ce modèle, les filaments parallèles d'actine-F sont issus du réseau orthogonal des lamellipodes (Svitkina et al., 2003). Ce processus nécessite la formation d'un complexe appelé « Tips complex » qui est composé de protéines anti-coiffe, telle que VASP (Vasodilator-Stimulated-Phosphoprotein), et de stabilisation telle que la fascine. Le rôle de VASP a été mis en évidence, par une analyse en temps réel de cellules où VASP a été rendue fluorescente par couplage avec la GFP. VASP est connu pour se fixer au niveau des extrémités en brosse de polymérisation d'actine et pour favoriser l'élongation (Bear et al., 2002; Rottner et al., 1999).



**Figure 20 Formation de filopodes : modèle de l'élongation convergente.** Réseau de lamellipodes composé de branchements orthogonaux de filaments d'actine F dépendant du complexe Arp2/3 (1). Les extrémités portent des protéines de coiffe (VASP) ou des complexes protéiques d'élongation (Tip complex) (2). La rencontre de ces extrémités rapproche (3) et regroupe (4) plusieurs complexes protéiques d'élongation qui après recrutement de protéines de stabilisation des filaments d'actine parallèles telles que la fascine entraîne l'extension des filopodes naissants(5) (Svitkina et al., 2003).

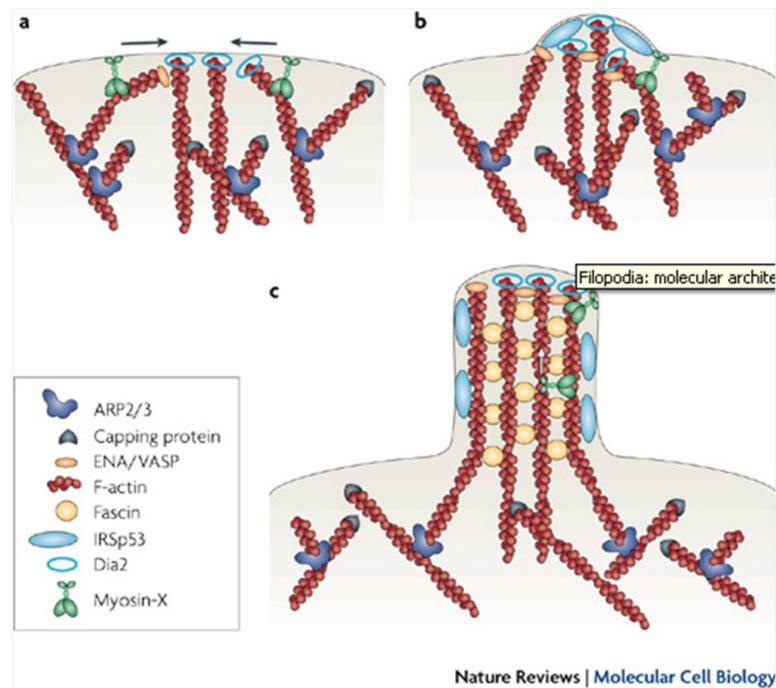
Un deuxième modèle de nucléation « de novo » propose la formation d'un complexe de nucléation au niveau de la membrane plasmique composé d'un complexe protéique d'élongation permettant la formation de filaments d'actine (Figure 21) (Faix and Rottner, 2006; Mattila and Lappalainen, 2008; Medalia et al., 2007). Ce mécanisme est indépendant du réseau préexistant constituant les lamellipodes et de la présence du complexe Arp2/3. En effet, les cellules déficientes pour Arp2/3, qui sont incapables de former des lamellipodes, émettent toujours des filopodes (Steffen et al., 2006). Les protéines Ena/VASP, mais essentiellement mDia2, ont été observées au niveau du complexe protéique d'élongation et seraient impliquées dans ce modèle (Dent et al., 2007; Faix and Rottner, 2006).



**Figure 21** Formation de filopodes : modèle de nucléation « de novo » des filaments d'actine Les filaments se forment à partir d'un complexe protéique d'élongation situé à proximité de la membrane plasmique. Cette étape de nucléation est indépendante des filaments d'actine préexistants. L'élongation se poursuit avec mDia2 et Ena/VASP qui ont permis l'initiation et des protéines de stabilisations telles que la fascine sont recrutées pour maintenir le réseau parallèle d'actine (Faix and Rottner, 2006).

Un modèle plus récent dérivant du modèle d'élongation convergente a été proposé (Figure 22). Il propose que l'émission de filopodes soit initiée par la convergence de filaments d'actine possédant une extrémité libre ou coiffée par des protéines de l'élongation telles que mDia2 ou ENA/VASP. La convergence des filaments d'actine au niveau de la membrane plasmique est alors assurée par une protéine motrice la Myosine X (Tokuo et al., 2007). La membrane plasmique se déforme sous la force de l'élongation des filaments d'actine. Ce phénomène est accentué par l'intervention de la protéine

IRSp53. Les filaments sont stabilisés par la présence de Fascine. La myosine X semble également avoir un rôle dans la migration des protéines à l'extrémité du filopode (Tokuo and Ikebe, 2004).



**Figure 22 Formation de filopodes : évolution du modèle d'élongation convergente** Ce modèle décrit les fonctions des protéines clés impliquées dans les différentes étapes de l'émission de filopodes. (a) Des filaments d'actine à l'extrémité libre ou coiffée par mDia2 ou ENA/VASP convergent grâce à la myosine X. (b) Déformation de la membrane plasmique via l'élongation des filaments d'actine et avec l'aide de IRSp53. (c) Incorporation de la fascine, formation de filaments d'actines parallèles stabilisés (Mattila and Lappalainen, 2008).

Il est à noter que la fonction des protéines impliquées dans l'émission de filopodes varie d'un type cellulaire à un autre, voire d'un organisme à un autre. Ceci peut expliquer les morphologies et dynamiques de protrusions membranaires différentes selon les types cellulaires. Dans la plaquette sanguine l'analyse des changements morphologiques en temps réel montre que les filopodes ne se forment pas à partir de lamellipodes. Les filopodes sont observés avant la formation des lamellipodes lors de l'adhésion des plaquettes sur une surface. Les filopodes sont également observés en suspension alors que la formation de lamellipodes nécessite une surface. D'après ces différents arguments, il semblerait que le mécanisme d'émission de filopodes plaquettaires soit plus proche du mécanisme de nucléation « de novo » des filaments d'actines (Figure 21).

## 2.2 Protéines impliquées

De nombreuses protéines ont été décrites pour être localisées dans les filopodes et pour jouer un rôle dans leur émission. Certaines sont spécifiques d'un type cellulaire mais une majorité est impliquée dans plusieurs types cellulaires. Le tableau ci-dessous recense, de manière non exhaustive, ces protéines classées par grandes fonctions (Figure 23).

Kinases	GTPases	Protéines réorganisatrices du cytosquelette	Autres types de protéines
- c-Abl (1) - PKC $\delta$ (2) - PAK1,4,5 (3)	- Rac 1 (4) - Ral A (5,6) - Cdc42 (7,8,9) - TC10 (10) - Wrch1 (11) - Rif (12) - RhoD (13)	- ENA/VASP (14,15,16) - Profiline (16) - WASP/WAVE (17,18) - Filamine 1 (6) - Complexe Arp 2/3 (19) - Moesine (20) - mDia2 (21) - Fascine (22) - IRSp53 (23,24)	- Dok1 (1) - Nck (1) - Abi1 (25) - Vav (26) - LPR1 (27) - myosine X (28,29)

**Figure 23** Protéines impliquées dans l'émission de filopodes dans différents types cellulaires (Cf Références à la fin du manuscrit)

Ces protéines présentent des propriétés distinctes et agissent à des niveaux et dans des réponses qui varient selon le type cellulaire. Elles représentent des candidats potentiels dans l'émission de filopodes plaquettaires.

Dans le travail de thèse ont été principalement étudiées des protéines déjà connues pour être présentes dans la plaquette.

### 2.2.1 Kinases

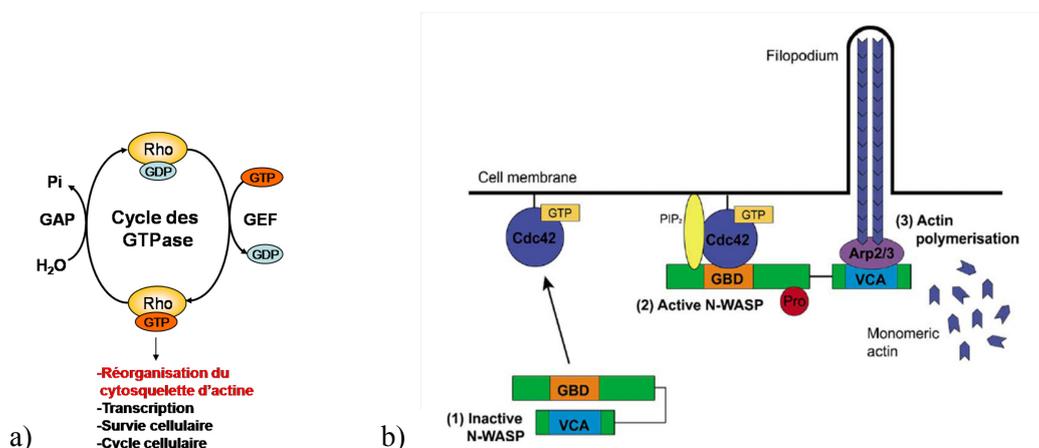
Parmi les kinases, seule PKC $\delta$  a déjà été étudiée dans l'émission de filopodes plaquettaires. Un rôle régulateur négatif a été proposé sur l'étude de souris déficientes pour PKC $\delta$  et l'adhésion sur une matrice de collagène (Pula et al., 2006). Dans cette étude, les filopodes sont observées dans une

étape qui suit l'étalement, qui ne semble pas correspondre au modèle de nucléation « de novo » (figure 21) mais plutôt au modèle de l'élongation convergente (Figure 20).

### 2.2.2 GTPases

La GTPase Rac1 fait partie de la famille des Rho GTPases constituée également de Cdc42, Rho (A, B, C) et RhoD (Rif, RhoD). Le rôle de Rac1 a été évalué dans l'adhésion sur fibrinogène où les plaquettes de souris déficientes pour Rac1 restent capables d'émettre des filopodes (McCarty et al., 2005) (cf chapitre II) C) 1)). Par contre, Rac1 est indispensable à la formation des lamellipodes impliquant un rôle en aval de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.

Cdc42 a été décrit pour son rôle dans la formation de filopodes (Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995) dans des études montrant l'émission de longs et nombreux filopodes dynamiques après microinjection de la forme active de Cdc42 dans des cellules Swiss 3T3 (Wood and Martin, 2002).



**Figure 24 a) Cycle d'activation des GTPases ; b) Implication de Cdc42 dans l'émission de filopodes (Wood and Martin, 2002)**

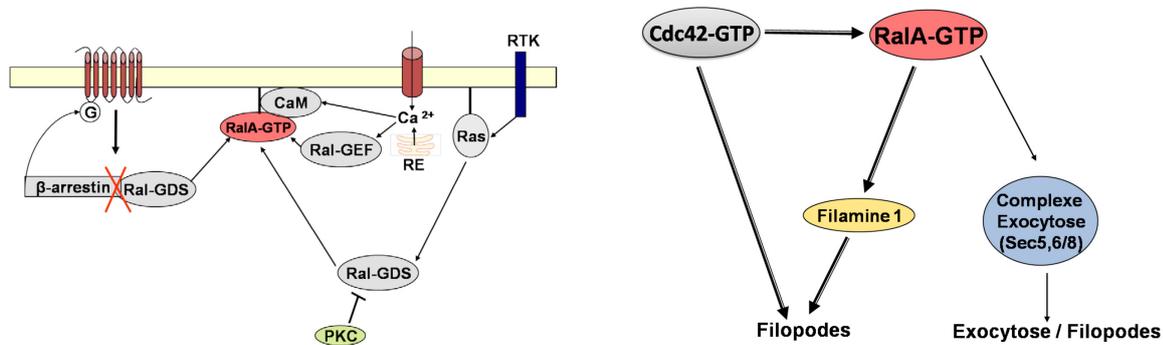
Dans le mécanisme proposé, Cdc42 lié au GTP interagit avec le domaine GBD de N-WASP entraînant, en présence de PIP<sub>2</sub>, son activation par libération du domaine VCA qui peut se lier et activer le complexe Arp2/3. L'activation du complexe Arp2/3 permet la nucléation et la polymérisation de nouveaux filaments d'actine entraînant la formation de filopodes (Figure 24 b). Ce mécanisme pourrait s'accorder au modèle de l'élongation convergente. Un autre mécanisme fait

intervenir la protéine IRSp53 qui dans son état inactif lie Cdc42-GTP (Krugmann et al., 2001). Cette interaction active IRSp53 qui peut alors interagir avec des protéines impliquées dans la polymérisation d'actine telles que Ena/VASP.

Cdc42 est présent dans la plaquette où un rôle dans l'émission de filopodes a été montré lors de l'adhésion sur collagène ou laminine grâce à un inhibiteur sélectif, la sécramine A (Chang et al., 2005; Pula et al., 2006). L'implication plus générale de Cdc42 dans les fonctions plaquettaires est également suggérée par son activation par différents agonistes plaquettaires (Thrombine, TRAP et convulxine) et par la capacité de Cdc42-GTP de se relocaliser au niveau du cytosquelette d'actine (Barkalow et al., 2003; Vidal et al., 2002). Dans la plaquette, il a également été proposé que la sous-unité GPIIb du complexe GPIIb-V-IX régule l'activation de Cdc42 en séquestrant la 14-3-3ζ (Bialkowska et al., 2003).

RalA est une GTPase de la famille Ras dont l'activation et l'inactivation sont, comme Cdc42, contrôlées par des GAPs et des GEFs. Il est décrit que RalA est activée en liant la calmoduline lors de l'augmentation de calcium intracellulaire (Clough et al., 2002). La formation d'un complexe RalA/Beta-Arrestine couplé aux RCPG permet également l'activation de RalA par les GEFs (Feig, 2003). RalA s'active aussi en aval des récepteurs RTK via l'activation de Ras (Figure 25 a). RalA a été localisée au niveau vésiculaire et interviendrait dans les processus d'exo- et d'endocytose (Vitale et al., 2005). RalA a également été impliqué dans l'émission de filopodes, en interagissant d'une part avec la filamine 1, et d'autre part avec les protéines impliquées dans l'exocytose telles que sec5 et sec8 (Figure 25 b) (Ohta et al., 1999; Sugihara et al., 2002). La microinjection de RalA dans des cellules Swiss 3T3 entraîne l'émission de filopodes et l'ajout d'une forme constitutivement inactive l'inhibe. L'implication de la filamine 1 dans ce processus a été mise en évidence dans une lignée de mélanocytes (cellules M2) déficiente en filamine dans laquelle la forme constitutivement active de RalA n'entraîne pas d'émission de filopodes. Ce défaut est annulé par l'addition d'une filamine recombinante. RalA semble agir en aval de Cdc42 car l'effet positif du dominant actif Cdc42-GTP est bloqué après ajout du dominant inactif RalA-GDP. RalA est présent dans la plaquette où elle est

activée par plusieurs agonistes (Thrombine, TRAP, analogue du TXA2 : U46619, ADP) (Wolthuis et al., 1998). L'activation de RalA par la thrombine semble être calcium dépendante et requiert l'interaction de RalA avec la calmoduline (Clough et al., 2002). Le rôle de RalA dans l'émission de filopodes plaquettaire n'a encore jamais été évalué.



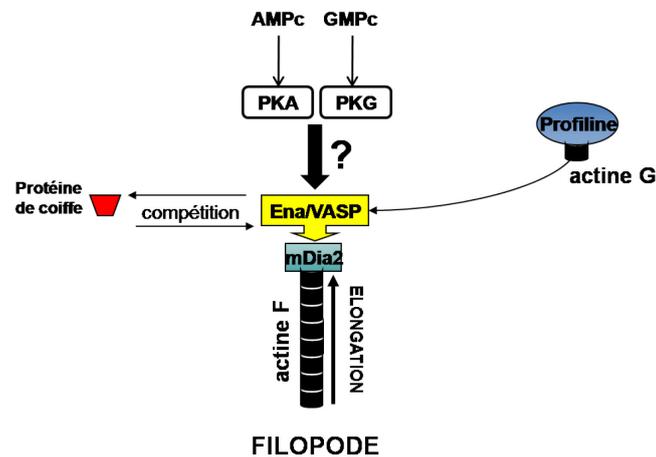
**Figure 25** a) Différents modes d'activation de RalA ; b) Cdc42 et RalA dans l'émission de filopodes

D'autres GTPases telles que TC10, Wrch1, Rif et RhoD ont également été évoquées dans l'émission de filopodes de manière moins systématique et souvent dans un seul type cellulaire.

### 2.2.3 Ena/VASP

VASP, Mena et EVL (Ena-VASP-like) appartiennent à la famille Ena/VASP et sont exprimées chez les mammifères (Schirenbeck et al., 2006). Elles sont caractérisées par la présence de domaines EVH1 et EVH2 (Ena/VASP homology 1 et 2) et d'un domaine central riche en proline (Krause et al., 2003; Kwiatkowski et al., 2003). Le domaine EVH2 permet la liaison à l'actine G et F. VASP se trouve à l'extrémité des filopodes et régule la polymérisation d'actine en empêchant les protéines de coiffe de se fixer à l'extrémité en brosse des filaments d'actine, en favorisant la nucléation et la fixation des monomères d'actine (Applewhite et al., 2007; Barzik et al., 2005). VASP recrute ces monomères aux extrémités du filopode en se liant à la profiline. L'implication de VASP dans l'émission de filopodes a essentiellement été montrée en utilisant des mutants et notamment le domaine EVH2 tronqué (Applewhite et al., 2007). De plus, VASP interagit avec des protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine telles que la zyxine et la vinculine et également avec d'autres protéines impliquées dans l'émission de filopodes telles que mDia2 et c-Abl

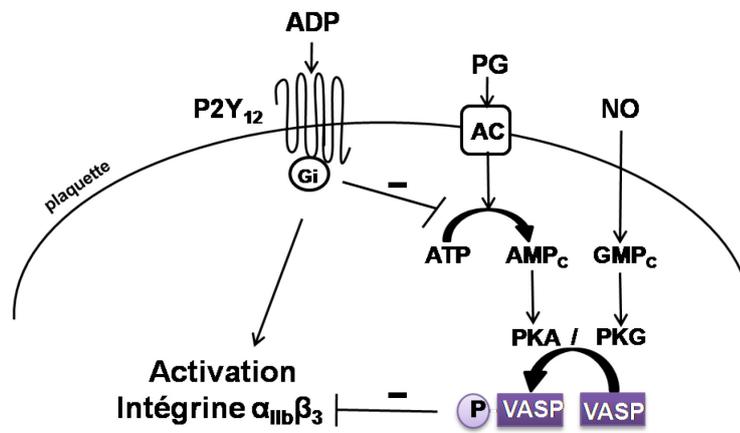
(Schirenbeck et al., 2005). VASP est phosphorylée par la PKA (Protein kinase A) et la PKG (Protein kinase G) qui sont activées respectivement par l'AMPc et le GMPc (Figure 26). PKA et PKG phosphorylent VASP sur les résidus Ser-157, Ser-239 et Thr-278. L'impact de ces phosphorylations dans l'émission de filopodes n'a pas encore été clairement établi.



**Figure 26** Implication et régulation de VASP dans l'émission de filopodes

Dans la plaquette, seules EVL et VASP sont présentes. La phosphorylation de VASP est régulée via la voie Gs qui active l'adénylate cyclase et la PKA. Cette voie est inhibée lors de l'activation des plaquettes par l'ADP, via P2Y12 et Gi (Figure 27). VASP phosphorylée est utilisée en clinique cardiovasculaire comme marqueur de l'efficacité du traitement par le clopidogrel (Plavix®), un antagoniste du récepteur P2Y12. VASP a été décrit pour participer à l'inhibition de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. En effet, les plaquettes de souris déficientes pour VASP présentent une agrégation, une sécrétion et une liaison de fibrinogène légèrement augmentées en comparaison aux souris sauvages. Cette augmentation des réponses est plus nettement visible lorsque les plaquettes VASP<sup>-/-</sup> sont évaluées dans des conditions où les taux d'AMPc et de GMPc sont augmentés par l'addition de PGE1 et de donneur de NO (Aszodi et al., 1999; Kawato et al., 2008). Le rôle de VASP dans l'émission de filopodes plaquettaire a été évoqué dans une étude centrée sur PKC $\delta$  (Pula et al., 2006) (Annexe 2). Les plaquettes de souris PKC $\delta$ <sup>-/-</sup> ou traitées par du Rottlerin (inhibiteur de PKC) émettent plus de filopodes que les plaquettes de souris sauvages après adhésion sur une matrice de collagène. Dans les

plaquettes de souris VASP<sup>-/-</sup>, l'augmentation de l'émission de filopodes précédemment obtenue avec le Rottlerin, n'est plus observée.



**Figure 27** Régulation de la phosphorylation de VASP dans la plaquette et rôle de VASP dans l'activation plaquettaire



## **But du travail**



### **III) But du travail et approches expérimentales**

Les acteurs moléculaires et les voies impliqués dans l'émission de filopodes, dans la plaquette, sont très mal connus. L'objectif de cette thèse a été de mieux comprendre ces mécanismes i) en cherchant à préciser la voie de signalisation induite par l'interaction du complexe GPIb-V-IX plaquettaire avec le FW et ii) en étudiant, dans la plaquette, le rôle de protéines connues pour être impliquées dans l'émission de filopodes dans d'autres types cellulaires.

Plusieurs systèmes d'activation ont été utilisés incluant l'adhésion au FW et également la réponse après adhésion sur fibrinogène et activation par des agonistes solubles (ADP, thrombine...) qui toutes entraînent la formation de filopodes. Ce travail s'est appuyé sur l'utilisation de modèles murins (KO, KI) complétée quand cela était possible par l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des différentes protéines étudiées. Pour les protéines ne pouvant pas être étudiées dans la plaquette, des cellules transfectées par le complexe GPIb-IX plaquettaire ont été développées permettant l'extinction par ARN interférent.

Afin d'optimiser l'étude de l'adhésion et de la signalisation dépendante du complexe GPIb-V-IX dans les plaquettes de souris, un modèle plus performant a été développé avec un FW murin recombinant. En effet, les plaquettes de souris sont moins réactives que les plaquettes humaines sur FW humain.

Les résultats ont été subdivisés en sont fonction des différentes familles de protéines étudiées: les kinases, les GTPases, la famille Ena/VASP et la protéine motrice Myosine IIA.

L'implication de Lyn et Btk, deux tyrosines kinases connues pour interagir avec le complexe GPIb-V-IX et qui pourraient agir directement en aval du récepteur, a été évaluée grâce à l'utilisation de souris dans lequel le gène a été inactivé. Le rôle de Lyn a été également étudié dans une lignée de souris Lyn<sup>up/up</sup> qui exprime la kinase sous une forme constitutivement active.

La sérine thréonine kinase PKC a également été retenue car elle a été décrite pour inhiber l'émission de filopodes après adhésion des plaquettes sur une matrice de collagène (Pula et al., 2006)

bien que cette émission de filopodes se distingue de celle observée sur FW. Son rôle dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendant a été étudié en utilisant le Rottlerin.

Parmi les GTPases décrites pour réguler le cytosquelette d'actine, Cdc42 paraissait la plus intéressante au vu de son implication dans l'émission de filopodes dans d'autres types cellulaires. Son rôle a été évalué en utilisant un inhibiteur pharmacologique la Secramine A et surtout dans les souris déficientes pour Cdc42 spécifiquement dans la lignée plaquettaire (Cdc42<sup>-/-</sup>) (**Annexe 1**).

Rac1 et RhoA ont également été évaluées. Ces deux GTPases sont connues pour leur rôle respectif dans la formation des lamellipodes et des fibres de stress, mais ont été également impliquées dans l'émission de filopodes. Le rôle de Rac1 a été évalué grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de Rac1, le NSC 23766, et l'utilisation de plaquettes de souris déficientes spécifiquement au niveau de la lignée mégacaryocytaire (Rac1<sup>-/-</sup>). Le rôle de RhoA a été étudié dans des souris déficientes pour RhoA spécifiquement dans la lignée plaquettaire (RhoA<sup>-/-</sup>).

RalA est impliquée dans le trafic vésiculaire mais également dans l'émission de filopodes. La forme GTP-RalA a été décrite pour interagir avec la Filamine 1, un partenaire du complexe GPIb-V-IX dans la plaquette. En l'absence d'inhibiteurs sélectifs et de souris transgéniques, son implication dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante a été évaluée grâce à des ARN interférent (shRNA) dans un lignée cellulaire transfectée par le complexe GPIb-IX.

VASP participe à l'élongation des filaments d'actine en empêchant la présence de protéines de coiffe à l'extrémité des filaments d'actine et a été décrite dans plusieurs types cellulaires pour favoriser la formation des filopodes. Afin d'évaluer son rôle dans l'émission de filopodes plaquettaire des souris déficientes pour VASP ont été utilisées (**Annexe 2**).

L'émission de filopodes s'accompagnant d'une contraction du corps plaquettaire, nous avons également évalué le rôle de la Myosine IIA. La Myosine IIA interagit avec l'actine pour former le complexe acto-myosine. Le laboratoire ayant développé une lignée de souris qui n'exprime plus la

myosine IIA dans la lignée plaquettaire (MYH9 $\Delta$ ), les plaquettes de ces souris ont été évaluées sur leur capacité à se contracter et émettre des filopodes après adhésion au FW.



## **Matériel et Méthodes**



## **IV) Matériel et Méthodes :**

### **A) Matériel**

Les plaques 4 puits sont fournies par Dutscher (Brumath, France). L'albumine de sérum bovin utilisée pour l'adhésion, le sodium dodécyl sulfate (SDS), le tampon de migration (0,25 M Tris, 1,92 M Glycine, 0,1% SDS pH 8,3) et le tampon de transfert (0,25 M Tris, 1,92 M Glycine pH 8,3) proviennent de la société Euromedex (Souffelweyersheim, France). L'albumine de sérum humain 20% utilisée pour le lavage des plaquettes est fournie par Octapharma (Lachen, Suisse). Le Reopro® ou abciximab, provient du laboratoire Lilly (Indianapolis, IN, USA). L'Intégrilin® ou eptifibatide vient de Schering-Plough (Kenilworth, NJ, USA). La botrocétine a été purifiée au laboratoire à partir du venin de serpent *Bothrops jararaca* fourni par la société Latoxan (Valence, France) selon le protocole de *Andrews et al* (Andrews et al., 1989). Le FW humain a été purifié au laboratoire à partir de concentré de facteur VIII provenant de l'EFS-Alsace (Strasbourg, France) selon le protocole décrit par Chopek et al. (Chopek et al., 1986). Le FW a été couplé FITC au laboratoire. L'apyrase a été produite au laboratoire à partir de pommes de terre selon la méthode de Cazenave et al. (Cazenave et al., 2004). Le fibrinogène humain, la thrombine bovine, l'héparine, la poly-L-lysine, l'analogue du thromboxane A2 (U46619), la prostaglandine E1 (PGE<sub>1</sub>), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), la phalloïdine-TRITC, le tampon HEPES, le Glucose (D+), l'ADP, la phénanthroline, la saponine, le DMSO, le Dithiothreitol (DTT), la blasticidine, le NGS (Normal Goat Serum) sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Les lamelles de verre de diamètre de 12 mm, le paraformaldéhyde (PFA), le glutaraldéhyde, la colle carbone et les supports pour lamelle (plots) proviennent de chez Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA). L'Acide citrate dextrose (ACD) conservé à pH 4,5 est fourni par Bioluz (St Jean-de-Luz, France). Le Mowiol et la calpeptine ont été obtenus chez Calbiochem (San Diego, CA, USA). Le chlorure de sodium (NaCl), de magnésium (MgCl<sub>2</sub>), de calcium (CaCl<sub>2</sub>), le méthanol, le Triton X-100, le Tween-20, l'hexaméthylidisilazane (HMDS), le cacodylate, le sucrose sont fournis par Merck (Darmstadt, Allemagne). Le chlorure de potassium (KCl), le bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>), le dihydrogénophosphate de sodium (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et le chlorure de fer III (FeCl<sub>3</sub>) proviennent de VWR

Prolabo (West Chester, PA, USA). Le PBS Dulbecco's et le DIOC<sub>6</sub> proviennent de la société Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Le collagène Horm® provient de Nycomed-Pharma (Constance, Allemagne). Le mélange d'inhibiteurs de protéases (EDTA 1 mM, inhibiteurs de pronase, de thermolysine, de chymotrypsine, de trypsine et de papaïne) a été fourni par Roche (Fontenay-sous-Bois, France). Le tampon Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH6,8, 25% glycérol, 2% SDS, 0,01% bleu de bromophénol) et les gels de polyacrylamides 4-15% proviennent de Bio-rad SA (Ivry sur Seine, France). Les membranes de PVDF ont été obtenues chez Millipore (Billerica, MA, USA). La solution d'électrochimiluminescence (ECL) et les protéines G-sépharose sont achetées chez Amersham Biosciences (Uppsala, Suède). Les composés 8-pCPT-cGMP et Sp-5,6-DCI-cBIMPS ont été obtenus chez Biolog Life Sciences Institute (Bremen, Allemagne). Le CRP (collagen-related peptide) a été donné par Richard Farndale (University of Cambridge, UK). Le FW murin, le FW murin ΔRGD et les cellules BHK exprimant ces deux protéines, ont été donnés par Peter Lenting et Cécile Denis (Paris, France). L'ultrosor G provient de Pall Corporation (NY, USA). L'O-sialoglyco-endopeptidase a été obtenue chez Cerdalane (Hornby, Canada). Le peptide PAR4 (Protease activated receptor 4) provient de NeoMPS (San Diego, USA). Les milieux de culture RPMI et D-MEM (+Glucose), PSG 1% (penicilline-streptomycine- glutamine), la Généticine (G418), la Zéocine, le vecteur d'expression pZeo proviennent de Gibco Invitrogen (San Diego, USA). Les bactéries XL2 blue proviennent de Stratagene (USA). Les vecteurs pDX contenant l'ADNc codant pour les sous-unités GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  ou GPIX ont été donnés par le Dr J Lopez (Seattle, USA). L'hygromycine B, l'agent de transfection Fugene 6 ont été fournis par Roche Molecular Biochemichals (Mannheim, Allemagne). Les vecteurs pGIPZ Lentiviral shRNAmir non silencing et RalA et l'Arrestin ont été obtenus chez OpenBiosystem (USA). La purification des vecteurs shRNA a été réalisée avec des kit « endofree » de Macherey Nagel (USA). La purification des vecteurs pDX a été réalisée avec des kit « endofree » de QiAgen (Valencia, USA). Le sérum de veau fœtal provient de Bio West (USA).

Les anticorps ALMA.12 dirigé contre la GPIb $\alpha$  humaine, RAM.1et RAM.1-Alexa488 dirigé contre la GPIb $\beta$  humaine, ALMA.16 dirigé contre GPIX humaines ont été développés dans le laboratoire. MOPC-31 est fourni par Sigma-Aldrich. L'IgG non immun d'origine murine utilisé

comme contrôle isotypique de l'immunoprécipitation, les anticorps anti-Ra1A et anti-Cdc42 proviennent de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA). L'anticorps anti-actine AC40 provient de abcam (USA). L'anticorps 14-3-3 a été obtenu chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). L'anticorps MAB1678 dirigé contre la Filamine A provient de Chemicon International Inc / Millipore (Billerica, MA, USA). L'Anticorps anti-FW humain utilisé pour l'adhésion a été obtenu chez Dako (Glostrup, Danemark). Les anticorps XiaB2 et XiaG5-FITC dirigés contre la GPIIb $\alpha$  murine sont fournis par Emfret (Wurzburg, Allemagne). Les anticorps secondaires de chèvre couplés à la peroxydase (HRP : HorseRadish Peroxydase) et dirigés contre les IgG de lapin (GAR-HRP) ou contre les IgG de souris (GAM-HRP) ainsi que les anticorps secondaires de chèvre couplés au fluorophore Cy2 ou Cy3 et dirigés contre les IgG de souris (GAM-Cy2 ou GAM-Cy3) proviennent de Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA). L'anticorps anti- P-sélectine-FITC provient de Pharmingen (San Diego, USA). Le fibrinogène-FITC et l'anticorps JONA-PE ont été obtenus chez Emfret (Wurzburg, Allemagne).

## **B) Etudes plaquettaires**

### **1) Inhibiteurs**

L'inhibiteur de src kinases, PP2 et l'inhibiteur des Phospholipases C (PLC), U73122 ainsi que leur contrôle non inhibiteur respectif, PP3 et U73343 proviennent de Calbiochem (San Diego, CA, USA). L'inhibiteur de Cdc42, Secramine A, a été généreusement donné par Kirchhausen Laboratory (Harvard Medical School) et Hammond Lab (University of Louisville) et synthétisé par Bo Xu et G.B Hammond (Xu et al., 2006). L'inhibiteur de PKC $\delta$ , Rottlerin, provient de Upstate Cell Signalling (NY, USA). L'inhibiteur de Rac1, NSC23766, provient de Tocris Bioscience (Missouri, USA).

### **2) Modèles murins**

Le maintien des différentes colonies de souris est effectué par l'animalerie de l'Etablissement Français du Sang d'Alsace (EFS-Alsace) sauf précision.

**C57Bl6** : Cette lignée contrôle nous est fournie par Charles River (L'Abresles, France).

**Lyn<sup>up/up</sup>**: Une mutation gain de fonction, Y508F (up), de Lyn a été introduite par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires de souris. Les souris Lyn<sup>+/+</sup> sont issues du croisement de souris Lyn<sup>+/up</sup> (Harder et al., 2001). Ces lignées ont été données par Margaret L. Hibbs (Melbourne, Australia). Le génotype de ces souris est vérifié par PCR.

**Lyn<sup>-/-</sup>**: Le gène codant de *Lyn* a été interrompu par l'insertion d'un vecteur PKGNeo par recombinaison homologue (Hibbs et al., 1995). Cette lignée a été donnée par Margaret L. Hibbs (Melbourne, Australia). Le génotype de ces souris est vérifié par PCR.

**CBA/CaJ**: Cette lignée contrôle nous a été fournie par le Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA).

**CBA/CaHN-Btk<sup>Xid</sup>**: Ces souris ont une mutation récessive spontanée R28C sur le gène de la tyrosine kinase *BTK* (Bruton's tyrosine kinase) qui abolit son activité kinase. Elles représentent un modèle d'immunodéficiences lié à X (Xid). Cette lignée nous a été fournie par le Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA).

**Cdc42<sup>-/-</sup>**: Ces souris n'expriment pas Cdc42 spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire après croisement des souris où le gène *Cdc42* est flanqué par des sites loxP (Cdc42<sup>fl</sup>) avec des souris exprimant Cre sous contrôle du promoteur PF4 (PF4-cre<sup>+</sup>). Les souris Cdc42<sup>+/+</sup> contrôles sont issues du croisement de souris Cdc42<sup>-/+</sup>. Cette lignée a été obtenue auprès de B. Nieswandt (Wurzburg, Allemagne) (Wu et al., 2006) (Annexe 1).

**Rac1<sup>-/-</sup>**: Ces souris n'expriment pas Rac1 spécifiquement dans les lignées hématopoïétiques après croisement des souris où le gène *Rac1* est flanqué par des sites loxP (Rac1<sup>fl</sup>) avec des souris exprimant Cre sous contrôle du promoteur Mx (Mx-cre<sup>+</sup>). La délétion du gène Rac1 se fait sur des souris âgées de 5 à 6 semaines par deux injections intraperitonéales de 200 µg d'acide polyinosinic-polycytidylique (pIpC) à deux jours d'intervalle. 10 jours après la dernière injection, l'expression de Rac1 est analysée par Western Blot. Les souris Rac1<sup>+/+</sup> contrôles sont issues du croisement de souris

Rac1<sup>-/+</sup> et ont subit le même traitement. Cette lignée a été obtenue auprès de B. Nieswandt (Wurzburg, Allemagne) (Pleines et al., 2009).

**Cdc42/Rac1<sup>-/-</sup>**: Ces souris sont doublement invalidées pour Rac1 et Cdc42 spécifiquement dans les lignées hématopoïétiques après croisement des souris où les gènes *Rac1* et *Cdc42* sont flanqués par des sites loxP (Rac1<sup>fl</sup> et Cdc42<sup>fl</sup>) avec des souris exprimant Cre sous contrôle du promoteur Mx (Mx-cre+). Cette lignée a été obtenue auprès de B. Nieswandt (Wurzburg, Allemagne).

**RhoA<sup>-/-</sup>**: Ces souris n'expriment pas RhoA spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire et sont construites avec la même méthode que les souris Cdc42<sup>-/-</sup>. Cette lignée a été obtenue auprès de B. Nieswandt (Wurzburg, Allemagne).

**VASP<sup>-/-</sup>**: Le gène codant pour *VASP* a été interrompu par intégration ciblée d'un vecteur PKG/néo par recombinaison homologue au niveau de l'intron 3 entraînant la délétion des exons 4 à 11 et l'incapacité de coder pour le domaine central riche en proline ainsi que le domaine EVH2 de VASP. Cette lignée a été donnée par U. Walter (Wurzburg, Allemagne). Le génotype de ces souris est vérifié par PCR (Hauser et al., 1999) (Annexe 2).

**MYH9<sup>-/-</sup>**: Ces souris n'expriment pas la myosine IIA, qui est codée par le gène *MYH9*, spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire. Ces souris sont obtenues avec la même méthode que pour les souris Cdc42<sup>-/-</sup>. Cette lignée a été créée au laboratoire de l'EFS-Alsace (Leon et al., 2007)

### **3) Prélèvement et lavage des plaquettes**

Le prélèvement de sang humain est effectué sur des donneurs sains à l'EFS-Alsace site de Strasbourg. Les donneurs n'ont pas pris de médicament affectant les fonctions plaquettaires les deux semaines précédant le don. Le prélèvement dans la souris est effectué à partir de l'aorte abdominale. Dans les deux cas le sang est anticoagulé avec de l'acide citrate dextrose (ACD) (1 volume pour 6 volumes de sang).

La technique de lavage permet de séparer les plaquettes des autres éléments sanguins selon la méthode décrite par Cazenave et al (Cazenave et al., 2004). Le lavage s'effectue à 37°C. Le sang prélevé sur ACD attend 10 min au repos puis est centrifugé à 250 g pendant 16 min (humain) ou à

2300 g pendant 1 min (souris) (centrifugeuse Sorvall RC3BP rotor H6000). Les plaquettes sont récupérées à partir du plasma riche en plaquettes (PRP) qui est laissé 10 min au repos puis centrifugé à 2 200 g pendant 10 min (humain) ou 4 min (souris). Le culot plaquettaire est repris en tampon Tyrode-albumine (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 M HEPES, 0,35% (m/v) d'albumine plasmatique humaine, 5,5 mM de glucose (D+)), en présence de PGI<sub>2</sub> (0,5 µM) et d'héparine (10 U/ml). Les plaquettes sont ensuite lavées deux fois par centrifugation à 1 900 g pendant 8 min (humain) ou 3 min (souris), en présence de 0,5 µM de PGI<sub>2</sub> avant la centrifugation et après la resuspension. Le culot plaquettaire est repris à 300 000 plaquettes/µl en Tyrode-albumine 0,35% contenant de l'apyrase (0,02 U/ml).

#### **4) Activation en suspension**

100 µl de suspension plaquettaire (300 000 pl/µl) sont incubés pendant 10 min à 37°C avec du Reopro (40 µg/ml) ou de l'Integrilin (40 µg/ml) respectivement pour les plaquettes humaines et de souris. Les plaquettes sont ensuite activées, à 37°C et sans agitation, par un agoniste plaquettaire pendant 30 secondes ou 2 minutes, selon l'agoniste. Pour stopper l'activation, les plaquettes sont fixées avec 100 µl de glutaraldéhyde 2,5% pendant 1h à 37°C. Les échantillons sont préparés pour l'observation en microscopie électronique.

#### **5) Agrégation**

L'agrégation est mesurée à 37°C par une méthode turbidimétrique à l'aide d'un agrégomètre double piste Payton (Payton Associates, Scarborough, Ontario, Canada). L'agrégation est quantifiée en mesurant de façon continue la transmission d'un faisceau lumineux à travers une cuvette contenant la suspension plaquettaire. Aux 450 µl de suspension plaquettaire (300 000 pl/µl) sont ajoutés les différents agonistes sous agitation constante à 1100 rpm en présence de fibrinogène humain (0,8 mg/ml). L'amplitude de l'agrégation est évaluée en mesurant le maximum de la transmission lumineuse par rapport à la ligne de base.

#### **6) Cytométrie de flux (FACS)**

##### **➤ Liaison de FW après clivage de la GPIbα**

Des plaquettes de souris sauvages lavées sont incubées à 37°C pendant 30 min avec de l'O-sialoglycoprotéine endopeptidase (48 µg/ml) dans du tampon Tyrode albumine. Après lavage des plaquettes avec du Tyrode albumine contenant 7.5 nM de PGI<sub>2</sub>, elles sont resuspendues à une numération de 4 x 10<sup>8</sup> pl/ml dans du Tyrode albumine. Le clivage de la GPIIb $\alpha$  est évalué en incubant 2 µl de plaquettes pendant 15 min à température ambiante avec l'anticorps XiaG5 couplé au fluorophore FITC (5 µg/ml). La capacité de liaison de FW est évaluée en mesurant la liaison du FW couplé au fluorophore Cy2 (10 µg/ml) en présence de botrocétine (5 U/ml) pendant 15 min. Les résultats sont exprimés en % de la moyenne de fluorescence en comparaison avec les plaquettes non traitées par l'enzyme.

➤ **Liaison de fibrinogène, activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et exposition de P-sélectine**

La liaison de fibrinogène, l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et l'exposition de P-sélectine sont étudiées en cytométrie de flux grâce respectivement à l'utilisation de fibrinogène-FITC, de l'anticorps JONA-PE et de P-sélectine-FITC. Une suspension de plaquettes lavées (50 000 pl/µl) est activée par de l'ADP (10 µM), de la thrombine (0,25U/ml ou 1 U/ml), du CRP (10 µg/ml), du PAR-4 (750 µM), du collagène (100 µg/ml), ou de la convulxine (15 nM) à différents temps et fixée au PFA 2% pendant 20 min. Après une centrifugation de 2 min à 4000 g, le surnageant est resuspendu dans 500 µl de PBS et la fluorescence est quantifiée par cytométrie de flux.

### **7) Temps de saignement**

Des souris mâles ou femelles (20-25g) sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane. L'extrémité de la queue est coupée avec un scalpel à 3mm et immédiatement mise dans une solution d'eau physiologique (0,9% saline isotonic) à 37°C. Le temps de saignement est défini lorsque la queue s'arrête de saigner.

### **8) Thrombose après lésion au FeCl<sub>3</sub>**

Des souris de 6 à 12 semaines sont anesthésiées avec un mélange Rompun-Imalgene 100 µl/10g de souris i.p. (proportion 1 volume Rompun, 1 volume Imalgène, NaCl qsp 10 volume).

L'animal est placé en position dorsale sur une plaque chauffante réglée à 37°C. L'approche de la carotide se fait par une incision médiane dans la région ventrale du cou. La carotide gauche est disséquée le long de la trachée. Le DIOC-6, marqueur fluorescent, est injecté à la dose de 100µl/20g de souris (100µM, dilué en NaCl) en veine jugulaire. Un rectangle de plastique noir opaque est placé sous la carotide pour protéger les tissus environnants du FeCl<sub>3</sub>. 0,2 µl de FeCl<sub>3</sub> (7,5%) sont déposés sur un morceau de papier Whatman n°1 (1 mm de diamètre), le papier est ensuite déposé délicatement sur la carotide. Au bout de 2 min, le papier imbibé de FeCl<sub>3</sub> est retiré et la carotide est rincée en liquide physiologique. L'enregistrement de la thrombose est effectué grâce au logiciel d'acquisition MetaView pendant 15 min, avec les paramètres d'acquisition suivants : filtre 1, objectif 5, bague 0,57, temps d'exposition 100 ms, binning 2, acquisition d'une image par seconde. Au bout de 15 min, l'animal est euthanasié.

### **9) Immunoprécipitation et immunoempreinte**

Les lysats plaquettaires sont préparés à partir de 10<sup>6</sup> plaquettes reprises dans 1µl de tampon de lyse contenant 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2,5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 10 mM Tris, pH 7,5, 17 g/ml de calpeptine, phénantroline et le cocktail d'inhibiteurs de protéases. Après 20 min de lyse, les lysats sont centrifugés à 14 000g pendant 15 min pour enlever la fraction insoluble. Le lysat est « clearé » deux fois par incubation de 60 min à 4°C avec 50 µl de protéine G Sepharose 4 Fast Flow (vol/vol). Les protéines sont ensuite immunoprécipitées à partir de 50 µl de lysat « clearé » par addition de 5 µg d'anticorps et 40 µl de protéine G sepharose pendant 1 heure à 4°C et sous agitation. Les billes sont lavées 3 fois au PBS contenant 1% de Triton X-100 avant l'addition de 25 µl de tampon Laemmli 1X en présence de 10 mM de DTT. Les échantillons sont bouillis 5 min et les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide SDS de 4-15% et transférées sur une membrane de PVDF. Après saturation avec 5 % de solution de lait pendant 1 h, la membrane a été incubée successivement avec les anticorps anti-Cdc42 (1/250), pendant la nuit à 4°C puis lavée et révélée pendant 1h avec un anticorps GAM-HRP (1/20 000) à température ambiante et le kit de détection ECL. La membrane a ensuite été nettoyée avec un agent décapant la membrane « stripping ». Après une nouvelle saturation de la membrane celle-ci a été incubée avec un anticorps

anti-actine (1/250) pendant 1h puis la membrane est lavée et révélée pendant 1 h avec un anticorps GAM-HRP (1/20 000) à température ambiante et le kit de détection ECL.

## C) Lignées cellulaires

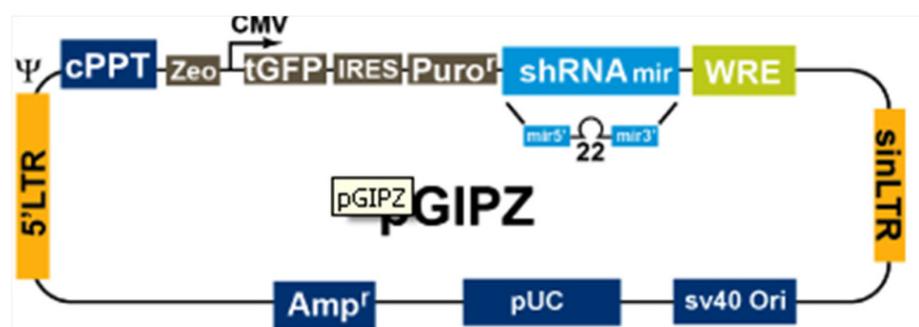
### 1) Transfection du complexe GPIb-IX dans les cellules HEK

Les cellules HEK (Human Embryonic Kidney) sont cultivées dans du D-MEM avec 20 % SVF. L'obtention des HEK exprimant le complexe GPIb-V-IX s'est faite en deux étapes successives de transfection et sélection sur antibiotiques avec 1) la transfection stable avec l'agent de transfection Fugene 6 des vecteurs pDX contenant l'ADNc des sous-unités GPIb $\beta$  et GPIX en association avec les vecteurs portant la résistance aux antibiotiques pcDNA3 et pDR<sub>2</sub> (1  $\mu$ g d'ADN total), 2) la transfection stable avec l'agent de transfection Fugene 6 des vecteurs pDXGPIb $\alpha$  et pZeo dans les HEK<sup>GPIb-IX</sup>. Les cellules positives pour les 3 sous-unités du complexe ont été sélectionnées par l'ajout d'antibiotique de sélection 200  $\mu$ g/ml de Zéocine, 150  $\mu$ g/ml d'hygromycine B et 500  $\mu$ g/ml de Geneticine (G418). Les plasmides ont été transformés dans des bactéries XL2 blue et purifiés avec le kit « endofree » de QiAgen.

### 2) shRNA

#### 2.1 Transfection stable des shRNA

Les shRNA sont insérés dans un vecteur pGIPZ lentiviral (voir schéma ci-dessous) qui porte la résistance à la puromycine et exprime la protéine GFP. Ces vecteurs ont été purifiés avec un kit « endofree » de Macherey-Nagel.



Les cellules HEK<sup>GPIb-IX</sup> ont été transfectées de manière stable par les shRNA non silencing et RalA avec l'agent de transfection Arrestin. La sélection des cellules positives pour chaque shRNA a été réalisée sur la positivité de la GFP de cellules cultivées en présence de puromycine. La confirmation de l'inhibition de RalA dans les lignées GFP a été effectuée par immuno-empreinte.

## 2.2 Lysats cellulaires et immunoempreinte

Les cellules adhérentes HEK<sup>GPIb-IX</sup>, HEK<sup>GPIb-IX</sup>/RalA<sup>-</sup> et HEK<sup>GPIb-IX</sup>/NS sont détachées par aspiration et refoulement avec du PBS. Les lysats sont préparés en reprenant les cellules (10<sup>6</sup> cellules/ml) dans un tampon de lyse 1% Triton X-100 en présence de cocktail inhibiteur (cf lysat plaquettes). Après 20 min de lyse, les lysats ont été centrifugés à 14 000g pendant 15 min pour enlever la fraction insoluble. 20 µg de protéines en tampon Laemmli sont déposés sur un gel de polyacrylamide SDS de 4-15% et transférées sur une membrane PVDF. Après saturation avec 5 % de solution de lait pendant 1 h, la membrane a été incubée successivement par 10 µg/ml d'anticorps anti-RalA pendant la nuit à 4°C puis lavée et révélée pendant 1h avec un anticorps GAM-HRP (1/20 000) à température ambiante et le kit de détection ECL. La membrane a ensuite été décapée pour une nouvelle révélation avec un anticorps anti-actine (1/250) de la même façon que précédemment.

### D) Adhésion statique

La technique d'adhésion des plaquettes sur FW humain, murin ou murin ΔRGD est décrite dans la partie A) des Résultats (Figure 26). Les FW murins recombinants sont issues de surnageants de culture de cellules BHK, cultivées sans sérum mais avec un substitut l'Ultrosor G (2%).

Les cellules HEK<sup>GPIb-IX</sup> (10<sup>6</sup> cellules/ml) sont mises à adhérer sur du FW humain (10 µg/ml) en présence de Réopro (40 µg/ml) et de botrocétine (2 µg/ml). Après 30 min d'adhésion à 37°C, les cellules sont lavées avec du PBS et fixées avec du PFA 4% pendant 20 min.

Adhésion sur fibrinogène : des lamelles sont incubées pendant 2 h à température ambiante avec du fibrinogène (100 µg/ml) puis saturées avec 1% de BSA pendant 1 h et lavées au PBS. 300 µl de suspension plaquettaire à 30 000 pl/µl sont déposés sur les lamelles pendant 1 h lorsqu'il y a activation

préalable à l'ADP ou sans activation, et pendant 30 min avec activation par la thrombine. Les plaquettes sont ensuite fixées puis lavées au PBS.

## **E) Microscopie**

### **1) Contraste Interférentiel Différentiel**

Les plaquettes humaines observées en Contraste Interférentiel Différentiel (DIC) sont préalablement fixées avec du PFA 4% pendant 20 min puis lavées 3 fois au PBS et 1 fois à l'eau distillée. La lamelle est montée sur une lame avec 9 µl de Mowiol. Les lames sont mises à sécher toute la nuit et sont observées le lendemain au plus tard avec un microscope inversé à épifluorescence Leica DMI 4000 B avec un objectif à immersion à huile HCX PL APO 63x, N=1,518, alpha= 70° (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne). Les images sont prises à l'aide d'un capteur CCD (CoolSNAP HQ Monochrome, Photometrics, Tucson, AZ, USA) et analysées avec les logiciels d'imagerie MetaMorph (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA)

### **2) Microscopie Confocale**

Les plaquettes et les cellules observées en microscopie confocale sont lavées et fixées avec du PFA 4% pendant 20 min. Les échantillons sont lavés et marqués avec la phalloïdine-TRITC (0,5%) ou l'anticorps RAM.1-A488 (1µg/ml) pendant 30 à température ambiante. Une fois marqués, les échantillons sont observés avec un microscope confocal (microscopie laser à balayage) Zeiss LSM 510 inversé équipé d'un objectif à immersion à huile 63x, na=1,4.

### **3) Microscopie électronique à balayage**

Les plaquettes de souris observées en microscopie électronique à balayage sont fixées avec du glutaraldéhyde 2,5% dilué en tampon cacodylate (0,1 M sodium cacodylate, 2% sucrose, pH 7,3, 305 mOsm/Kg) pendant 1h à 37°C puis lavées 3 fois avec du tampon cacodylate et 1 fois à l'eau distillée. Les échantillons sont ensuite déshydratés par des lavages successifs de 5 min avec des solutions d'éthanol de concentrations croissantes, puis avec de l'hexadimethyldisilazane. Les lamelles sont montées sur un support avec de la colle à carbone et recouvert d'une couche de particule d'or. Les échantillons sont ensuite observés à 1750x avec un microscope électronique à balayage (Fei, Sirion,

Eindhoven, The Netherlands, 5 kV). 5 différents champs de la lamelle sont considérés pour une surface de  $9215 \mu\text{m}^2$ .

## **F) Analyse statistique**

Les figures histogrammes ou graphes ainsi que les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism (Logi Labo, Paris, France). Les tests statistiques effectués sur les différences +/- SEM ont été évalués avec le test t de Student ou le test Mann-Whitney. Les valeurs de  $p < 0,05^*$ ,  $< 0,01^{**}$  ou  $< 0,001^{***}$  sont considérées comme significatives.

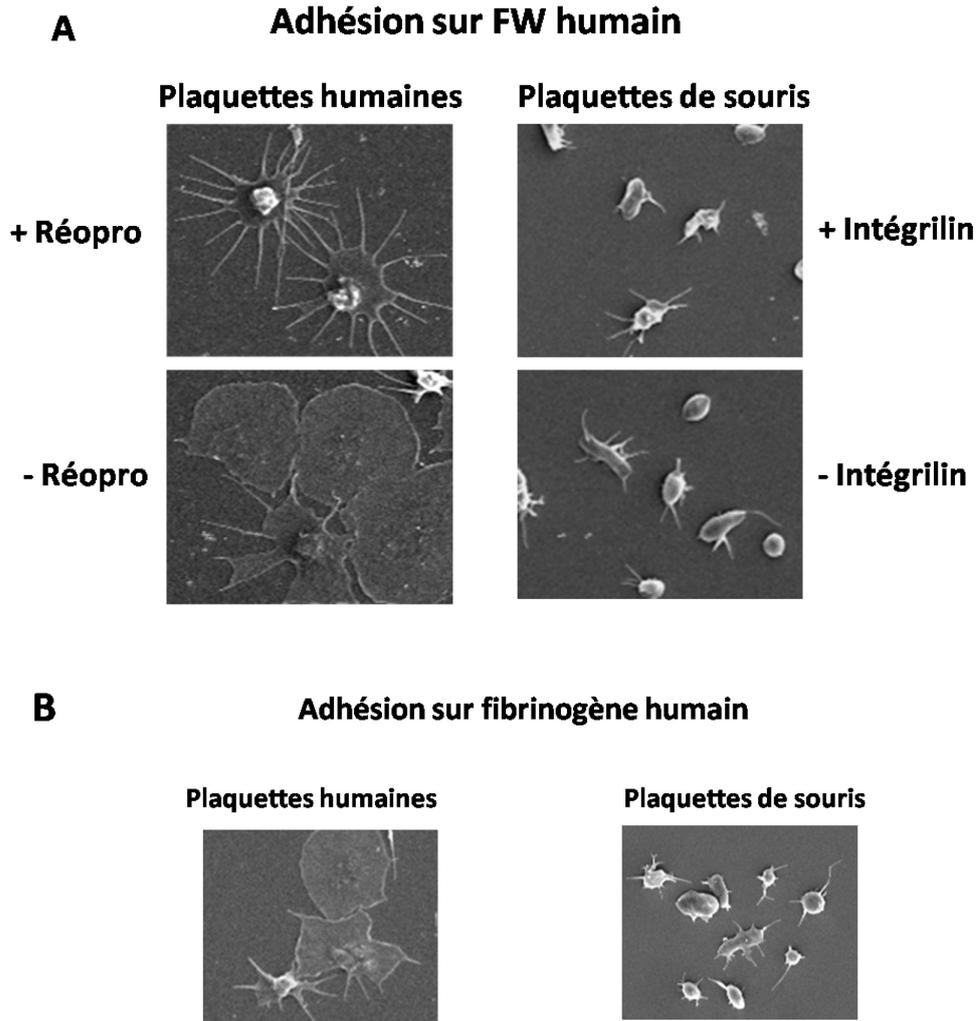
# **Résultats Expérimentaux**



## **V) Résultats expérimentaux :**

### **A) Systèmes d'étude du changement de forme**

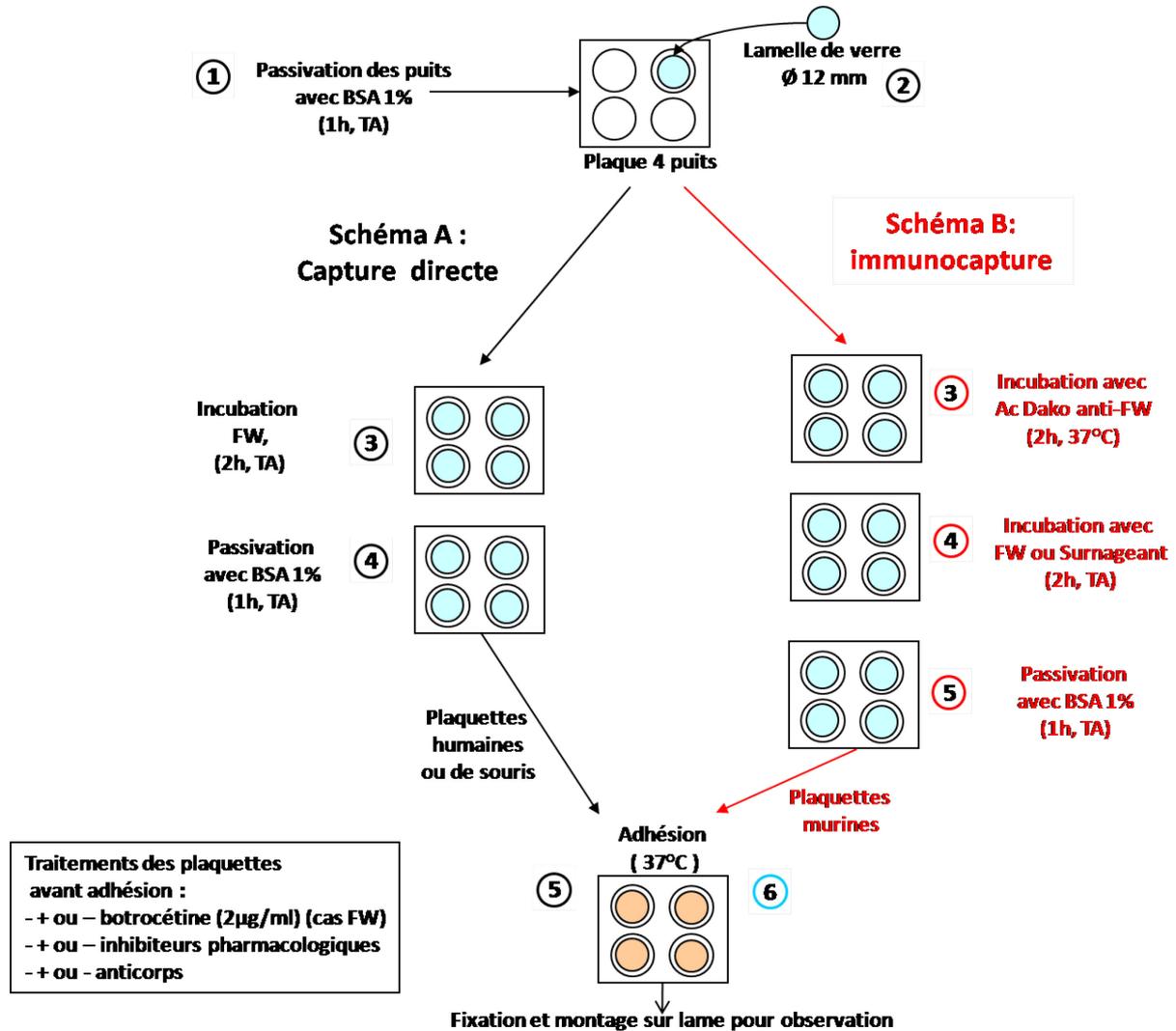
L'étude des filopodes est classiquement réalisée au laboratoire après adhésion sur une surface recouverte de FW humain. Dans ces conditions, les plaquettes humaines et murines ne présentent pas le même type de changements de formes. Les plaquettes humaines se contractent, émettent de nombreux filopodes puis forment des lamellipodes et s'étalent complètement (Figure 28). Ces dernières étapes traduisent l'engagement de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  par un mécanisme d'activation dit « inside-out » et une activation dite « outside-in » engagée par le FW immobilisé. Lorsque l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  est inhibée par le Réopro, les plaquettes humaines ne s'étalent plus sur FW. Dans ce même système d'adhésion, les plaquettes murines sont incapables de s'étaler et présentent une même contraction mais une émission de filopodes diminuée (Figure 28 A). Sur fibrinogène, les plaquettes humaines n'ont pas besoin de préstimulation par un agoniste soluble tels que l'ADP ou la thrombine pour s'étaler. Par contre, les plaquettes murines émettent des filopodes mais peu de lamellipodes. L'étalement est obtenu si les plaquettes murines sont préstimulées par l'ADP ou par la thrombine (Figure 28 B).



**Figure 28** Changements morphologiques de plaquettes humaines et murines, après adhésion sur FW (10 µg/ml) ou fibrinogène (100 µg/ml) humain, en présence ou non de botrocétine (2 µg/ml) avec ou sans inhibition de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 par le Réopro (plaquettes humaines) ou l'Intégrilin (plaquettes murines) (40 µg/ml). Adhésion pendant 20 ou 60 min à 37°C.

Les différences de réponse au FW pourraient s'expliquer par une moindre réactivité des plaquettes murines sur le FW humain. Ce projet s'appuyant essentiellement sur des modèles murins il a paru important de disposer d'un système d'activation plus performant qui se rapproche si possible de la réponse des plaquettes humaines. Pour cela, nous avons mis au point une adhésion de plaquettes murines sur un FW murin. Le FW étant difficile à obtenir à partir de plasma de souris, nous avons utilisé un FW recombinant produit par des cellules BHK (FW murin) transfectées par l'ADNc codant

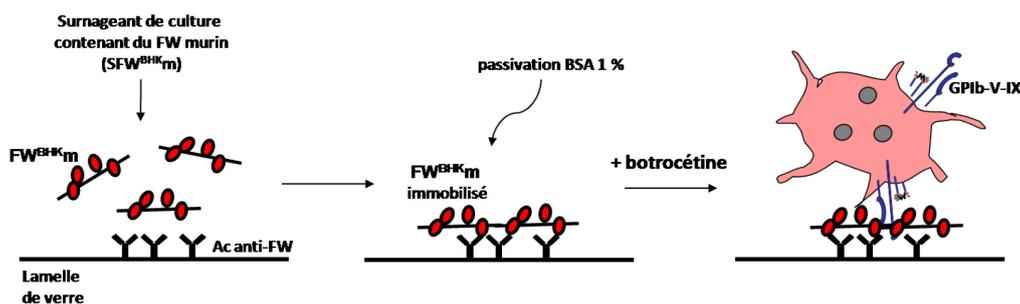
le FW murin. La mise au point et la caractérisation de ce système d'adhésion sont abordées dans ce chapitre. La technique d'adhésion est détaillée dans la figure 29.



**Figure 29** Système d'adhésion sur FW adapté aux plaquettes murines. Adhésion statique avec ou sans immunocapture du FW. Les lamelles de verre déposées dans les plaques 4 puits passivées par la BSA sont incubées A) pendant 2 h à température ambiante (TA), avec 300 µl de FW humain purifié (10 µg/ml) ou de surnageant de cellules BHK contenant du FW murin (10 µg/ml) B) 300 µl d'anticorps anti-FW humain (Dako, Denmark) à 6,2 µg/ml pendant 2 h à 37°C, lavées, puis recouvertes par 300 µl de FW humain purifié (10 µg/ml) ou de surnageant (10 µg/ml) pendant 2h à TA. Les lamelles sont lavées et passivées avec 300 µl de BSA 1% pendant 1 h à TA. Après lavage, 300 µl de plaquettes humaines ou murines (30 000 pl/µl) sont mises au contact de la surface adhésive, lavées puis fixées avec du PFA 4% pour observations en microscopie DIC ou confocale ou avec du glutaraldéhyde 2,5 % pour la microscopie électronique à balayage.

Après adsorption de la protéine adhésive, la surface est passivée avec de la BSA pour limiter l'adhésion sur du verre. En condition statique, l'adhésion sur FW nécessite l'addition d'un inducteur qui permet l'interaction avec le complexe GPIb-V-IX. L'immobilisation ne suffit pas à elle seule pour permettre une capture efficace des plaquettes, contrairement aux conditions de flux. L'inducteur le plus efficace est la botrocétine qui est purifiée au laboratoire à partir du venin du serpent *Bothrops Jaraca*. La botrocétine interagit avec le domaine A1 du FW, entraînant une augmentation de l'affinité pour la GPIb $\alpha$  (les détails du mécanisme sont décrits dans (Fukuda et al., 2002)). La capture directe a été utilisée pour le FW humain, et a également été testée avec le surnageant de culture contenant le FW murin (FWm). Dans ce cas l'adhésion et l'activation des plaquettes sont moins efficaces (Figure 31 A) *b vs d*, B)). Le surnageant contient d'autres protéines provenant du milieu de culture et potentiellement sécrétées par les cellules. Afin de les éliminer et également pour concentrer le FWm sur la surface, celui-ci a été immunocapturé à partir du surnageant (Figure 30 et Figure 29 schéma B).

L'immunocapture du FWm est réalisée par un anticorps polyclonal anti-FW humain (Dako) qui reconnaît également le FW murin. Une gamme de concentrations, de températures et de temps d'incubation ont été évalués pour déterminer les conditions optimales d'adsorption qui sont une incubation de 6,2  $\mu\text{g/ml}$  d'anticorps à 37°C pendant 2 h, suivie de l'addition du surnageant de culture pendant 2 h à température ambiante et d'une étape de passivation avec de la BSA.

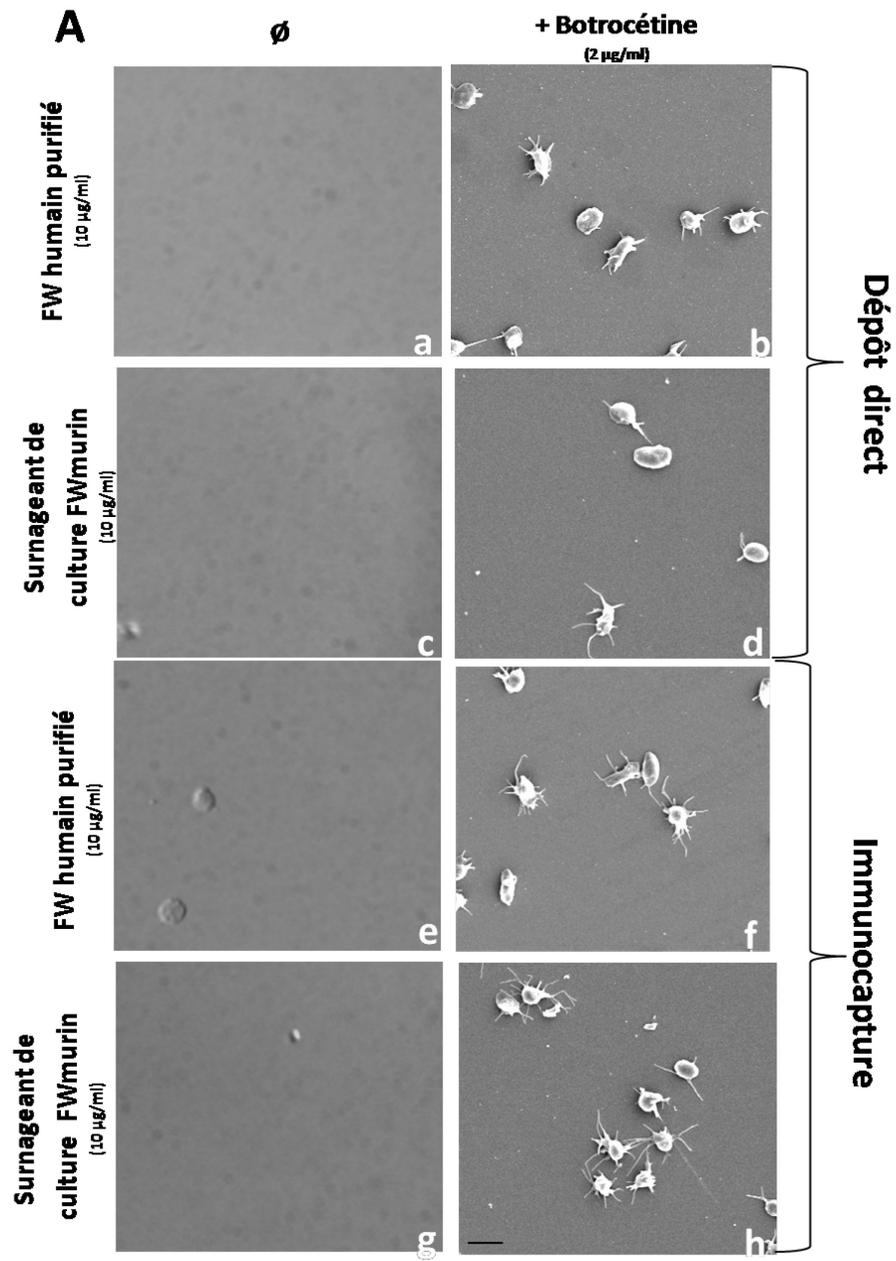


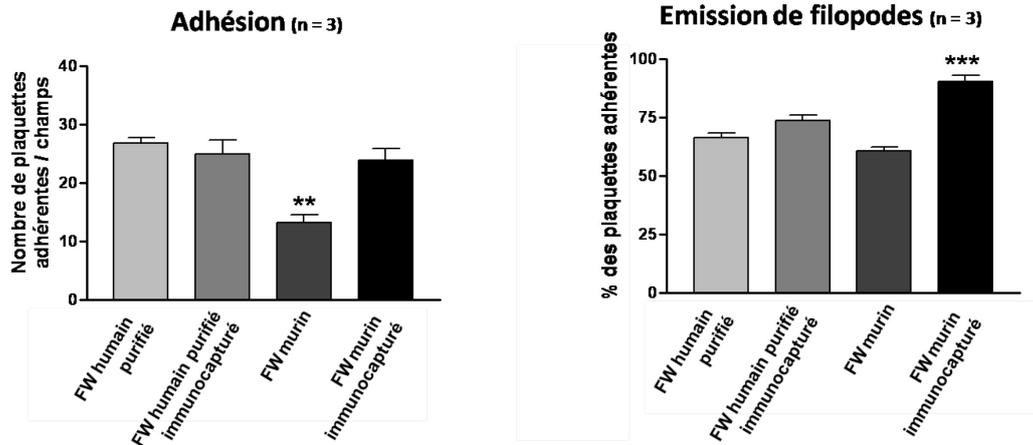
**Figure 30.** Système d'adhésion après immunocapture de FWm selon la méthode de la figure 29.

Lorsque le FW murin est immunocapturé (Figure 31 A) *h*), les plaquettes adhèrent en nombre comparable à celles adhérant sur FW humain purifié (Figure 31 A) *b*), par contre un plus grand

nombre de plaquettes émettent des filopodes. Le pourcentage atteint 95% des plaquettes adhérentes sur FWm immunocapturé (Figure 31 B) contre 72% pour le FW humain. Ce résultat montre donc une activation plus efficace du FW murin vis-à-vis des plaquettes murines. Bien que la densité du FWm sur la surface après immunocapture soit difficile à quantifier, elle paraît comparable à celle obtenue en déposant 10 µg/ml de FW humain au vu de l'adhésion identique. Cette adhésion semble spécifique de l'interaction FW/GPIb-V-IX car elle n'est pas observée en absence de botrocétine (Figure 31 A) g).

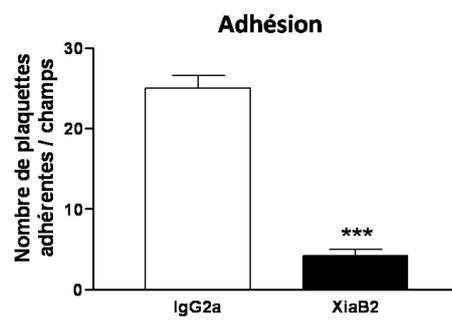
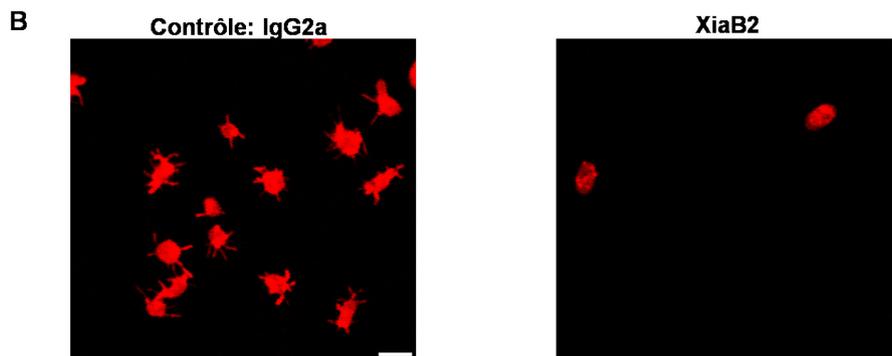
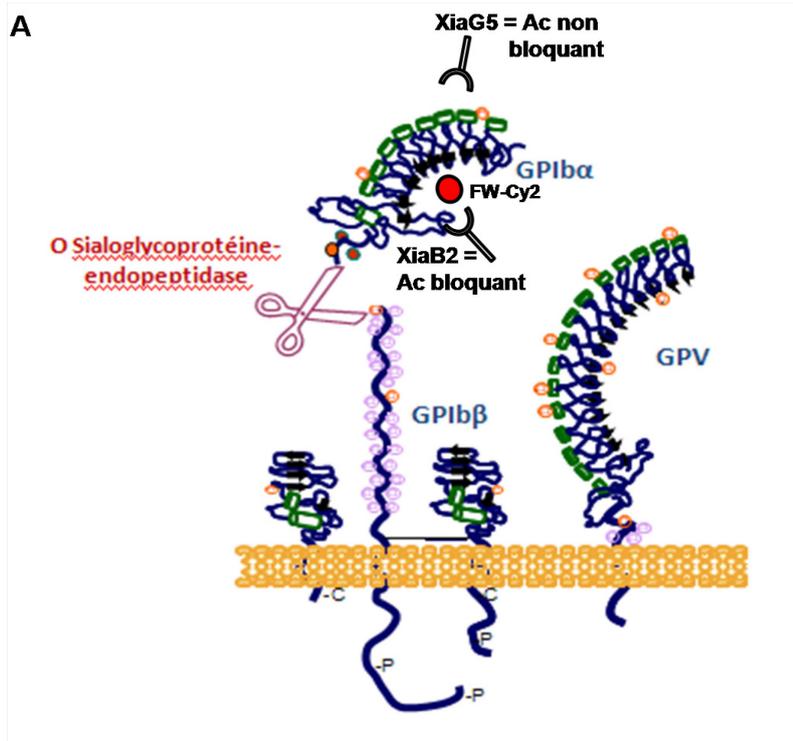
En cas de dépôt direct du surnageant de culture FWm, une faible adhésion des plaquettes est observée ainsi qu'une moindre émission de filopodes par comparaison à l'immunocapture (Figure 31 *b* vs *d*, B). L'adhésion et l'activation sur FW humain immunocapturé ou non est similaire (Figure 31 A) *f* vs *b*, B) indiquant que l'anticorps ne modifie pas les propriétés du FW ni son interaction avec le complexe GPIb-V-IX.

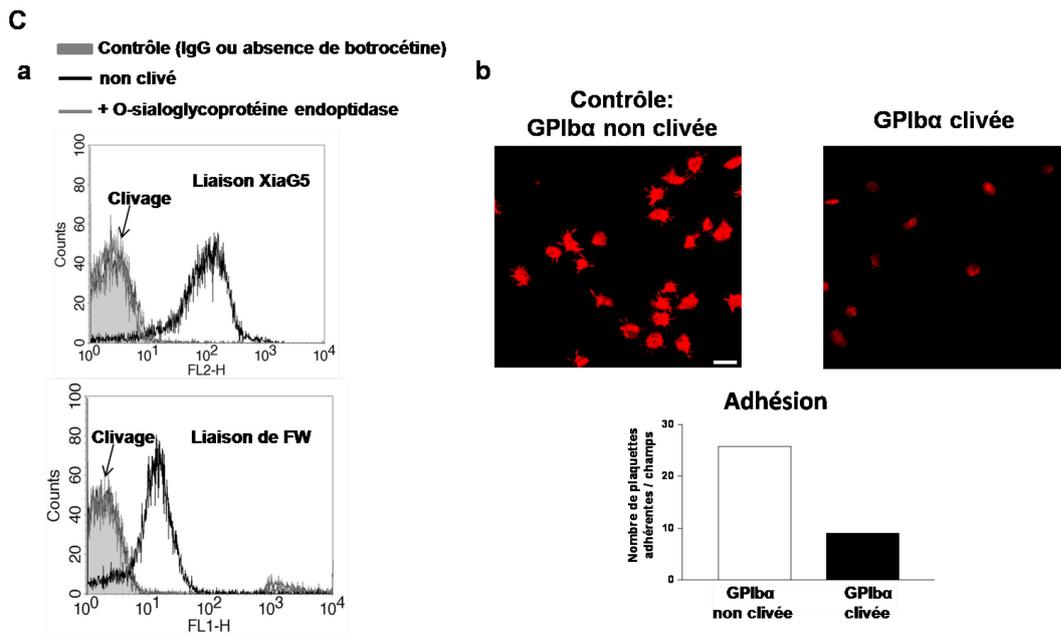


**B**

**Figure 31 Adhésion et activation des plaquettes de souris sur une surface recouverte de FW humain ou murin.** (A) 300  $\mu$ l d'une suspension de plaquettes lavées de souris (30 000 pl/ $\mu$ l) ont été incubées avec 40  $\mu$ g/ml d'Intégrilin pendant 10 min à 37°C puis mises à adhérer pendant 20 min sur une surface recouverte directement de 10  $\mu$ g/ml FW humain purifié ou de surnageant de FW murin en absence (*a et c*) ou en présence de 2  $\mu$ g/ml botrocétine (*b et d*), ou sur une surface recouverte de FW humain ou murin immunocapturé (*e- h*). Après lavage, les échantillons sont fixés au glutaraldéhyde 2,5 % et préparés pour l'observation en microscopie électronique à balayage (ME). Les images sont représentatives de 3 expériences. Barre = 3  $\mu$ m. (B) Quantification de l'adhésion et de l'émission de filopodes après adhésion en présence de botrocétine avec ou sans immunocapture. Test statistique Anova (\*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Il existe plusieurs indications de la spécificité de l'adhésion sur FW murin immunocapturé. La première est l'incapacité des plaquettes à adhérer en absence de botrocétine (Figure 28 A) g), qui de plus élimine l'hypothèse d'une adhésion non spécifique sur l'anticorps. L'implication du complexe GPIb-V-IX est confirmée par l'inhibition de 90 % de l'adhésion des plaquettes par l'anticorps bloquant XiaB2 dirigé contre la GPIb $\alpha$  murine (Figure 32 B). L'implication du site de liaison du FW est démontrée en clivant la partie N-terminale de la GPIb $\alpha$  par l'O-sialoglycoprotéine endopeptidase (Figure 32 A, C). Ce clivage est contrôlé par cytométrie de flux sur la perte de la liaison de l'anticorps XiaG5. Le clivage entraîne également la perte de liaison du FW marqué au Cy2 en présence de botrocétine (Figure 32 A). Dans ces conditions, l'adhésion sur le FWm immunocapturé est inhibée de 70 % par rapport aux plaquettes non clivées (Figure 32 C) b). Ce résultat ajouté à l'inhibition de l'adhésion par l'anticorps XiaB2 démontre une forte dépendance de celle-ci vis-à-vis de la GPIb $\alpha$ .



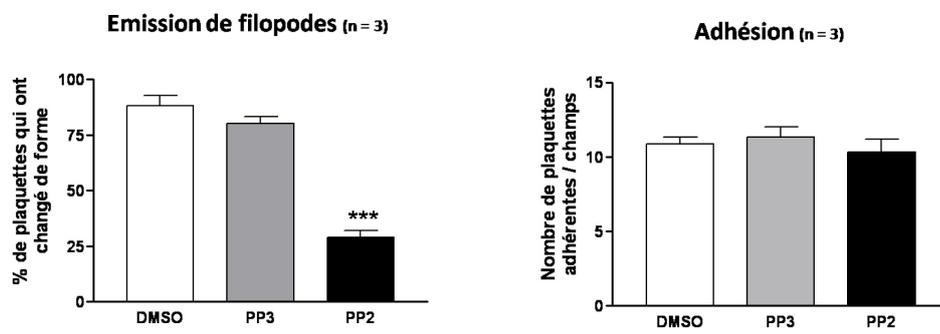
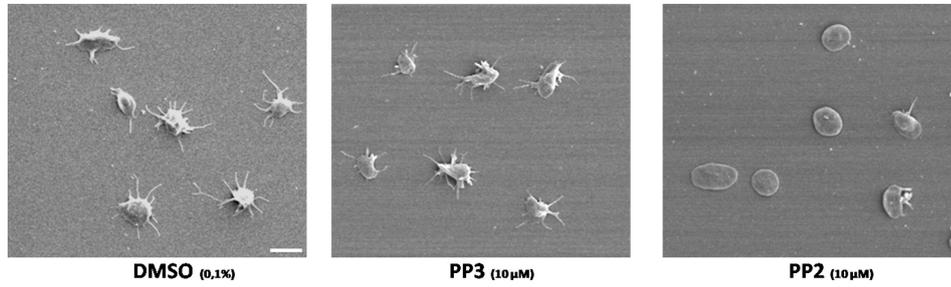


**Figure 32** L'adhésion des plaquettes de souris sur FWm est dépendante du complexe GPIb-V-IX. (A) Schéma du complexe GPIb-V-IX indiquant, dans la partie N-terminale de la GPIIb $\alpha$  la liaison de l'anticorps bloquant (XiaB2) et non bloquant (XiaG5), la liaison du FW et le site de clivage par l'O-sialoglycoprotéine endopeptidase. (B) Les plaquettes lavées de souris C57Bl6 (30 000 pl/ $\mu$ l) ont été incubées pendant 10 min avec un IgG2a non immun ou XiaB2 (10  $\mu$ g/ml) puis mises à adhérer sur une surface de FWm immunocapturé. Images représentatives de 3 expériences et quantification de l'adhésion. Test statistique non paramétrique Mann-Whitney (\*\*\*) $p < 0,001$  Barre = 3  $\mu$ m. (C) Les plaquettes lavées de souris C57Bl6 ont été incubées en présence ou non d'O-sialoglycoprotéine endopeptidase (48  $\mu$ g/ml). La liaison de XiaG5-FITC (anticorps anti-GPIIb $\alpha$ ) ou de l'IgG (contrôle) (en haut à gauche) et la liaison du FW-Cy2 (10  $\mu$ g/ml) en présence ou en absence (contrôle) de botrocétine (en bas à gauche) sont mesurées par cytométrie de flux. Les plaquettes lavées clivées ou non sont mises à adhérer sur une surface de FW murin immunocapturé (b). Images prises par microscopie à fluorescence et quantification de l'adhésion (n=1).

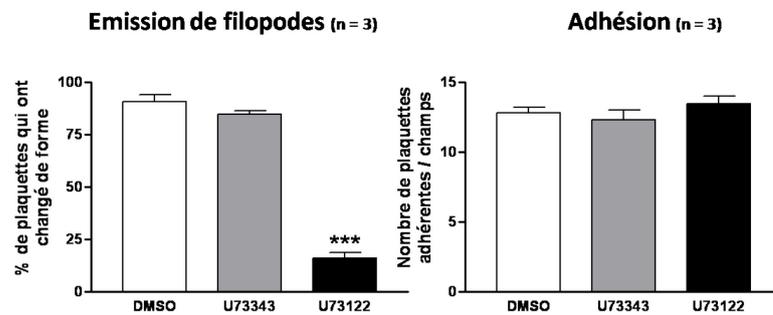
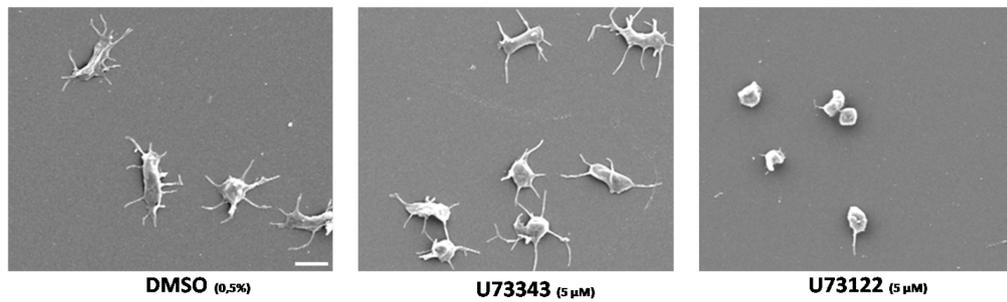
La caractérisation de ce système murin se poursuit en vérifiant l'implication de protéines connues pour être impliquées dans la signalisation GPIb-V-IX, notamment une src kinase et la PLC inhibées respectivement par PP2 et U73122. Ces deux inhibiteurs ont été utilisés dans l'adhésion des plaquettes sur FWm immunocapturé. L'émission de filopodes des plaquettes traitées par PP2 est inhibée de 70 % par rapport aux plaquettes traitées avec du DMSO ou PP3 (Figure 33 A)) sans affecter la capacité des plaquettes à adhérer. De même, l'émission de filopodes est inhibée de 80 % en présence d'U73122 par rapport aux contrôles DMSO ou U73343 (Figure 33 B)) sans affecter l'adhésion des plaquettes. Cet effet est à interpréter avec précaution car l'U73122 montre également un effet sur les plaquettes au repos qui perdent leur forme discoïde (Figure 33 C)). L'ensemble des

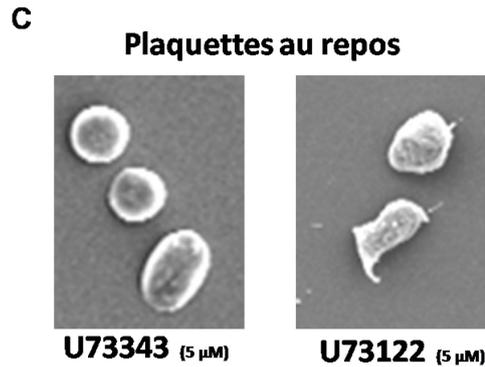
résultats, permet de montrer que comme pour la réponse observée sur FW humain, l'adhésion et l'émission de filopodes sur FwM immunocapturé sont bien spécifiques de l'axe GPIIb-V-IX/FW.

**A**



**B**





**Figure 33** Effet d'inhibiteurs de src-kinase et de PLC sur l'émission de filopodes de plaquettes murines adhérant sur une surface recouverte de FW murin. (A) Effet de PP2, inhibiteur des src kinases. Les plaquettes lavées de souris C57Bl6 (30 000 pl/μl) sont incubées avec 10 μM de PP2, 0,1 % de DMSO ou 10 μM de l'analogue non inhibiteur PP3 en présence de 2 μg/ml de botrocétine et de 40 μg/ml d'Intégrilin. Les plaquettes sont mises à adhérer sur 10 μg/ml FWm immunocapturé (B) Effet de l'U73122, inhibiteur de PLC. Les plaquettes sont incubées avec 5 μM d'inhibiteur U73122, 0,5 % de DMSO ou 5 μM de l'analogue non inhibiteur U73343 en présence de 2 μg/ml de botrocétine et 40 μg/ml d'Intégrilin. (C) Effet de l'U73122 ou l'U73343 (5 μM) sur les plaquettes au repos incubées puis fixées au glutaraldéhyde 2,5 % et mises à adhérer sur une surface de Poly-L-lysine et observées en ME. Les images sont représentatives de 3 expériences. Barre = 3 μm. La quantification de l'adhésion et du nombre de filopodes a été réalisée sur 5 champs séparés / expérience représentant 9215 μm<sup>2</sup>. Test statistique non paramétrique Mann-Whitney (\*\*\*)p<0,001).

La figure 34 récapitule les méthodes qui ont été retenues pour l'étude du changement de forme dans la suite du travail.

**Plaquettes humaines:**

- FW humain purifié (Schéma A)
- Fibrinogène sans stimulation (Schéma A)

**Plaquettes de souris:**

- FW humain purifié (Schéma A)
- FW murin immunocapturé (Schéma B)
- Fibrinogène avec ou sans stimulation ADP ou thrombine (Schéma A)

**Figure 34** Récapitulatif des techniques d'adhésion utilisées en fonction des protéines adhésives et de l'origine des plaquettes (Schéma A ou B de la figure 29)

L'adhésion des plaquettes murines sera réalisée le plus souvent à la fois sur FW humain et sur FW murin immunocapturé (FWm). L'utilisation de ces deux types de FW permet de disposer de deux degrés d'activation afin de révéler plus facilement une augmentation ou une diminution de la réponse selon le modèle murin utilisé. L'immunocapture a été retenue devant la difficulté d'obtenir des

quantités suffisantes de FW purifié par méthode chromatographique (P Lenting, communication personnelle). L'équipe de Peter Lenting, projette d'ajouter une étiquette à l'extrémité de la protéine recombinante qui devrait faciliter la purification par chromatographie d'affinité. En attendant, l'immunocapture permet d'éliminer les protéines contaminantes apportées par le milieu de culture et sécrétées par les cellules. Un désavantage est qu'elle ne permet pas d'apprécier la quantité de FW effectivement présente sur la surface. Une autre limite potentielle, du fait de la nature polyclonale de l'anticorps, serait une présentation inefficace du domaine A1 qui pourrait être masqué par l'anticorps. Cependant, les niveaux d'adhésion comparables à ceux obtenus sur FW humain, et le degré supérieur d'activation, montrent des performances acceptables avec une bonne spécificité de réponse via le complexe GPIIb-V-IX.

Bien que ce système soit plus réactif, on n'observe pas d'étalement des plaquettes murines en absence d'inhibiteur de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Cette différence par rapport aux plaquettes humaines pourrait être due à un degré d'activation qui reste inférieur ou à des différences entre les deux espèces dans la voie d'activation vers l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. En cours d'étude, nous avons eu accès à un FW murin muté pour le site RGD (FW $\Delta$ RGD) incapable d'interagir avec l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et donc plus approprié à l'étude de la signalisation propre au complexe GPIIb-V-IX.

L'étude du changement de forme dans un système d'adhésion statique a ses avantages et ses limites. Elle permet d'apprécier la signalisation spécifique de la voie GPIIb-V-IX et une certaine quantification du degré d'activation notamment par l'observation en microscopie électronique. Une limite est la nécessité d'utiliser un inducteur pour palier à la faible réactivité du FW en absence de flux, ce qui éloigne des conditions rencontrées dans le vaisseau.

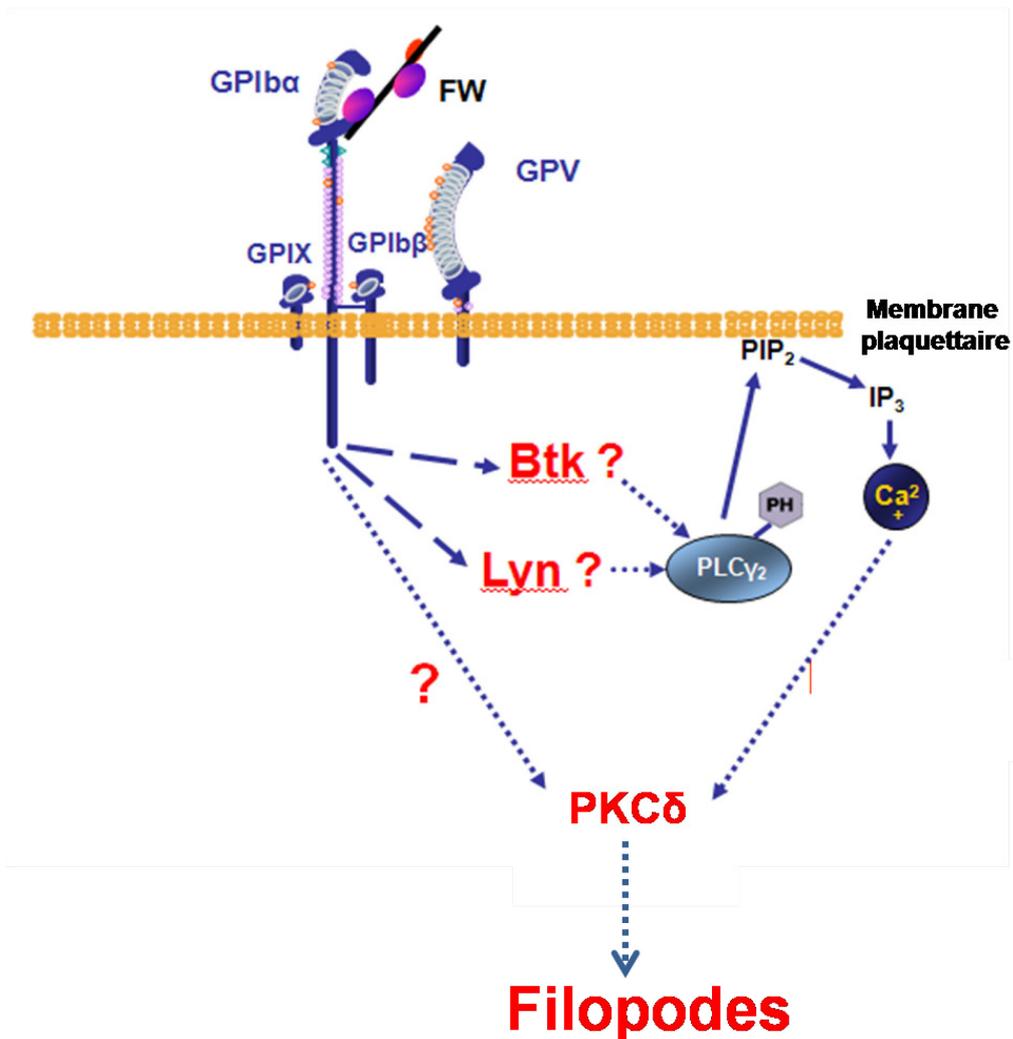
Un autre moyen d'évaluer cette signalisation serait de mesurer les augmentations de calcium par des techniques de microscopie et d'analyse d'image (Jen et al., 1996; Nesbitt et al., 2003) qui sont actuellement développées au laboratoire. Cependant cette approche faite à partir de plaquettes de souris nécessite des mises au point plus importantes devant les difficultés rencontrés du fait de la petite taille des plaquettes et une tendance à la fuite des sondes calciques (Ohlmann et al., 2004).

Une première famille d'effecteurs qui a été explorée, en utilisant les systèmes décrits plus haut, est celle des kinases parmi lesquelles Lyn, Btk et PKC $\delta$ .

## **B) Rôle des Kinases**

La voie de signalisation GPIb-V-IX/FW implique une src kinase qui n'a pas encore été identifiée. Parmi les 7 src kinases présentes dans la plaquette, seule Lyn et pp60<sup>c-src</sup> ont été décrites pour interagir avec le complexe (Wu et al., 2003; Yin et al., 2008). Une autre étude a révélé que Btk, une tyrosine kinase de la famille des Tec kinases, est phosphorylée en aval de GPIb-V-IX (Suzuki-Inoue et al., 2004). Ces résultats suggèrent que ces protéines pourraient participer à la signalisation GPIb-V-IX menant à l'émission de filopodes (Figure 35).

PKC $\delta$ , une sérine thréonine kinase, n'a pas été décrite pour avoir un rôle dans la signalisation GPIb-V-IX mais pour exercer une régulation négative dans l'émission de filopodes de plaquettes adhérant sur une surface de collagène (Pula et al., 2006). Un rôle similaire lors de l'adhésion sur FW est envisageable et sera exploré dans ce travail (Figure 35).



**Figure 35** Rôle potentiel des kinases Lyn, Btk et PKC $\delta$  dans la signalisation GPIIb-V-IX

### 1) Tyrosine kinases :

#### 1.1 Src kinase : Lyn

Deux études indépendantes ont suggéré un lien entre Lyn et la signalisation GPIIb-V-IX. La première a montré, par des expériences d'immunoprécipitation, que Lyn interagissait avec la sous-unité GPIIb $\alpha$  (Wu et al., 2003). La deuxième, a montré que les plaquettes de souris Lyn<sup>-/-</sup> ne s'étaient pas sur FW contrairement aux plaquettes de souris contrôles. Analyser l'étalement des plaquettes pour évaluer la signalisation en aval de GPIIb pose question car il indique l'implication d'autres voies d'activation par des agonistes solubles et l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.

Afin de réévaluer le rôle de Lyn dans la signalisation GPIb-dépendante nous avons étudié l'émission de filopodes en conditions d'adhésion en utilisant deux modèles murins. D'une part, des souris déficientes pour Lyn (Lyn<sup>-/-</sup>) et d'autre part des souris pour lesquelles l'activité tyrosine kinase de Lyn est constitutivement active (Lyn<sup>up/up</sup>). Ces deux lignées ont été fournies par l'équipe du Dr. Hibbs (Harder et al., 2001; Hibbs et al., 1995). La taille et le nombre des plaquettes de ces souris sont comparables à ceux des souris contrôles, indiquant que Lyn n'affecte pas la mégacaryocytopoïèse.

Des réponses plaquettaires anormales des souris Lyn<sup>-/-</sup> ont été rapportées par plusieurs équipes mais des résultats contradictoires ne permettent pas d'établir un rôle clair de Lyn dans les fonctions plaquettaires. i) Il a été montré une augmentation de l'agrégation et de la sécrétion des plaquettes Lyn<sup>-/-</sup> en réponse au CRP suggérant un rôle régulateur négatif de Lyn dans la signalisation GPVI (Quek et al., 2000). ii) Une autre étude a montré une augmentation des flux calciques et un étalement plus rapide des plaquettes sur fibrinogène suggérant une régulation négative de Lyn sur l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Maxwell et al., 2004). iii) A l'opposé, une diminution de l'agrégation a été observée en réponse à de faibles concentrations de  $\gamma$ -thrombine ou d'un peptide activateur PAR-4 mais une réponse normale à l'analogue du TxA2 (U46619) ou l'ADP suggérant une régulation positive de Lyn sur l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Cho et al., 2002).

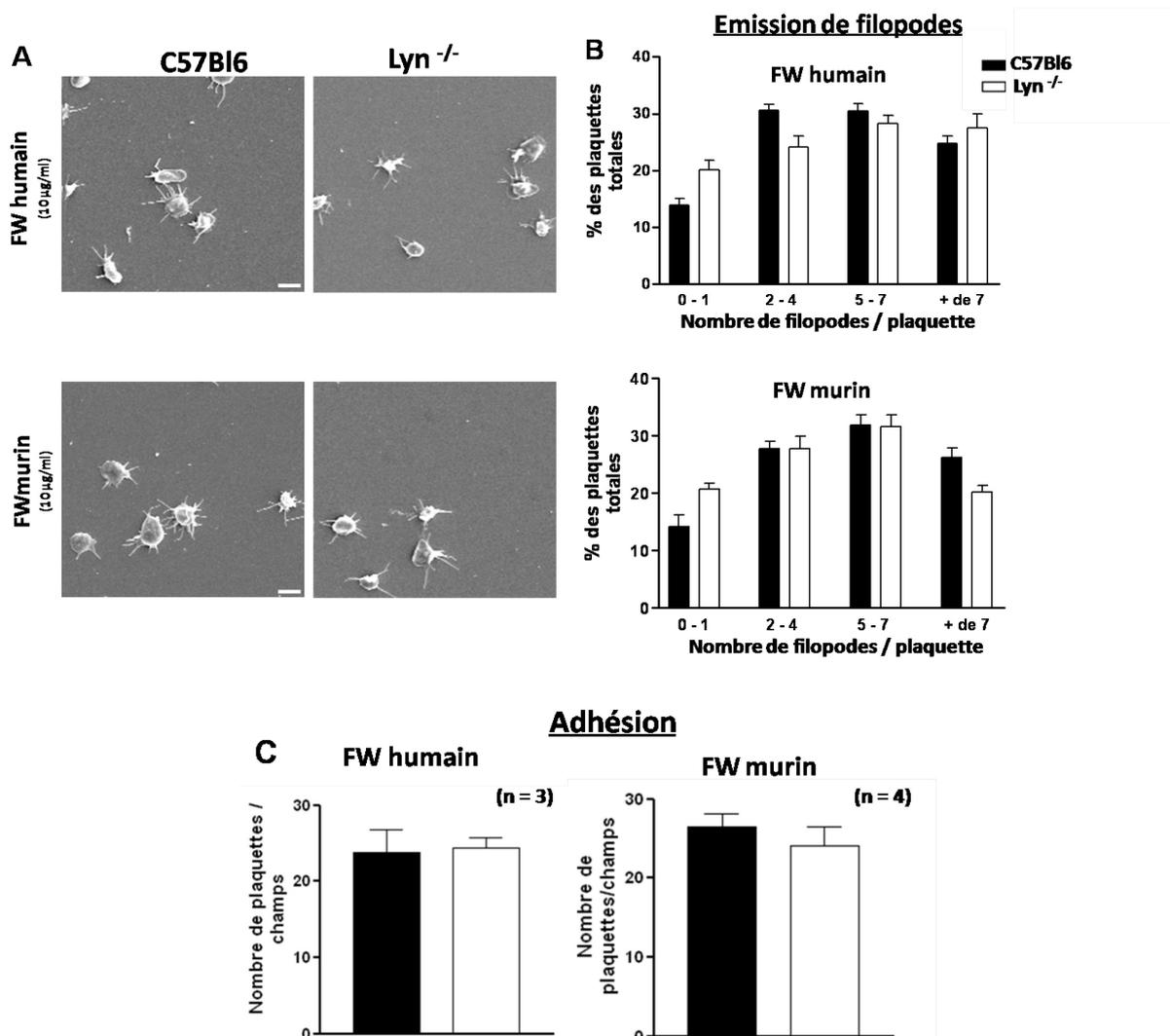
Au contraire des souris Lyn<sup>-/-</sup>, les fonctions plaquettaires des souris Lyn<sup>up/up</sup> n'ont encore jamais été évaluées.

Les plaquettes de souris Lyn<sup>-/-</sup> et Lyn<sup>up/up</sup> ont été explorées pour leur capacité à émettre des filopodes en réponse au FW et au fibrinogène, et pour d'autres réponses *in vitro* (agrégation, sécrétion..) ainsi que pour leur capacité hémostatique et dans des modèles de thrombose artérielle *in vivo*.

### 1.1.1 Etude des souris Lyn<sup>-/-</sup>

#### a) Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante

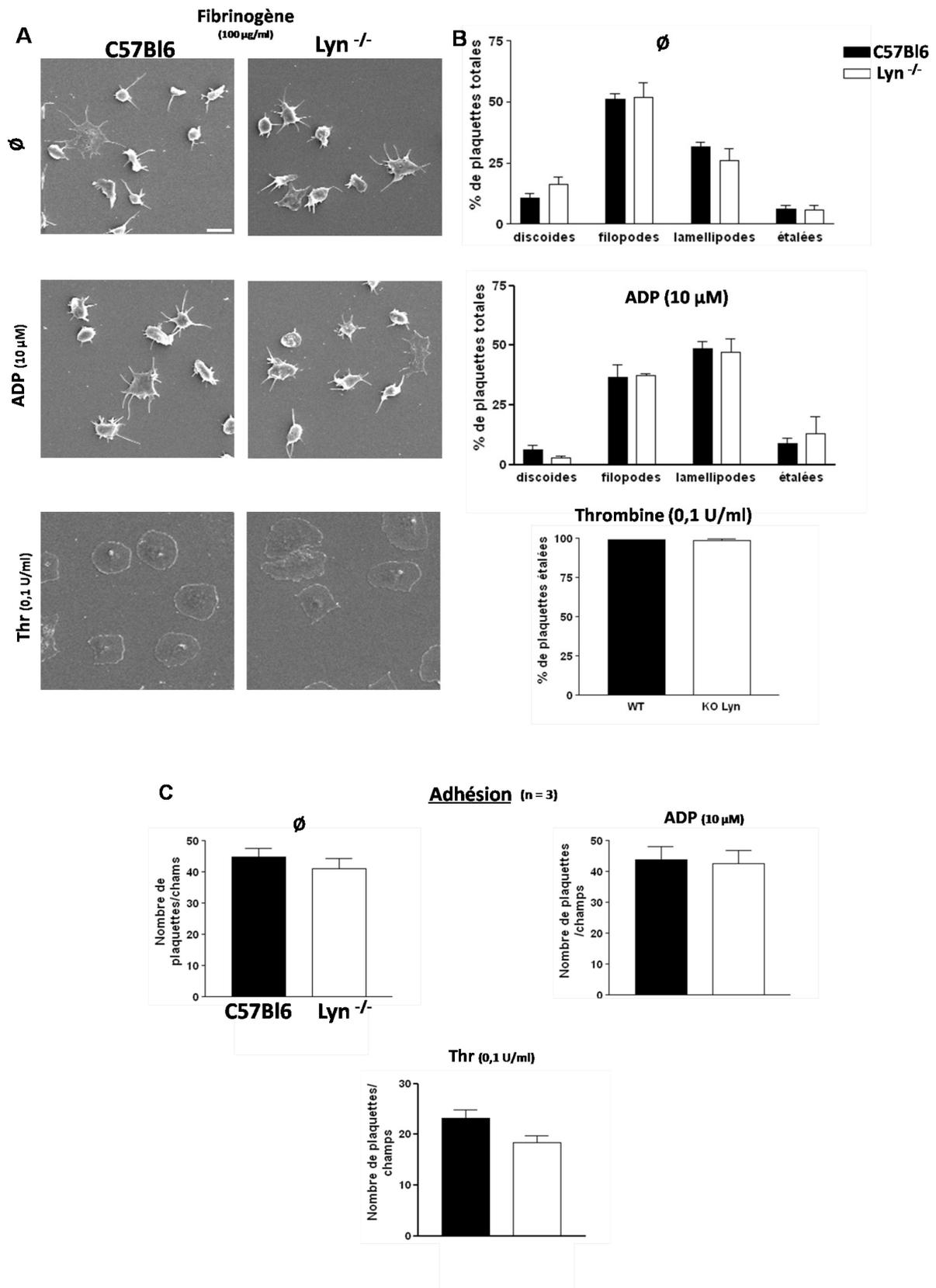
Les images de microscopie électronique montrent que les plaquettes de souris *Lyn*<sup>-/-</sup> se contractent et émettent des filopodes de la même façon que les plaquettes de souris sauvages C57B16 que ce soit sur FW humain ou murin (Figure 36 A). Afin de quantifier plus finement cette réponse, une classification a été établie en fonction du nombre de filopodes émis par plaquette (Figure 36 B). Les plaquettes des deux lignées ont une répartition identique dans les différentes classes. De même, le nombre de plaquettes adhérentes n'est pas affecté par l'absence de *Lyn* (Figure 36 C). Ces résultats montrent que l'absence de *Lyn* ne modifie pas la capacité des plaquettes à émettre des filopodes et à adhérer sur FW.



**Figure 36 Etude de l'émission de filopodes dans la lignée de souris Lyn<sup>-/-</sup>** Adhésion des plaquettes de souris C57Bl6 (30 000 pl/ $\mu$ l) et Lyn<sup>-/-</sup> sur une surface de FW humain ou FW murin. Incubation des plaquettes à 37°C pendant 10 min avec 2  $\mu$ g/ml de botrocétine et 40  $\mu$ g/ml d'intégrilin puis adhésion sur FW pendant 20 min à 37 °C et fixation au glutaraldéhyde 2,5 %. Les échantillons ont été préparés pour l'observation en microscopie électronique à balayage. Les images sont représentatives de 3 ou 4 expériences. Barre = 3  $\mu$ m. B) Quantification en fonction du nombre de filopodes par plaquette. Classe de 0 à 1, de 2 à 4, de 5 à 7 et plus de 7 filopodes. C) Quantification de l'adhésion. 5 champs séparés de 9215  $\mu$ m<sup>2</sup> ont été pris en compte pour chaque expérience. Utilisation du test statistique non paramétrique Mann-Whitney qui ne montre pas de différence significative.

b) Etude d'autres fonctions plaquettaires et de la thrombose

L'adhésion sur fibrinogène a été étudiée pour évaluer le rôle de Lyn dans l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Figure 37). Sans préstimulation, 50 % des plaquettes de souris C57Bl6 ou Lyn<sup>-/-</sup> émettent des filopodes et 35% forment des lamellipodes ou s'étalent. L'ajout d'ADP ou de thrombine avant adhésion permet d'augmenter la réponse procurant ainsi une gamme de stimulation plus ou moins forte. 35 % des plaquettes de souris C57Bl6 ou Lyn<sup>-/-</sup> émettent des filopodes et 62 % forment des lamellipodes ou s'étalent après stimulation à l'ADP. La préstimulation à la thrombine permet l'étalement de la quasi totalité des plaquettes de souris C57Bl6 ou Lyn<sup>-/-</sup> (Figure 37 A et B). L'absence de Lyn n'a pas de répercussion sur le niveau d'adhésion des plaquettes (Figure 37 C).



**Figure 37** Changements morphologiques des plaquettes Lyn<sup>-/-</sup> après adhésion sur fibrinogène. Adhésion des plaquettes de souris C57Bl6 (30 000 pl/µl) ou Lyn<sup>-/-</sup> sur une surface recouverte de 100 µg/ml de fibrinogène humain en absence de stimulation ou après stimulation par l'ADP (5 µM) ou la

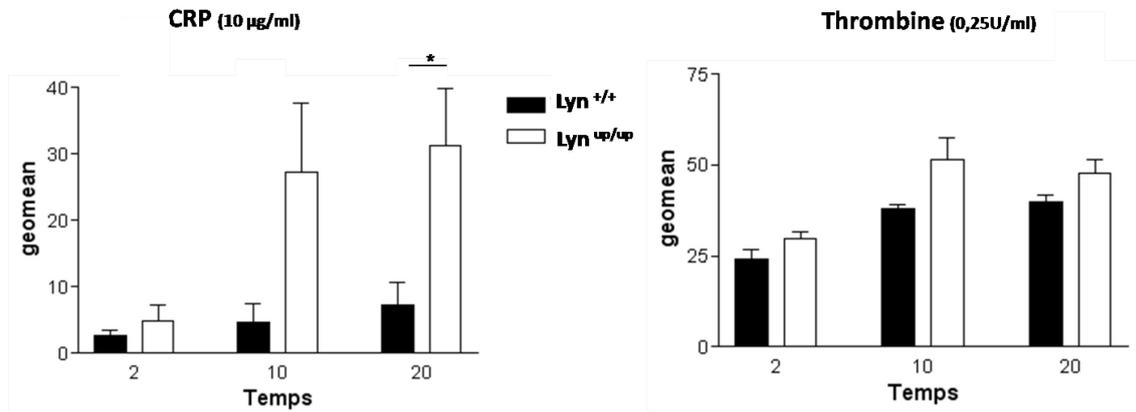
thrombine (0,1 U/ml). Après 60 min (non stimulées, ADP) ou 30 min (thrombine) d'adhésion à 37°C, lavage et fixation avec du glutaraldéhyde 2,5 %, les plaquettes sont observées en ME à balayage. A) Les images sont représentatives de 3 expériences. Barre = 3 µm. B) Quantification en fonction du type de changement morphologique des plaquettes : discoïdes, filopodes, lamellipodes ou étalées. C) Quantification de l'adhésion. 5 champs séparés de 9215 µm<sup>2</sup> ont été pris en compte pour chaque expérience. Utilisation du test statistique non paramétrique Mann-Whitney qui ne montre aucune différence significative.

Les expériences précédentes ne montrent pas d'incidence de l'absence de Lyn sur la capacité des plaquettes à s'étaler sur le fibrinogène immobilisé, une réponse qui reflète l'activation outside-in de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.

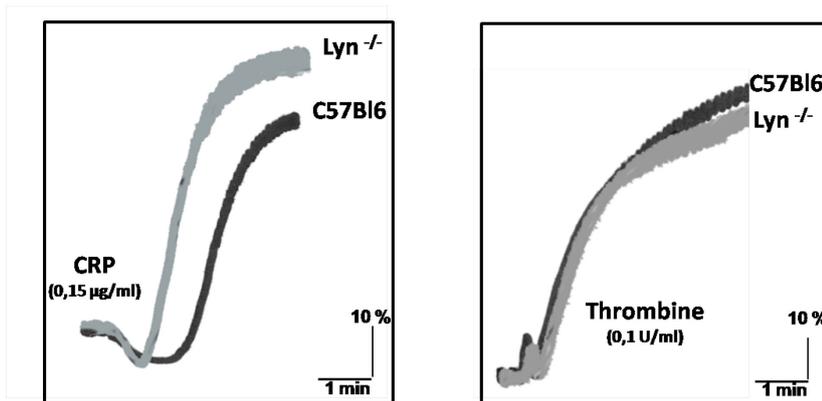
La capacité des plaquettes à sécréter a été évaluée en mesurant l'exposition de P-sélectine à la surface des plaquettes. L'exposition de P-sélectine est 10 fois plus importante dans les plaquettes Lyn<sup>-/-</sup> par rapport aux plaquettes C57Bl6, après activation par le CRP. Une tendance à l'augmentation est également observée après stimulation par la thrombine qui n'est cependant pas significative (Figure 38 A). Les expériences d'agrégation viennent confirmer ces résultats. L'agrégation des plaquettes Lyn<sup>-/-</sup>, stimulées par le CRP (0,15 µg/ml), présente un temps de latence plus court (1 min) et un pourcentage d'agrégation plus important (80 %) par rapport aux plaquettes C57Bl6 (2 min ; 65%). Par contre, aucune différence entre les deux génotypes n'est observée pour l'agrégation des plaquettes après stimulation par la thrombine. La tendance observée précédemment n'est pas retrouvée ici. (Figure 38 B).

Une façon de vérifier l'impact de l'absence de Lyn sur l'activation inside-out de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 est de mesurer la capacité des plaquettes à lier le fibrinogène en solution. La liaison du fibrinogène couplé au fluorophore A488 a été mesurée par cytométrie de flux après stimulation des plaquettes pendant 2, 10 et 20 min par l'ADP (10 µM), la thrombine (0,25 U/ml) ou le CRP (10 µg/ml) (Figure 38 C). Alors que la liaison de fibrinogène est comparable entre les deux génotypes en réponse à la thrombine, on note une augmentation non significative de la liaison en réponse au CRP et à l'ADP.

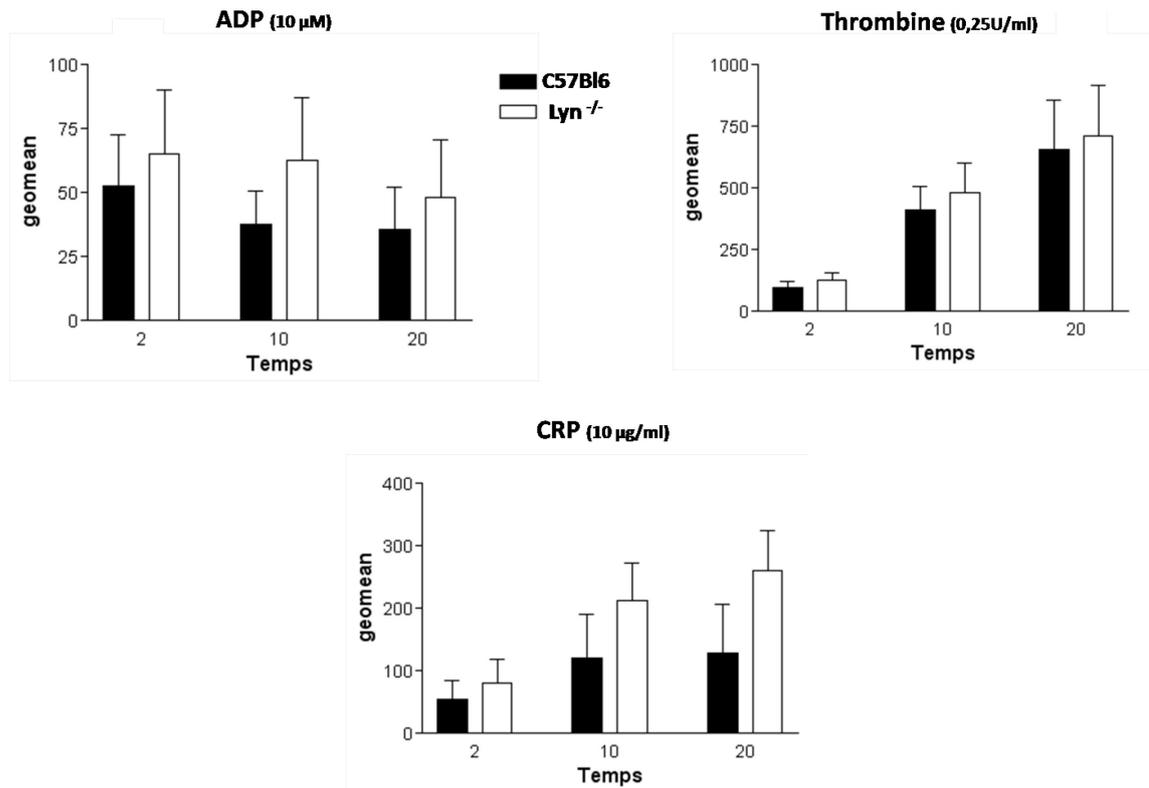
## A Exposition de p-sélectine



## B Agrégation



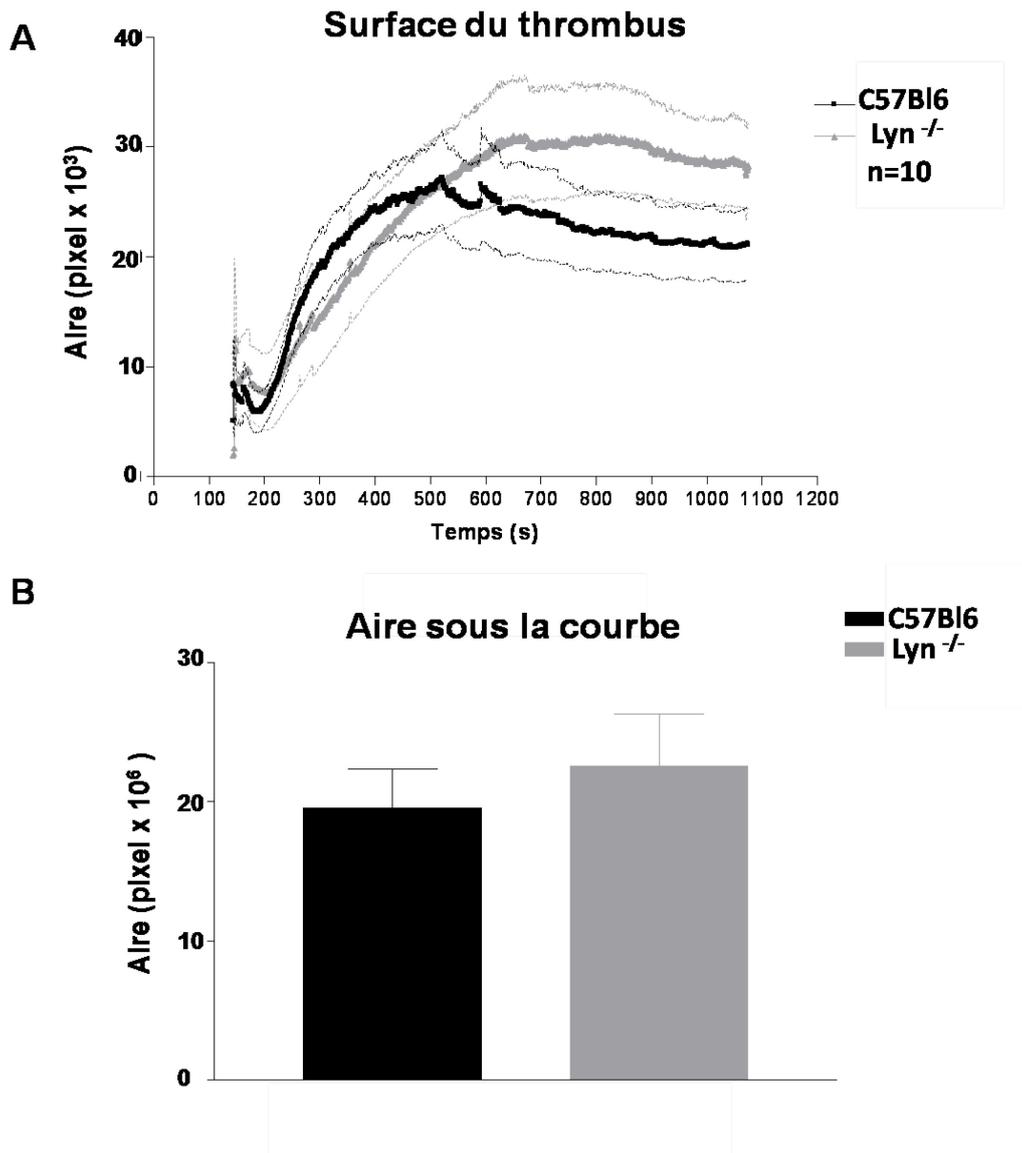
### C Liaison de fibrinogène



**Figure 38** Effet de l'absence de Lyn sur l'exposition de P-sélectine, l'agrégation et la liaison de fibrinogène. A) L'exposition de P-sélectine-FITC a été mesurée, par cytométrie de flux, après stimulation des plaquettes de souris C57Bl6 ou Lyn<sup>-/-</sup> par le CRP (10 μg/ml) ou la thrombine (0,25 U/ml). Les résultats sont exprimés en moyenne de fluorescence après 2, 10 et 20 min de stimulation. Utilisation du test statistique t de student qui montre une augmentation de la liaison de fibrinogène des plaquettes Lyn<sup>-/-</sup> après stimulation au CRP (\*p<0,05), n=3. B) Agrégation en réponse au CRP (0,15 μg/ml) et à la thrombine (0,1 U/ml), des plaquettes de souris C57Bl6 ou Lyn<sup>-/-</sup> (300 000 pl/μl) à 37°C pendant 4 min. n=1 C) Les plaquettes lavées de souris C57Bl6 ou Lyn<sup>-/-</sup> (5.0 x 10<sup>7</sup>/mL) ont été stimulées par l'ADP (10 μM), la thrombine (0.25 U/mL) ou le CRP (10 μg/mL) et la liaison du fibrinogène couplé au fluorophore Alexa488 a été détecté par cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en moyenne de fluorescence après 2, 10 et 20 min de stimulation, n=3. Utilisation du test statistique t de student qui ne montre pas de différence significative.

L'étude des souris Lyn<sup>-/-</sup> montre que Lyn n'est probablement pas impliqué dans la signalisation provenant de GPIb. Des réponses augmentées ont par contre été observées en réponse au CRP, en accord avec un rôle inhibiteur de Lyn dans la voie de signalisation provenant de GPVI (Quek et al., 2000).

Afin d'évaluer la répercussion de l'absence de Lyn sur la thrombose, les souris  $Lyn^{-/-}$  ont été évaluées dans un modèle de thrombose par lésion de la carotide au  $FeCl_3$  (Figure 39). L'évolution de la surface du thrombus en fonction du temps (n=10 souris) montre une croissance légèrement plus lente dans les souris  $Lyn^{-/-}$  avec par contre une surface maximale augmentée par rapport au  $Lyn^{+/+}$  (Figure 39 A). La stabilité du thrombus aux temps tardifs est similaire dans les deux génotypes. La mesure de l'aire sous la courbe (Figure 39 B), ne montre pas une différence statistiquement significative entre les deux génotypes. Ces résultats montrent que l'absence de Lyn entraîne au mieux une légère augmentation de la taille maximale du thrombus.



**Figure 39** Effet de l'absence de Lyn sur la thrombose artérielle. Une solution de FeCl<sub>3</sub> (7.5%) est appliquée localement sur la carotide. La formation du thrombus est enregistrée par vidéo-macroscopie et l'aire est mesurée par analyse d'image (Metamorph software). A) Evolution de l'aire du thrombus en fonction du temps (moyenne +/- écart type, n=10 vaisseaux) B) Comparaison de l'aire sous la courbe représentée dans la figure A). Le test statistique t de student a été utilisé et ne montre pas de différence significative.

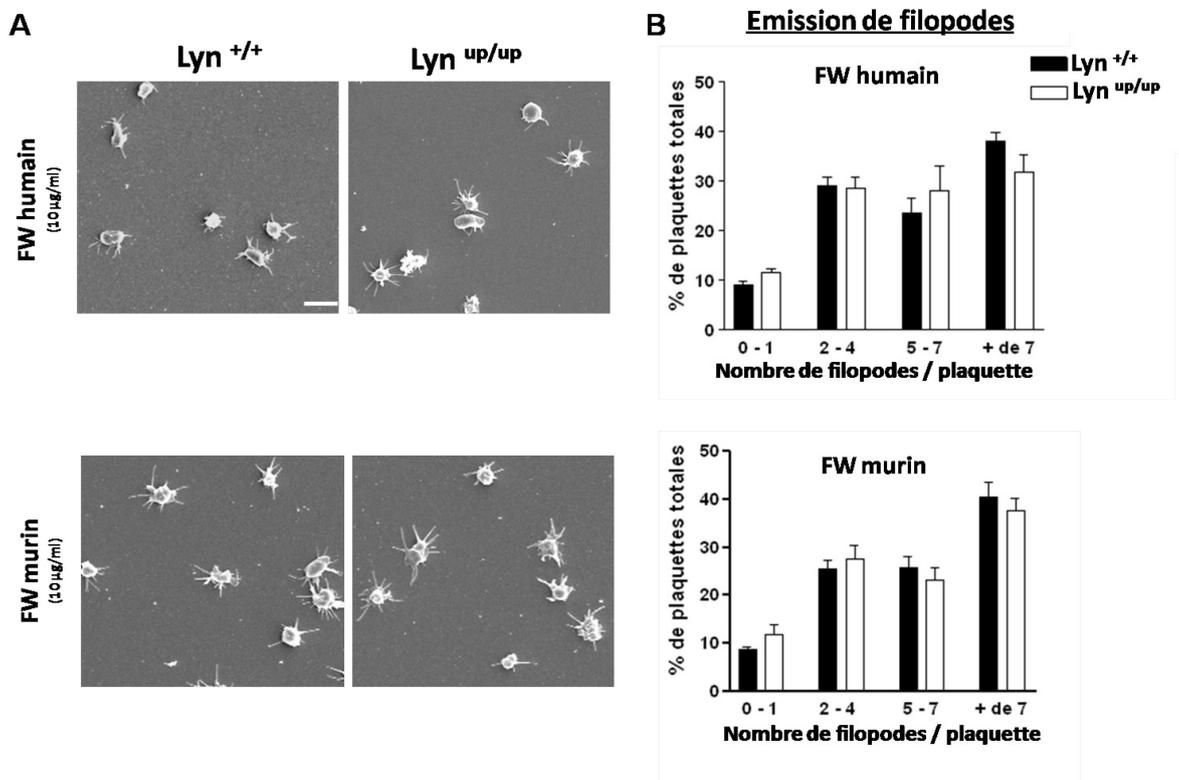
### 1.1.2 Etude des souris Lyn<sup>up/up</sup>

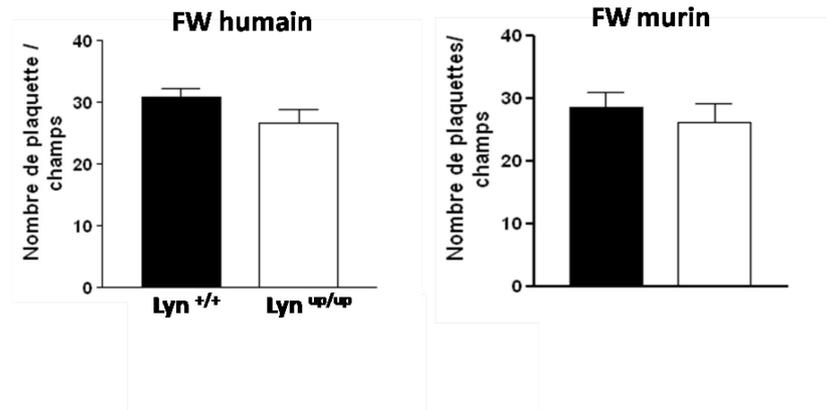
L'étude précédente a permis d'évaluer la répercussion de l'absence de Lyn. Une deuxième approche a été d'évaluer l'effet d'une augmentation de l'activité kinase en utilisant les souris Lyn<sup>up/up</sup>

qui expriment la kinase sous une forme constitutivement active. Les réponses plaquettaires de cette lignée n'ont encore jamais été étudiées.

a) Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante

Les plaquettes de souris *Lyn*<sup>up/up</sup> se contractent et émettent des filopodes, en réponse au FW humain ou murin, de la même façon que les plaquettes de souris *Lyn*<sup>+/+</sup> (Figure 40 A). La quantification du nombre de filopodes par plaquette et du nombre de plaquettes adhérentes ne révèle pas de différences entre les deux génotypes (Figure 40 B).



**C****Adhésion (n = 3)**

**Figure 40** Effet de l'expression de Lyn constitutivement active ( $Lyn^{up/up}$ ) sur l'émission de filopodes après adhésion des plaquettes sur FW. Adhésion des plaquettes de souris  $Lyn^{+/+}$  (30 000 pI/ $\mu$ l) ou  $Lyn^{up/up}$  sur une surface de FW humain ou FW murin selon les techniques détaillées précédemment dans la figure 36. Les images sont représentatives de 3 expériences. Barre = 3  $\mu$ m. B) Quantification de l'émission de filopodes C) et de l'adhésion. 5 champs séparés de 9215  $\mu$ m<sup>2</sup> ont été pris en compte pour chaque expérience. Utilisation du test statistique non paramétrique Mann-Whitney qui ne montre aucune différence significative.

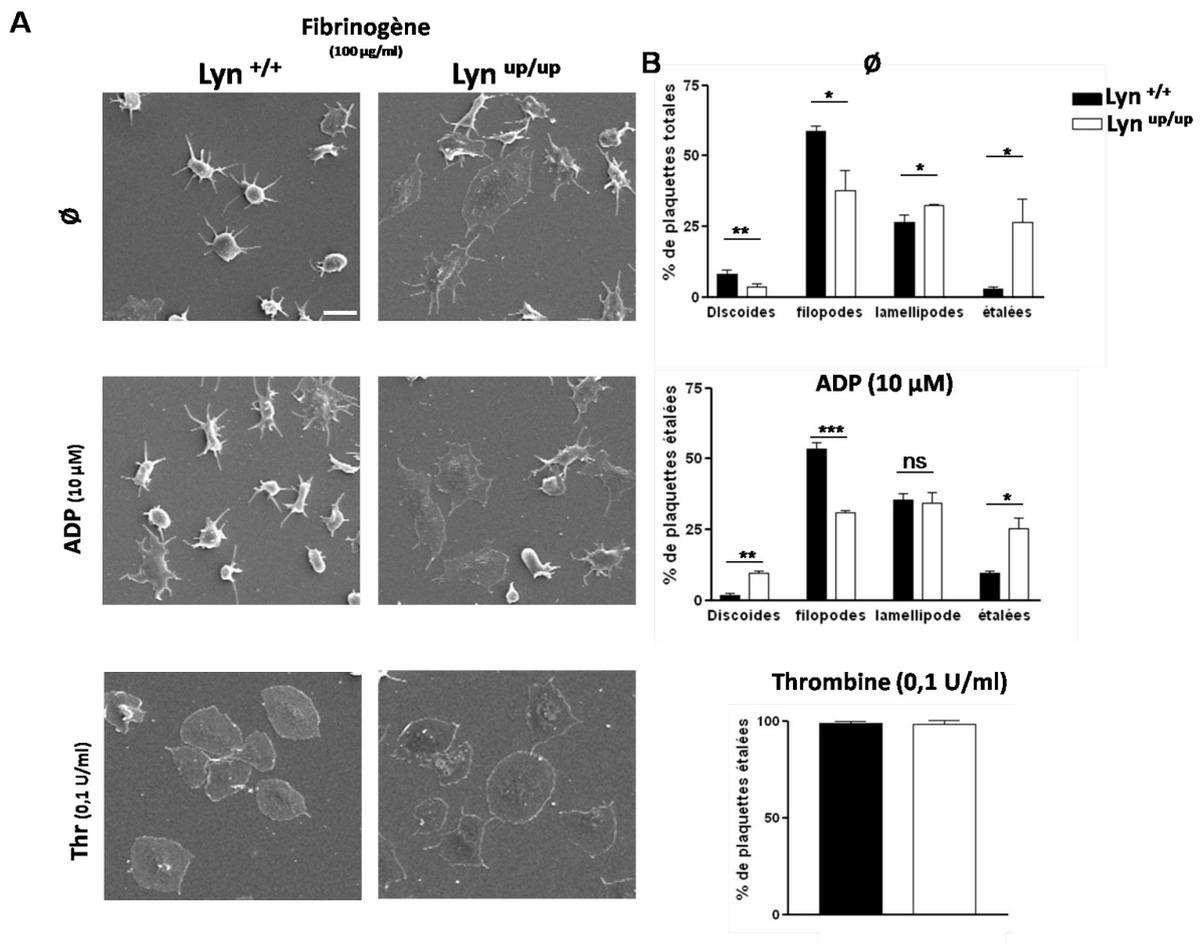
Ces résultats suggèrent que l'activation de Lyn n'est pas impliquée dans la signalisation déclenchée par l'interaction FW/GPIb-V-IX. Les résultats identiques obtenus dans le KO et en présence de la forme activée montrent que Lyn ne joue pas de rôle dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante.

b) Etude d'autres fonctions plaquettaires, de l'hémostase et de la thrombose

Au-delà de la réponse en aval de GPIb, l'effet d'une activation constitutive de Lyn a été évalué sur d'autres réponses plaquettaires et en thrombose.

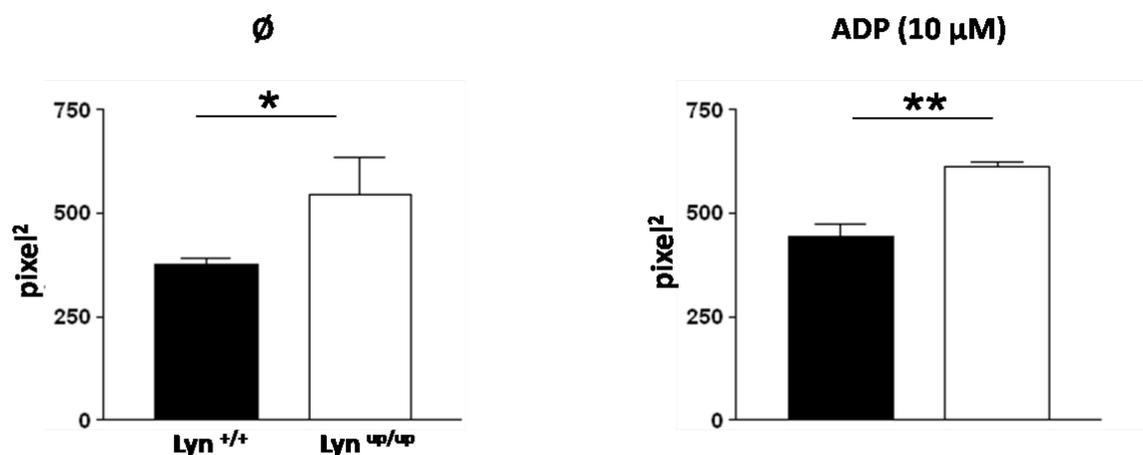
Contrairement aux plaquettes  $Lyn^{+/+}$  qui émettent des filopodes, mais sont incapables de s'étaler sur fibrinogène, les plaquettes  $Lyn^{up/up}$  présentent une certaine capacité à s'étaler (Figure 41). Une tendance encore plus marquée est observée lorsque les plaquettes sont préstimulées par l'ADP. La stimulation par la thrombine ne révèle pas de différence et aboutit à un étalement complet des plaquettes des deux génotypes (Figure 41 A). La quantification montre que dans la condition non stimulée 55% des plaquettes  $Lyn^{up/up}$  forment des lamellipodes ou s'étalent contre 25 % des plaquettes  $Lyn^{+/+}$ . Pour l'ADP, ces rapports sont respectivement de 60 % et 45 %. Le nombre moins important

de plaquettes  $Lyn^{up/up}$  émettant des filopodes n'est pas du à leur incapacité à émettre des filopodes mais à un déplacement vers la classe émettant des lamellipodes. Les différences observées sont statistiquement significatives dans un test non paramétrique de Mann Whitney ( $p < *0,05$ ) (Figure 41 B). Le degré d'étalement a également été évalué en mesurant la surface totale recouverte par les plaquettes (Figure 41 C). Une augmentation de 33 % et de 28 % de cette surface est notée dans les plaquettes de souris  $Lyn^{up/up}$  par comparaison aux souris  $Lyn^{+/+}$ , respectivement sans et après stimulation par l'ADP. Le nombre de plaquettes adhérentes est identique quelque soit le génotype (Figure 41 D). Au final, ces résultats suggèrent que l'activité kinase de Lyn participe positivement à l'étalement des plaquettes en participant à l'activation outside-in de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$ .



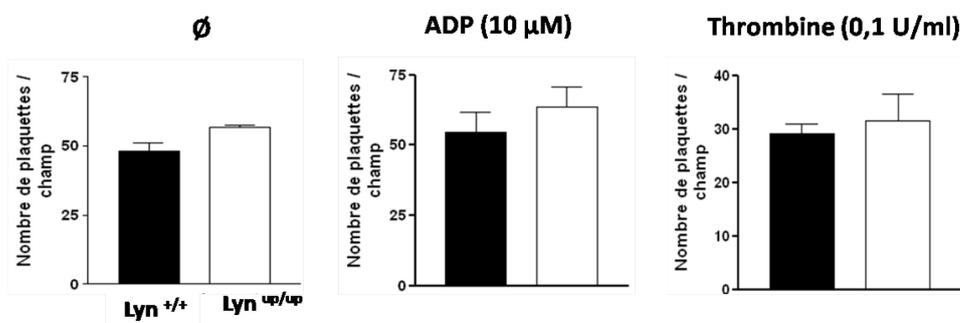
C

### Aire recouverte par les plaquettes



D

### Adhésion (n=3)



**Figure 41 Changements morphologiques des plaquettes de souris Lyn<sup>up/up</sup> après adhésion sur fibrinogène.** Adhésion des plaquettes de souris Lyn<sup>+/+</sup> ou Lyn<sup>up/up</sup> sur une surface de fibrinogène humain en absence de stimulation ou après stimulation par l'ADP ou la thrombine selon les techniques détaillées dans la figure 37. Barre = 3 µm. B) Répartition en fonction du type de changement morphologique. Utilisation du test statistique non paramétrique Mann-Whitney qui montre une augmentation significative du pourcentage de plaquettes Lyn<sup>up/up</sup> capables de former des lamellipodes et de s'étaler (\*p<0,05 et \*\*p<0,01). C) Mesure de l'aire recouverte par les plaquettes par analyse d'image (Metamorph). Utilisation du test statistique t de student qui montre une augmentation significative de la surface recouverte par les plaquettes Lyn<sup>up/up</sup> (\*p<0,05 et \*\*p<0,01). D) Quantification de l'adhésion. 5 champs séparés de 9215 µm<sup>2</sup> ont été pris en compte pour chaque expérience.

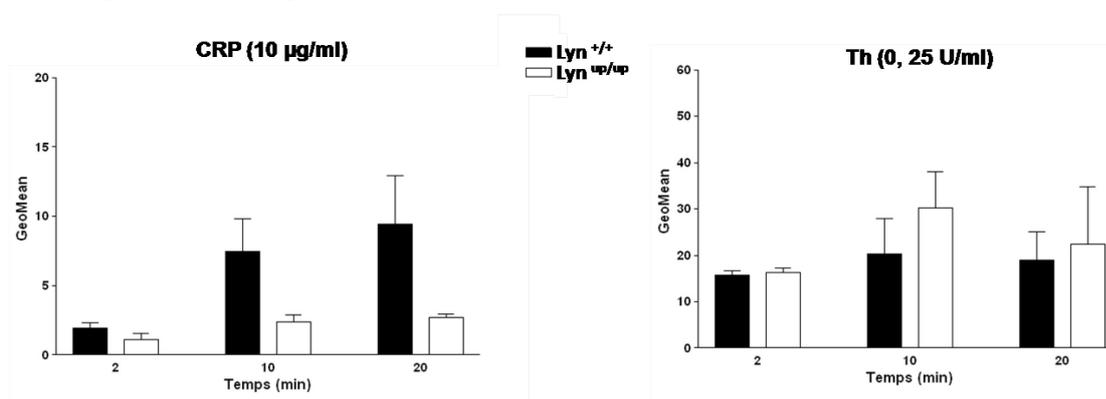
Afin de vérifier si la réactivité augmentée des plaquettes Lyn<sup>up/up</sup> lors de l'adhésion reflète une augmentation générale des réponses plaquettaires, l'exposition de P-sélectine et la liaison de fibrinogène ont été mesurées par cytométrie de flux (Figure 42).

L'exposition de P-sélectine montre une légère augmentation en réponse à la thrombine pour les plaquettes Lyn<sup>up/up</sup> et une inhibition d'environ 60% en réponse au CRP, sans que ces différences soient significative (Figure 42 A).

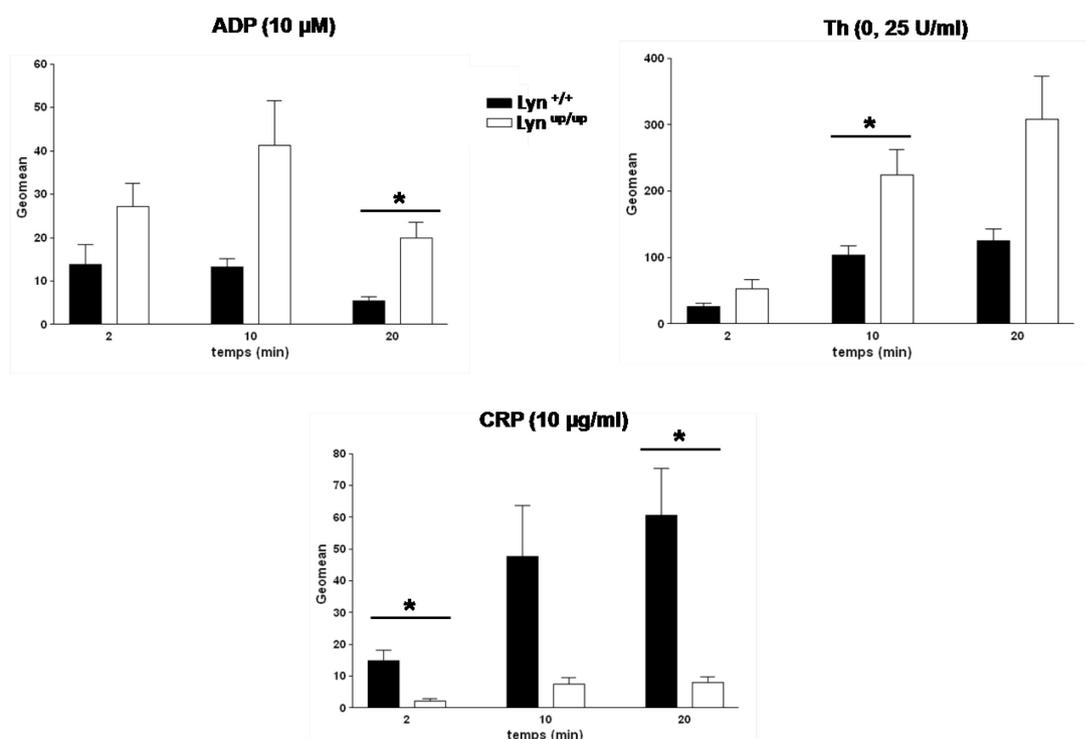
Les mêmes tendances sont observées pour la liaison de fibrinogène. Alors qu'une augmentation de la liaison de fibrinogène est mesurée pour les Lyn<sup>up/up</sup> en réponse à l'ADP et la thrombine, une diminution d'environ 80% est observée en réponse au CRP (Figure 42 B).

Ces résultats suggèrent que l'activité tyrosine kinase de Lyn entraîne des réponses différentes selon le type d'activation avec un effet régulateur négatif en aval de GPVI et positif en aval des récepteurs à l'ADP et à la thrombine.

### A Exposition de p-sélectine



### B Liaison de fibrinogène



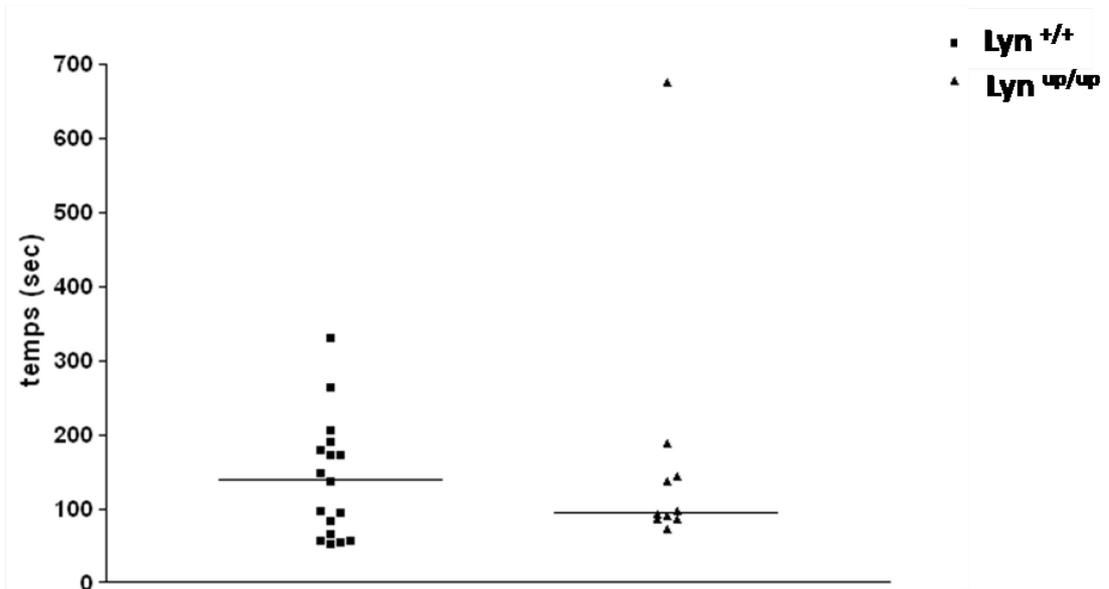
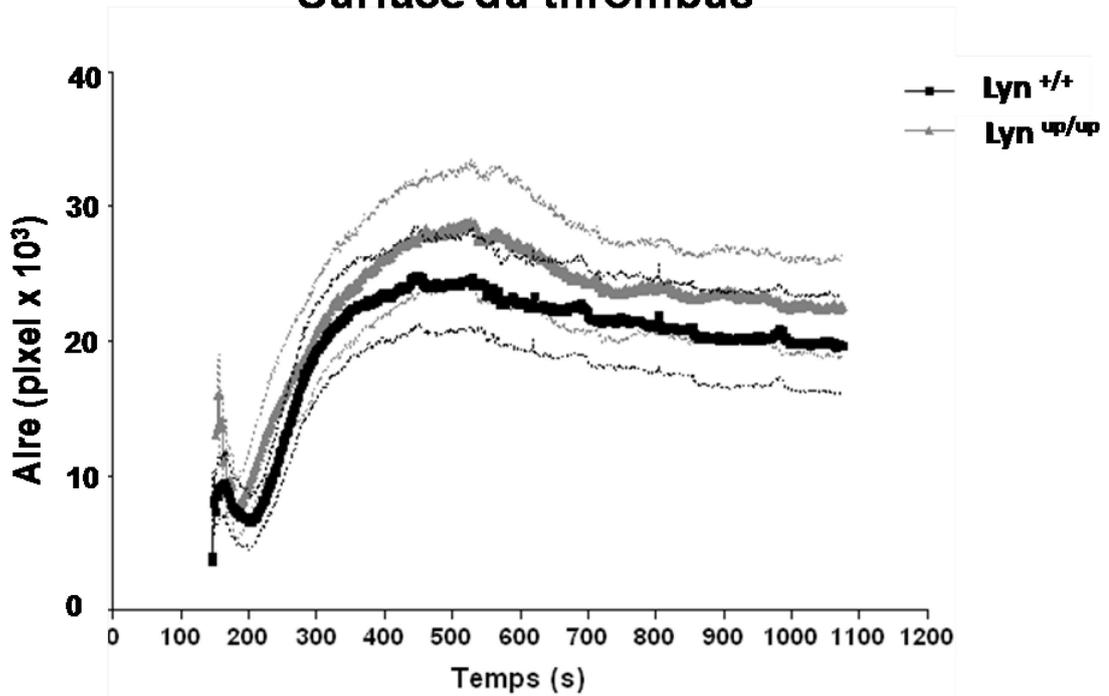
**Figure 42 Effet de l'activation constitutive de Lyn sur l'exposition de P-sélectine et la liaison du fibrinogène.** L'exposition de P-sélectine (A) et la liaison de fibrinogène (B) ont été mesurées par cytométrie de flux selon la technique détaillée dans la figure 38. Utilisation du test statistique t de student qui montre une augmentation de la liaison de fibrinogène des plaquettes Lyn<sup>up/up</sup> après stimulation par l'ADP et la thrombine (\*p<0,05) et une diminution de 80 % après stimulation par le CRP (\*p<0,05), n=3.

Les répercussions de l'activation constitutive de la kinase ont ensuite été évaluées *in vivo* sur le temps de saignement et dans la thrombose artérielle.

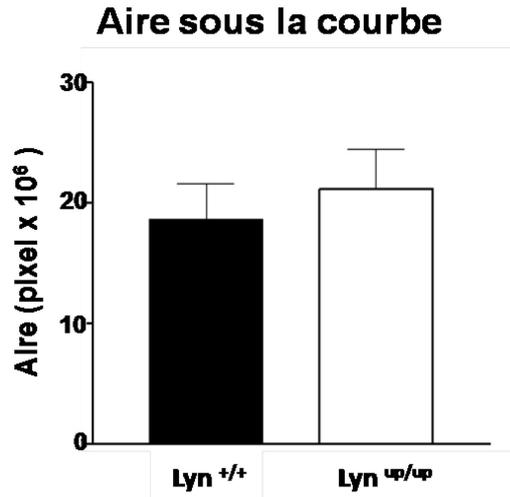
Les souris Lyn<sup>up/up</sup> montrent une faible diminution non significative du temps de saignement par rapport aux souris Lyn<sup>+/+</sup> qui s'arrêtent de saigner respectivement à 100 et 120 secondes après section de l'extrémité de la queue (Figure 43A).

Dans le modèle de thrombose par lésion de la carotide au FeCl<sub>3</sub> 7,5 % (Figure 43 B et C), l'évolution de la surface du thrombus en fonction du temps est très similaire avec une amplitude maximale légèrement supérieure mais non significative dans les souris Lyn<sup>up/up</sup>.

Les expériences réalisées *in vivo* ne montrent pas de répercussion de l'activité kinase de Lyn sur le temps de saignement ou la thrombose.

**A****Temps de saignement****B****Surface du thrombus**

C



**Figure 43 Effet d'une augmentation de l'activité kinase de Lyn sur le temps de saignement et la thrombose artérielle.** A) Mesure du temps de saignement (TS) après section de l'extrémité de la queue de souris Lyn <sup>+/+</sup> et Lyn <sup>up/up</sup>. Chaque point correspond à 1 souris et les barres horizontales à la valeur médiane. B) La thrombose artérielle est réalisée avec une solution de FeCl<sub>3</sub> (7.5%) selon la technique détaillée dans la figure 39, n=6 vaisseaux. C) Comparaison de l'aire sous la courbe représentée dans la figure B. Le test statistique t de student a été utilisé et ne montre pas de différence significative dans les deux figures.

Pris dans leur ensemble, les résultats obtenus avec les Lyn <sup>-/-</sup> et Lyn <sup>up/up</sup> montrent que Lyn i) n'est pas impliquée dans la formation des filopodes GPIb-V-IX dépendante, ii) est un régulateur négatif en aval du récepteur GPVI, ii) pourrait favoriser la signalisation en aval des récepteurs à l'ADP et à la thrombine.

### 1.1.3 Conclusion

L'implication d'une ou de plusieurs Src kinases dans la signalisation GPIb-V-IX a été révélée par l'utilisation de PP2 qui inhibe fortement la mobilisation calcique et l'émission de filopodes après adhésion des plaquettes sur FW (Mangin et al., 2003). L'objectif ici était d'identifier le sous-type de src kinase impliquée. L'avantage par rapport aux études existantes a été de pouvoir évaluer en parallèle les conséquences d'une déficience de Lyn et, à l'opposé, d'une stimulation constitutive de Lyn. Alors que Lyn semblait un bon candidat au vu de son interaction avec le complexe GPIb-V-IX (Wu et al., 2003), les résultats obtenus ici réfutent l'implication de Lyn dans la signalisation GPIb-V-IX. La seule étude ayant montré l'implication de Lyn dans la signalisation GPIb s'appuyait sur une diminution de l'étalement des plaquettes Lyn<sup>-/-</sup> sur FW en condition statique et sur une moindre

adhésion en condition de flux (Yin et al., 2008). L'interprétation de ces résultats est compliquée dans la mesure où l'étalement sur FW implique d'autres voies et récepteurs que ceux dépendant strictement de GPIb. Les effets observés pourraient également concerner les voies d'amplification par l'ADP ou le TxA2 et d'activation via l'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3.

L'étude plus globale des fonctions plaquettaires des souris Lyn<sup>-/-</sup> et Lyn<sup>up/up</sup> réalisée ici, est en accord avec un rôle inhibiteur de Lyn en aval de la signalisation GPVI et suggèrent un rôle activateur de Lyn en aval des agonistes solubles et de l'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 (Quek et al., 2000). Le rôle positif ou négatif de Lyn en aval des agonistes solubles et de l'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 fait débat (Cho et al., 2002; Maxwell et al., 2004). D'après nos résultats, l'étalement observé sur fibrinogène, l'exposition de P-sélectine et la liaison de fibrinogène après stimulation par l'ADP ou la thrombine ne sont pas modifiés par l'absence de Lyn mais sont augmentés lorsque l'activité kinase de Lyn est constitutive (Lyn<sup>up/up</sup>). Il est intéressant de noter que des résultats opposés entre Lyn<sup>-/-</sup> et Lyn<sup>up/up</sup> ne sont observés qu'en aval de GPVI suggérant une régulation plus complexe pour d'autres agonistes. Ces résultats ajoutés à ceux de la littérature ne permettent pas de conclure clairement sur le rôle de Lyn dans l'activation de l'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3. De façon non surprenante le rôle paradoxal activateur et inhibiteur de Lyn a déjà été décrit dans les lymphocytes B selon le type de récepteurs et de signalisations engagés (Xu et al., 2005). Ces rôles opposés de Lyn pourraient expliquer l'absence de phénotype, de tendance nette, en termes d'hémostase et de thrombose dans les deux lignées étudiées. Des expériences complémentaires sur d'autres modèles de thrombose après lésion laser superficielle permettraient de compléter cette étude.

## **1.2 Tec kinase : Btk**

L'émission de filopodes dépendante de GPIb est fortement diminuée par PP2, mais pas abolie, suggérant qu'une autre kinase intervienne en amont de PLC $\gamma$ 2. La famille des tyrosines kinases Tec pourrait être impliquée dans cette signalisation puisque ces protéines ont été décrites pour activer PLC $\gamma$ 2 en aval de GPVI (Atkinson et al., 2003). Cette famille contient deux protéines Tec et Btk.

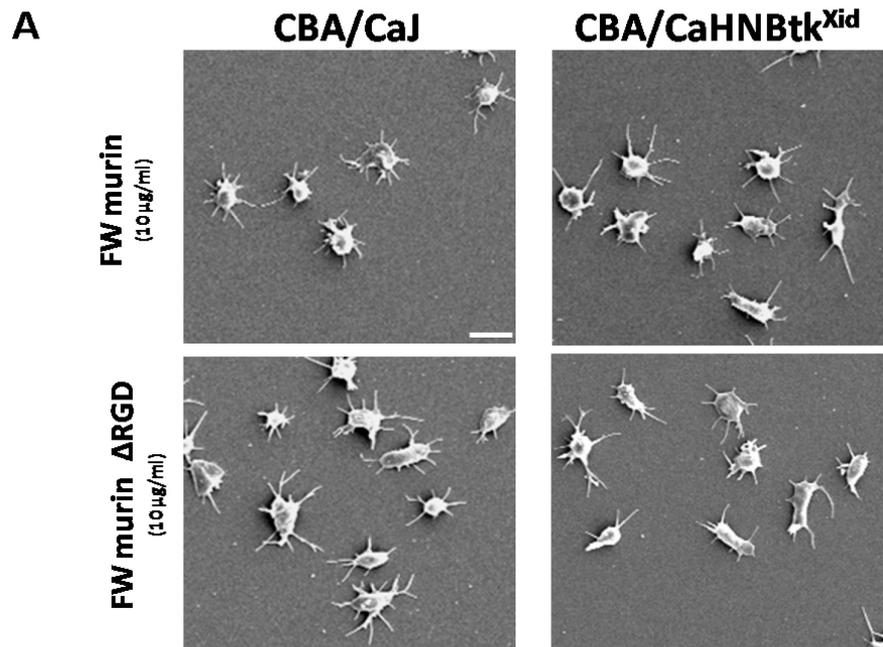
Le rôle de Btk a été évalué en utilisant des souris CBA/CaHN-Btk<sup>Xid</sup> (X-linked immunodeficiency) qui expriment Btk sous une forme constitutivement inactive (Berning et al., 1980). Ces souris ont un nombre et une taille des plaquettes comparables aux souris contrôles CBA/CaJ. Les fonctions plaquettaires ont déjà été étudiées dans plusieurs études avec des expériences *in vitro* et *in vivo* montrant que l'agglutination, en réponse au FW en présence de ristocétine, nécessite l'activité kinase de Btk et que Btk est nécessaire à la stabilité du thrombus. Cette même étude décrit que Btk régule la phosphorylation de PLC $\gamma$ 2 en aval de GPIb-V-IX (Suzuki-Inoue et al., 2004). Cependant, d'autres travaux suggèrent que ces réponses sont associées à l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et non spécifiques de la signalisation GPIb (Jackson et al., 2007). Une autre étude a utilisé ces souris pour mettre en évidence une nouvelle voie d'entrée du calcium qui implique le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI<sub>3,4,5</sub>P3) et Btk (Pasquet et al., 2000). Le rôle de Btk sur les fonctions plaquettaires a également été évalué grâce à l'utilisation de souris qui n'expriment plus Btk (Btk<sup>-/-</sup>). Des expériences d'agrégations, d'exposition de P-sélectine en réponse au CRP et des expériences d'adhésion sur collagène et fibrinogène suggèrent que Btk est impliquée en aval de GPVI en régulant la phosphorylation de PLC $\gamma$ 2 (Atkinson et al., 2003; Liu et al., 2006).

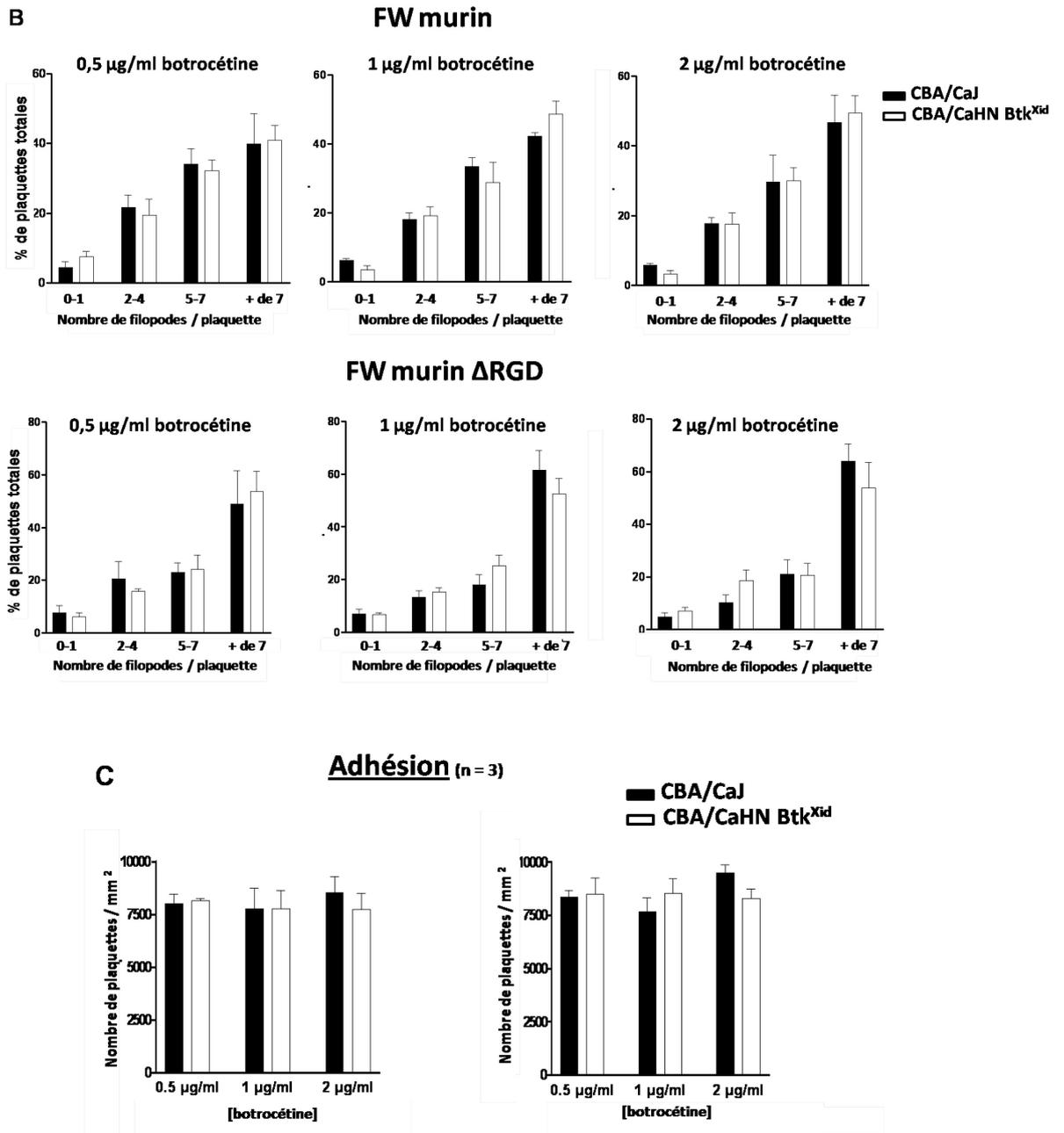
#### 1.2.1 Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante

Pour cette étude nous avons pu utiliser le FW murin dans lequel le site RGD (FW murin  $\Delta$ RGD) a été muté (Asp2509Gly) empêchant l'interaction avec l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Comme pour le FW murin utilisé jusqu'ici, il est fourni sous forme de surnageant de culture et nécessite d'être immunocapturé. La comparaison des FW avec ou sans site RGD muté montre une réactivité similaire en terme d'adhésion et d'émission de filopodes. Ceci confirme que l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 n'est pas impliquée dans ces conditions expérimentales.

Les souris CBA/CaJ contrôles provenant d'un autre fond génétique que les C57Bl6 utilisées jusqu'ici, une gamme de botrocétine a été utilisée afin d'évaluer la réactivité de leurs plaquettes sur FW. Les plaquettes sont très réactives aux deux surfaces, par rapport aux plaquettes C57Bl6, et font de nombreux filopodes par plaquette. La plus faible concentration de botrocétine (0,5  $\mu$ g/ml) suffit pour

une bonne activation (Figure 44 B). Par comparaison aux souris CBA/CaJ, les plaquettes exprimant Btk sans activité kinase CBA/CaHN-Btk<sup>Xid</sup> adhèrent et émettent des filopodes normalement quelque soient le FW et la concentration de botrocétine (Figure 44 A). Le nombre de plaquettes adhérentes n'est pas affecté (Figure 44 C). Ces résultats montrent que l'absence d'activité kinase de Btk ne modifie pas la capacité des plaquettes à émettre des filopodes et à adhérer sur FW.

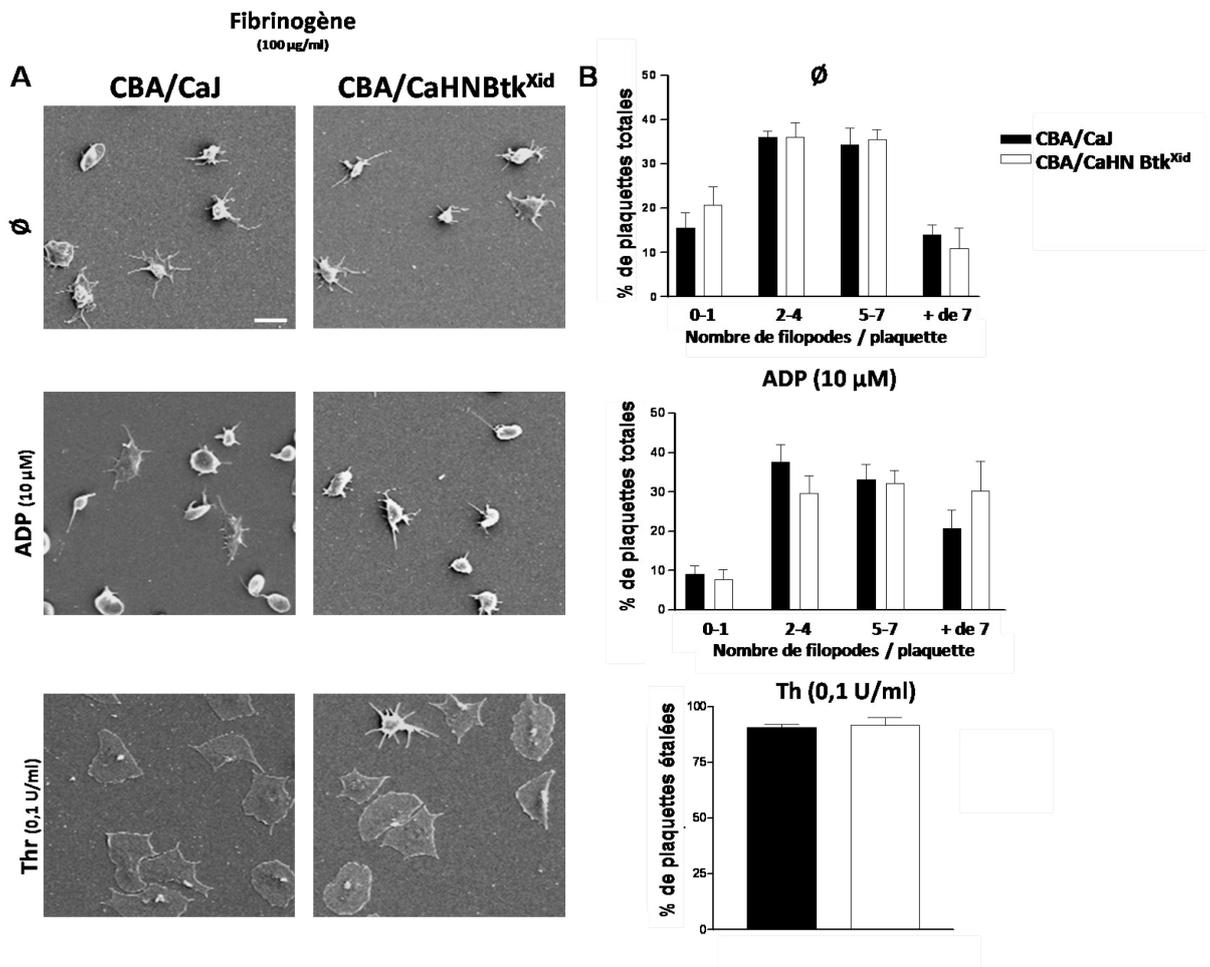


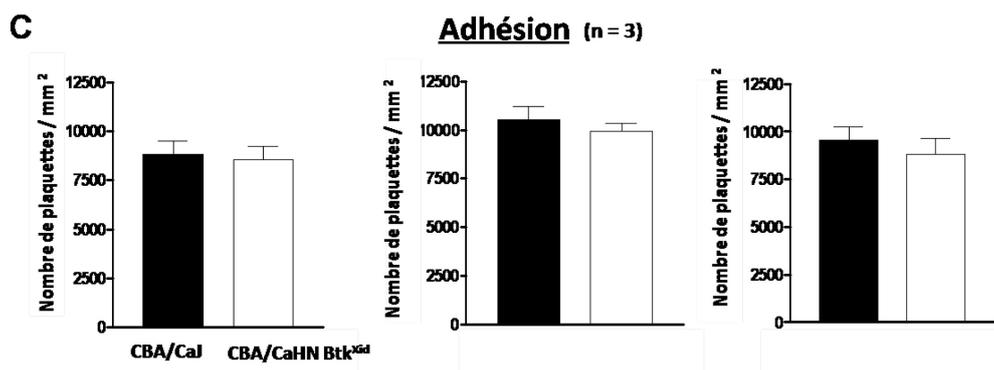


**Figure 44** Etude du rôle de Btk dans l'émission de filopodes après adhésion sur FW Adhésion des plaquettes de souris CBA/CaJ (30 000 pl/µl) ou CBA/CaHN Btk<sup>Xid</sup> sur une surface recouverte de FW murin ou FW murin ΔRGD selon les techniques détaillées dans la figure 36. n=3, barre = 3 µm. Quantification B) du changement morphologique des plaquettes en fonction du nombre de filopodes par plaquette, C) et de l'adhésion. Utilisation du test statistique non paramétrique Mann-Whitney qui ne montre aucune différence significative.

### 1.2.2 Etude de l'activation après adhésion sur fibrinogène

Les plaquettes de souris CBA/CaJ ou CBA/CaHN Btk<sup>Xid</sup> qui adhèrent sur une surface recouverte de fibrinogène se contractent et émettent des filopodes de la même façon (Figure 45), avec ou sans stimulation des plaquettes par l'ADP. Il faut noter que les plaquettes de ce fond génétique sont moins réactives sur cette surface que le fond C57Bl6. Après stimulation par la thrombine, les plaquettes des deux génotypes s'étalent de manière identique. Le nombre de plaquettes qui adhèrent n'est pas affecté quelque soient les conditions de stimulation. Ces résultats montrent que l'absence d'activité kinase de Btk ne modifie pas la capacité des plaquettes à adhérer, à émettre des filopodes et à s'étaler sur fibrinogène indiquant que Btk n'est pas impliquée dans l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.





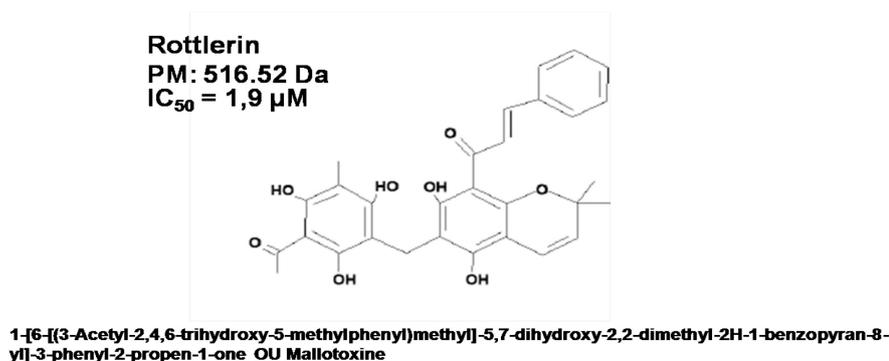
**Figure 45** Changements morphologiques des plaquettes de souris CBA/CaHN Btk<sup>Xid</sup> après adhésion sur fibrinogène. Adhésion des plaquettes de souris CBA/CaJ (30 000 pl/ $\mu$ l) ou CBA/CaHN Btk<sup>Xid</sup> sur une surface recouverte de fibrinogène humain (100  $\mu$ g/ml) en absence de stimulation ou après stimulation par l'ADP (5  $\mu$ M) ou la thrombine (0,1 U/ml) selon les techniques détaillées dans la figure 37. n=3, barre = 3  $\mu$ m. Quantification B) du changement morphologique des plaquettes C) et de l'adhésion. Test statistique non paramétrique Mann-Whitney qui ne montre aucune différence.

### 1.2.3 Conclusion

La Tec kinase Btk semblait être un bon candidat au vu de sa capacité à activer PLC $\gamma$ 2 en aval du complexe GPIb-V-IX et de GPVI (Liu et al., 2006; Suzuki-Inoue et al., 2004). Les résultats obtenus dans les souris Btk<sup>Xid</sup>, montrent que la signalisation GPIb-V-IX ne repose pas sur l'activité kinase de Btk. En fait, le rôle de Btk démontré précédemment par *Liu et al.* a été questionné sur la spécificité de la réponse GPIb (Jackson et al., 2007; Liu et al., 2006). Dans nos conditions, Btk ne semble pas jouer de rôle dans l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Nos résultats sont donc en accord avec ce qui a également été retrouvé dans des souris simple ou double KO Tec/Btk qui ne présentent pas de défaut d'agrégation et d'étalement en réponse à l'ADP ou après adhésion sur fibrinogène (Atkinson et al., 2003). Dans cette même étude le rôle clair et majeur de Btk en aval de GPVI a été mis en évidence dans des expériences d'agrégations en réponse au CRP et d'adhésion sur collagène. Cet effet semble plus marqué lorsque Tec et Btk sont simultanément absentes. D'après les résultats observés en aval de GPVI, il serait intéressant d'évaluer les plaquettes de souris simple et double KO Tec/Btk afin de compléter l'étude sur la signalisation GPIb et de vérifier s'il existe une compensation entre les deux protéines.

## 2) Sérine thréonine kinase : PKC $\delta$

De nombreux récepteurs plaquettaires aboutissent à l'activation d'une sérine/thréonine kinase PKC (Protéine Kinase C) dont la plaquette compte 9 isoformes. Ces kinases jouent un rôle critique attesté par l'inhibition de l'agrégation et la sécrétion en présence d'inhibiteurs de PKC tels que la calphostine ou le bisindolylmaleimide. Les PKC les plus classiques sont les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  qui sont régulés par une voie dépendante du calcium. La thrombine et le collagène permettent respectivement l'activation des PLC $\beta$  et  $\gamma$ , entraînant la génération de 1,2-diacylglycérol et la mobilisation calcique permettant l'activation de PKC. La régulation des isoformes  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ , et  $\eta$  ne semble pas être dépendante du calcium (Atkinson et al., 2001; Pears et al., 2008; Watson and Hambleton, 1989). Les plaquettes déficientes en PKC $\beta$  et  $\theta$  montrent une inhibition de l'étalement sur fibrinogène suggérant un rôle de ces deux isoformes dans la signalisation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Buensuceso et al., 2005; Soriani et al., 2006). Au contraire, les plaquettes déficientes pour PKC $\delta$  ont une agrégation et un étalement augmentés en réponse au collagène suggérant un rôle inhibiteur de cette kinase. PKC $\delta$  a également été décrite pour moduler négativement l'émission des filopodes en réponse au collagène (Pula et al., 2006). Cet isoforme est activé après stimulation des plaquettes par l'alboaggrégine A, un venin de serpent capable d'activer le récepteur GPIb-V-IX mais également d'autres récepteurs. Afin de vérifier si PKC $\delta$  est impliquée dans l'émission de filopodes dépendante de GPIb-V-IX des expériences ont été réalisées en présence d'un inhibiteur pharmacologique de son activité kinase, le Rottlerin (Figure 46).

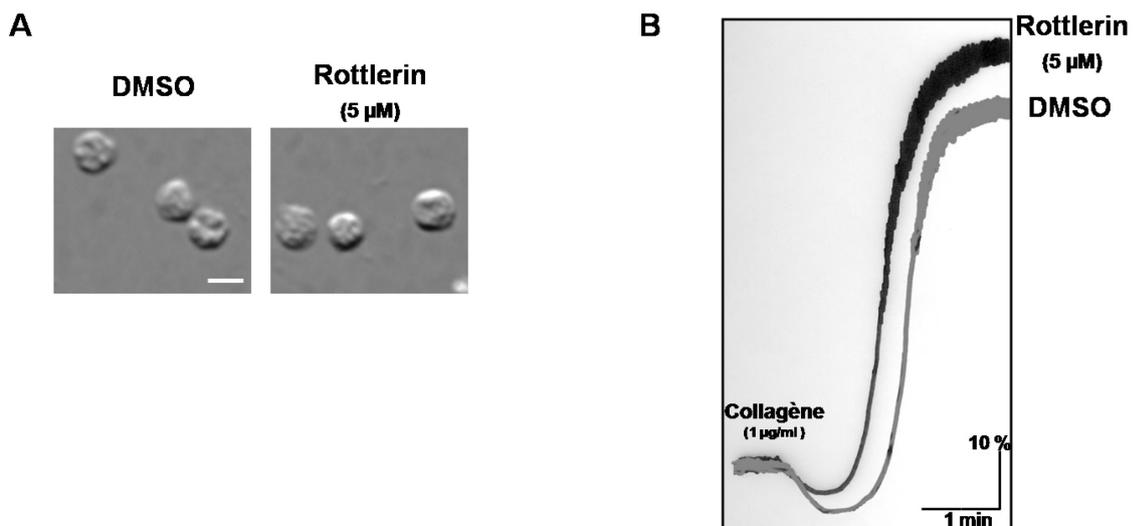


**Figure 46** Rottlerin : inhibiteur pharmacologique de PKC $\delta$

Dans un premier temps, l'effet propre du Rottlerin a été évalué sur des plaquettes humaines non activées, puis sur l'émission de filopode après adhésion sur FW et sur fibrinogène.

## 2.1 Effet du Rottlerin sur les plaquettes non activées et en réponse au collagène

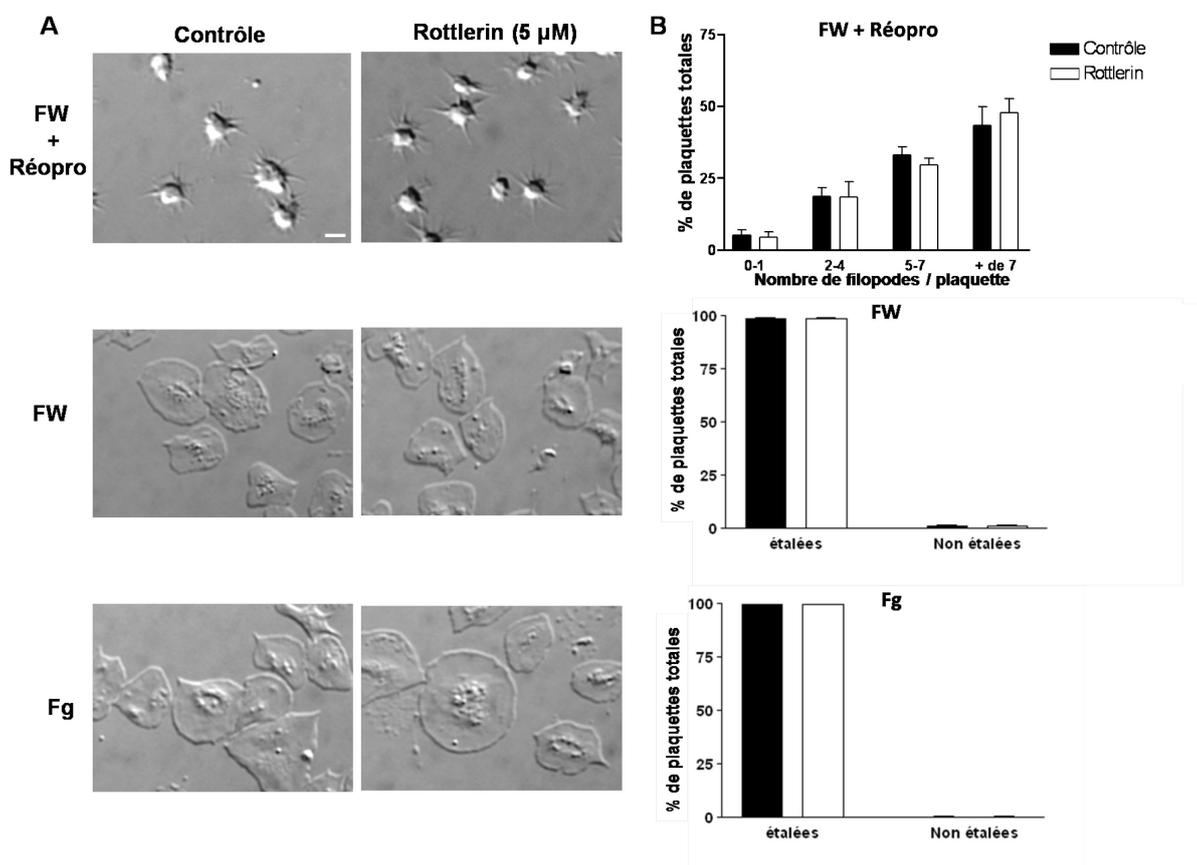
Les plaquettes incubées avec du Rottlerin restent discoïdes indiquant que cet inhibiteur n'affecte pas l'état basal des plaquettes (Figure 47 A). Il a été décrit que le Rottlerin augmente la réponse des plaquettes au collagène (Pula et al., 2006). Dans nos conditions, les plaquettes traitées par le Rottlerin présentent une petite diminution du temps de latence et un maximum d'agrégation plus élevé par comparaison aux plaquettes non traitées (Figure 47 B). Malgré la faible différence, ces résultats vont dans le sens des données de la littérature.



**Figure 47** Effet du Rottlerin sur les plaquettes humaines au repos ou activées par le collagène. Les plaquettes humaines lavées (30 000 pl/ $\mu$ l) ont été incubées avec le tampon contrôle contenant du DMSO (0,5%) ou du Rottlerin (5  $\mu$ M) pendant 10 min à 37°C, (A) Fixation directe avec du PFA 4% et capturées sur une lamelle de verre recouverte de Poly-L-lysine pendant 20 min. Observation des échantillons par microscopie à Contraste Interférentiel Différentiel (DIC). Barre = 2  $\mu$ m. B) Agrégation des plaquettes (300 000 pl/ $\mu$ l) en réponse au collagène (1  $\mu$ g/ml).

## 2.2 Effet du Rottlerin sur l'émission de filopodes

Les plaquettes humaines émettent des filopodes et s'étalent sur FW. Afin de visualiser spécifiquement l'émission de filopodes dépendante de GPIb-V-IX, les expériences sont réalisées en présence d'un inhibiteur de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, le Réopro. Dans ces conditions, les plaquettes traitées par le Rottlerin se contractent et émettent des filopodes de la même façon que les plaquettes contrôles (Figure 48). De même, le Rottlerin ne modifie pas l'étalement des plaquettes adhérant sur FW en absence de Réopro ou adhérant sur fibrinogène. Ces résultats suggèrent que PKC $\delta$  n'est pas impliquée dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante ni dans l'étalement dépendant de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.



**Figure 48** Effet du Rottlerin sur les changements morphologiques des plaquettes humaines adhérant sur FW ou fibrinogène. A) Adhésion des plaquettes humaines lavées (30 000 pl/ $\mu$ l), incubées dans un tampon contenant du DMSO (0,5%) ou du Rottlerin (5  $\mu$ M) pendant 10 min, sur du FW (10  $\mu$ g/ml) en présence de botrocétine (2  $\mu$ g/ml) avec ou sans Réopro (40  $\mu$ g/ml) ou sur du fibrinogène (100  $\mu$ g/ml). Après 20 min (FW) ou 30 min (Fg) d'adhésion à 37  $^{\circ}$ C les plaquettes sont fixées avec du PFA 4 % et observées en microscopie DIC. Les images sont représentatives de 3 expériences. Barre = 2  $\mu$ m. B) Quantification de l'émission de filopodes et de l'étalement. Test statistique non paramétrique Mann-Whitney qui ne montre pas de différence significative.

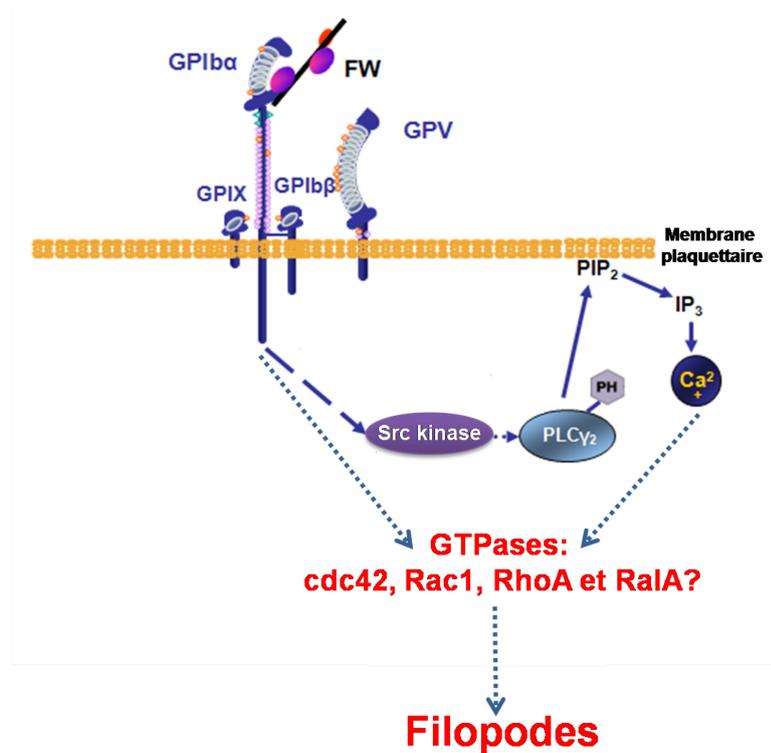
## 2.3 Conclusion

Seule PKC $\delta$ , parmi les différentes PKC présentes dans la plaquette, a déjà été impliquée en tant qu'inhibiteur de l'activation en aval de GPVI (Pula et al., 2006). Son rôle potentiel en aval de GPIb-V-IX semble écarté au vu de l'absence d'effet du Rottlerin. Une analyse des résultats publiés par Pula et al. indique que les filopodes émis lors de l'adhésion plaquettaire sur collagène impliquent des mécanismes distincts de ceux observés lors de l'adhésion sur FW. Les plaquettes qui adhèrent sur collagène s'étalent rapidement pour former des filopodes issus de lamellipodes préexistants. Par contre, lors de l'activation sur FW, les filopodes sont formés dès la transition du stade disque à sphère sans qu'il y ait eu formation de lamellipodes. Cette même transformation est observée pour les plaquettes adhérant sur fibrinogène et aux stades très précoces de l'adhésion sur collagène. Il est donc possible que PKC $\delta$  soit plutôt impliquée dans un mécanisme tardif qui correspondrait au modèle d'élongation par convergence proposé pour les cellules adhérentes (Cf Revue bibliographique) (Mattila and Lappalainen, 2008). La signalisation GPIb-V-IX/FW a été proposée pour entraîner l'activation d'une ou plusieurs PKC (Kroll et al., 1993). Les PKC activées classiquement par la production d'IP3 et de DAG sont les PKC  $\beta$ ,  $\alpha$  et  $\gamma$ . Cependant l'ajout d'inhibiteurs de PKC (calphostine ou bisindolylmaleimide) ne modifie pas la capacité des plaquettes à se contracter et à émettre des filopodes (Yuan et al., 1999) suggérant ainsi que ces kinases ne soient pas impliquées dans la réorganisation du cytosquelette en aval de GPIb.

### C) Rôle des GTPases

L'implication des GTPases dans la réorganisation du cytosquelette d'actine a largement été mise en évidence. Les Rho GTPases Cdc42, Rac1 et RhoA ont été décrites pour jouer un rôle respectivement dans la formation des filopodes, des lamellipodes et des fibres de stress (Kjoller and Hall, 1999). Cependant, Rac1 et RhoA ont également été décrites pour être impliquées dans l'émission de filopodes (Dumontier et al., 2000; Heckman et al., 2009). La Ras GTPase RalA a été décrite pour réguler le cytosquelette d'actine et plus particulièrement la formation de filopodes dans les fibroblastes dans deux études différentes (Ohta et al., 1999; Sugihara et al., 2002).

Dans la suite du travail nous avons étudié le rôle de ces GTPases dans l'émission de filopodes dépendante du complexe GPIb-V-IX (Figure 49).



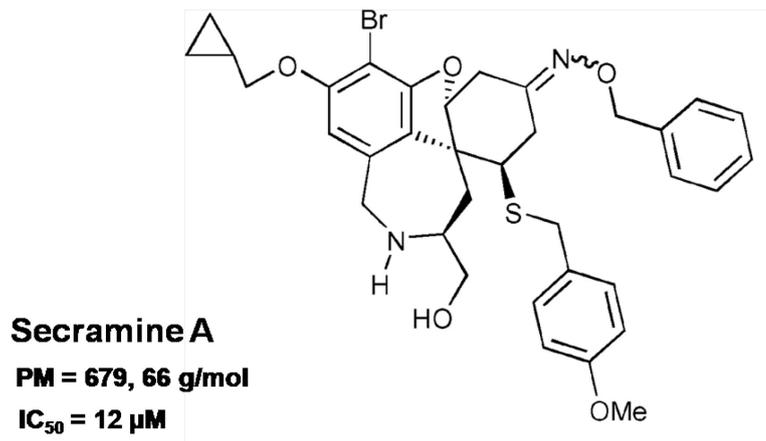
**Figure 49** Rôle potentiel des GTPases Cdc42, Rac1, RhoA et Ra1A dans l'émission de filopodes en aval de la signalisation GPIb-V-IX

## 1) Rho GTPases

### 1.1 Cdc42

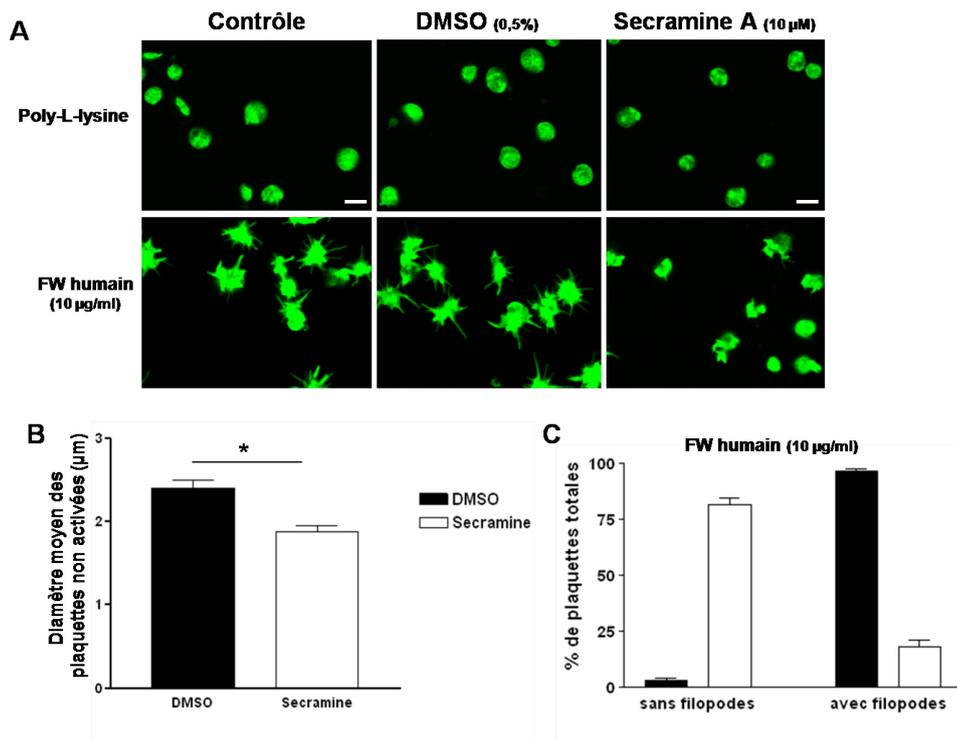
Le rôle de Cdc42 dans la formation des filopodes a été bien établi dans différents types cellulaires mais pas clairement montré dans la plaquette (Wood and Martin, 2002). Pour cela, deux approches ont été utilisées : i) l'utilisation de la sécramine A, un composé récemment décrit pour inhiber sélectivement Cdc42 et ii) l'étude des souris n'exprimant plus Cdc42 au niveau de la lignée mégacaryocytaire (Cdc42<sup>-/-</sup>).

#### 1.1.1 Effets de la Secramine A



**Figure 50** Secramine A : inhibiteur pharmacologique de Cdc42

Des plaquettes humaines lavées et incubées avec de la Secramine A (Figure 50) puis directement fixées présentent une forme discoïde mais leur diamètre semble réduit. Les plaquettes mises à adhérer sur une surface de FW en présence de Réopro et traitées par la Secramine A se contractent mais ne forment presque plus de filopodes (Figure 51). Seulement 20 % des plaquettes traitées forment des filopodes contre 98 % des plaquettes contrôles. Ce résultat suggère que Cdc42 puisse jouer un rôle dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante. Cependant, la possibilité d'effets non spécifiques de la Secramine A nécessite une approche plus convaincante. Pour cela nous avons étudié des souris déficientes pour Cdc42 dans la plaquette obtenues par un croisement de souris Cdc42<sup>Flox/Flox</sup> avec des souris PF4/cre+, fournies par le Pr B. Nieswandt.



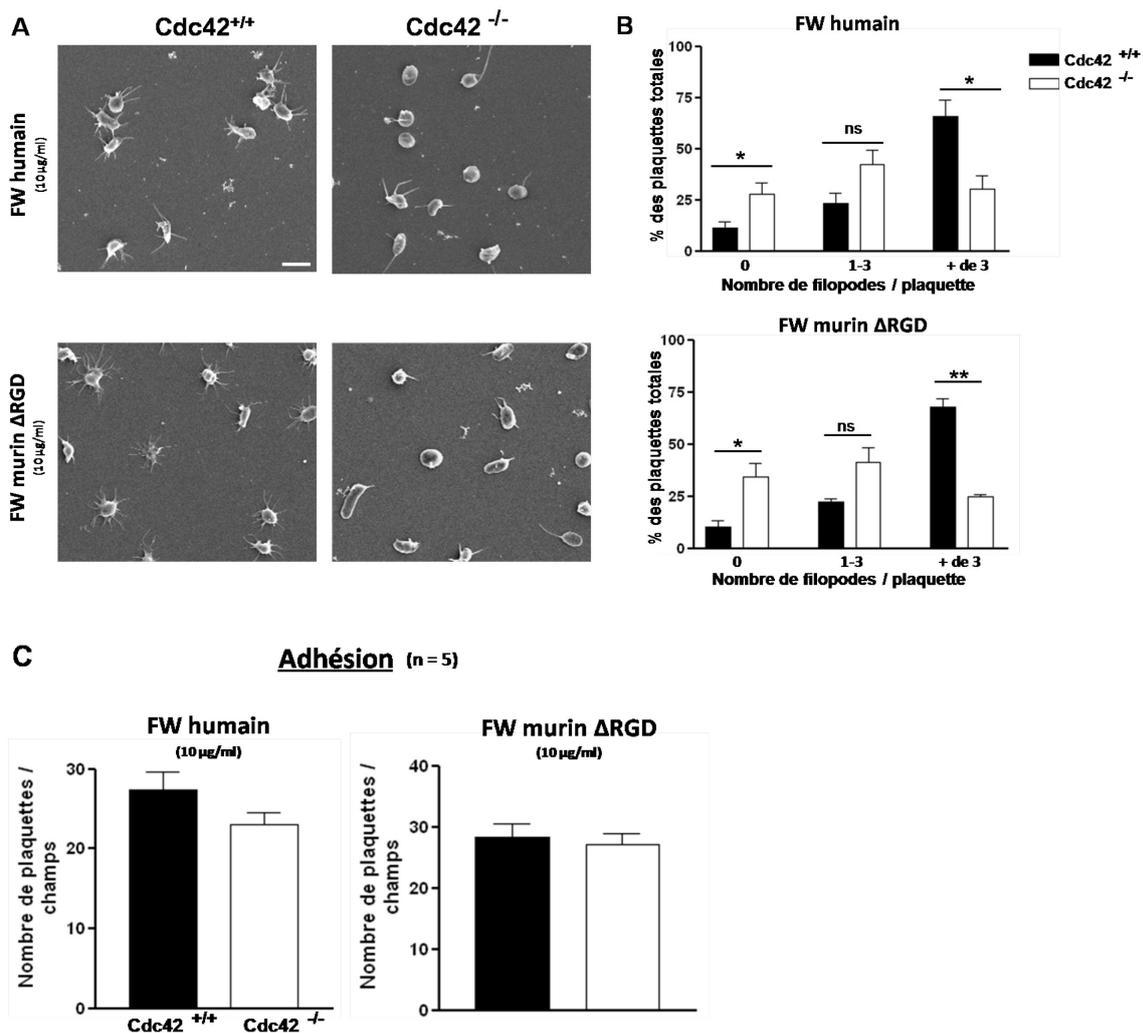
**Figure 51** Effet de la Secramine A sur les plaquettes humaines au repos ou qui ont adhéré sur FW. **A)** Des plaquettes humaines lavées (30 000 pl/µl) incubées pendant 10 min à 37 °C avec du tampon contenant du plaintyrode, du DMSO (0,5%) ou de la Secramine A (10 µM) sont fixées directement avec du PFA 4% puis capturées sur la Poly-L-lysine ou mises à adhérer sur FW (10 µg/ml) en présence de botrocétine (2 µg/ml) et de réopro (40 µg/ml) puis lavées et fixées après 20 min d'adhésion. Les plaquettes sont marquées avec la phalloïdine-TRITC et observées au microscope à fluorescence. Barre= 2 µm. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences. **B)** La quantification du diamètre des plaquettes fixées directement a été réalisée grâce au logiciel Metamorph et le test t de student montre que la différence est significative (\*p<0,05). **C)** Quantification du pourcentage des plaquettes totales avec ou sans filopodes après adhésion sur FW.

### 1.1.2 Etude des souris Cdc42<sup>-/-</sup>

Les souris Cdc42<sup>-/-</sup> ont une taille identique aux souris Cdc42<sup>+/+</sup> mais un nombre de plaquettes diminué de 50 %. L'agrégation et la sécrétion plaquettaire, le temps de saignement et la thrombose ont été étudiés dans ces souris par l'équipe du Pr. Nieswandt. L'ultrastructure et la réponse au FW, fibrinogène et aux agonistes solubles ont été analysées dans notre laboratoire. L'ensemble des résultats a donné lieu à la rédaction d'un article, présenté en Annexe 1, soumis pour publication dans Blood.

Par comparaison aux souris Cdc42<sup>+/+</sup>, les plaquettes de souris Cdc42<sup>-/-</sup> présentent une forte diminution de leur capacité à émettre des filopodes après adhésion sur FW humain, murin ou murin

$\Delta$ RGD avec une proportion importante de plaquettes qui restent discoïdes ou émettent très peu de filopodes (Figure 52 A, **Annexe 1 Figure 3D**). Seulement 27 % des plaquettes  $Cdc42^{-/-}$  émettent plus de 3 filopodes contre 68% pour les plaquettes  $Cdc42^{+/+}$  (Figure 52 B, **Annexe 1 Figure 3D**). Ces différences sont statistiquement significatives après utilisation du test non paramétrique de Mann-Whitney avec des valeurs de  $p < 0,05^*$  et  $< 0,01^{**}$ . L'absence de  $Cdc42$  n'affecte pas la capacité des plaquettes à adhérer sur FW (Figure 52 C).

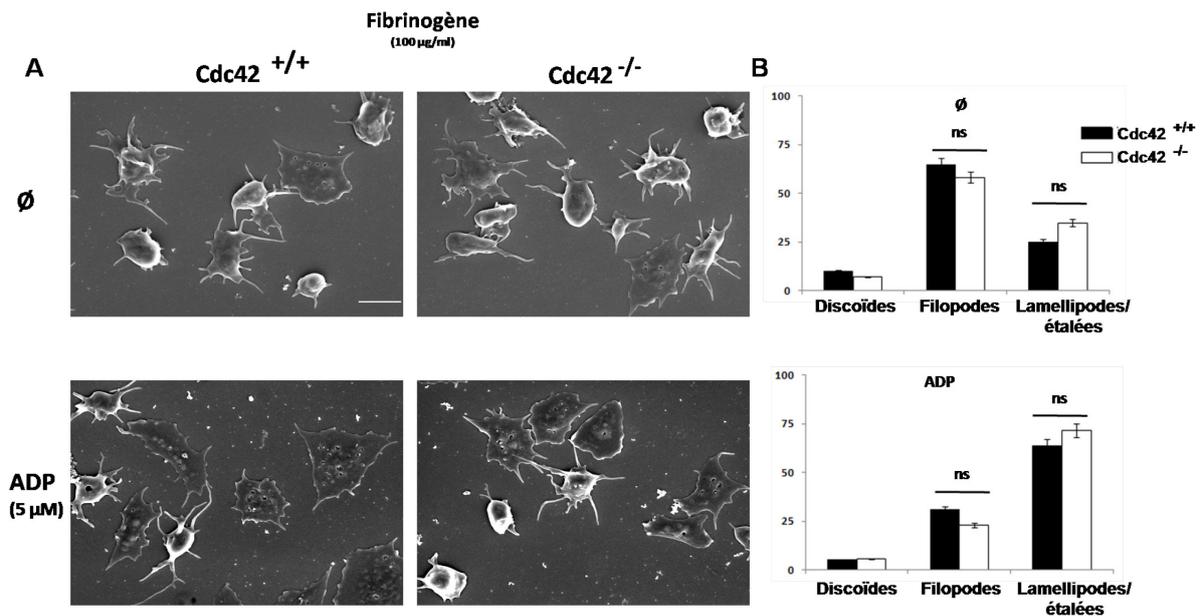


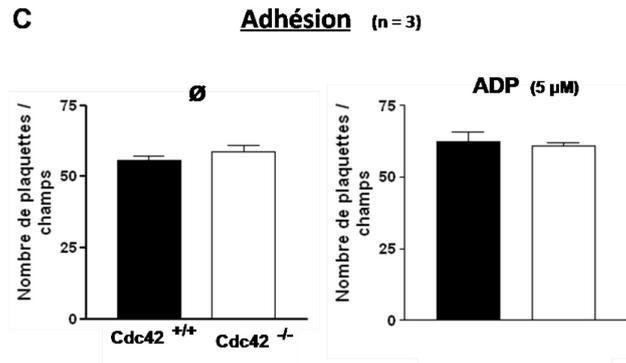
**Figure 52** Etude de l'émission de filopode dépendante du complexe GPIb-V-IX dans la lignée de souris  $Cdc42^{-/-}$ . Adhésion des plaquettes de souris  $Cdc42^{+/+}$  (30 000 pl/ $\mu$ l) et  $Cdc42^{-/-}$  sur une surface de FW humain ou FW murin  $\Delta$ RGD selon les techniques détaillées dans la figure 36. n=5 Barre = 3  $\mu$ m. B) Quantification de l'émission de filopodes C) et de l'adhésion. Test statistique non paramétrique de Mann-Whitney qui montre que les plaquettes de souris  $Cdc42^{-/-}$  sont significativement plus discoïdes et ont moins de filopodes que les plaquettes de souris  $Cdc42^{+/+}$  avec  $p < 0,05^*$  ou  $< 0,01^{**}$ .

Ces résultats montrent que Cdc42 joue un rôle dans l'émission de filopodes dépendante de la signalisation GPIb-V-IX.

### 1.1.3 Etude de l'adhésion sur fibrinogène

Afin de déterminer si Cdc42 joue également un rôle en réponse à d'autres stimulations, des expériences d'adhésion ont été réalisées sur une surface de fibrinogène. Contrairement à la réponse sur FW, les plaquettes de souris Cdc42<sup>-/-</sup> qui adhèrent sur fibrinogène se contractent et émettent des filopodes de la même façon que les plaquettes de souris cdc42<sup>+/+</sup> (Figure 53 A). De même, après stimulation par l'ADP, les plaquettes forment des lamellipodes présentant à leurs extrémités des filopodes de manière similaire dans les deux génotypes. La quantification ne révèle pas de différence significative entre les plaquettes de souris Cdc42<sup>+/+</sup> et Cdc42<sup>-/-</sup> (Figure 53 B).





**Figure 53** Etude des changements morphologiques des plaquettes Cdc42<sup>-/-</sup> lors de l'adhésion sur fibrinogène. **A)** Adhésion des plaquettes de souris Cdc42<sup>+/+</sup> et Cdc42<sup>-/-</sup> sur une surface de fibrinogène (100 µg/ml) avec ou sans préstimulation à l'ADP (5 µM) selon les techniques détaillées dans la figure 37. n=3, Barre = 3 µm. **B)** Quantification de l'émission de filopodes **C)** et de l'adhésion. Test statistique non paramétrique de Mann-Whitney qui ne montre pas de différence significative.

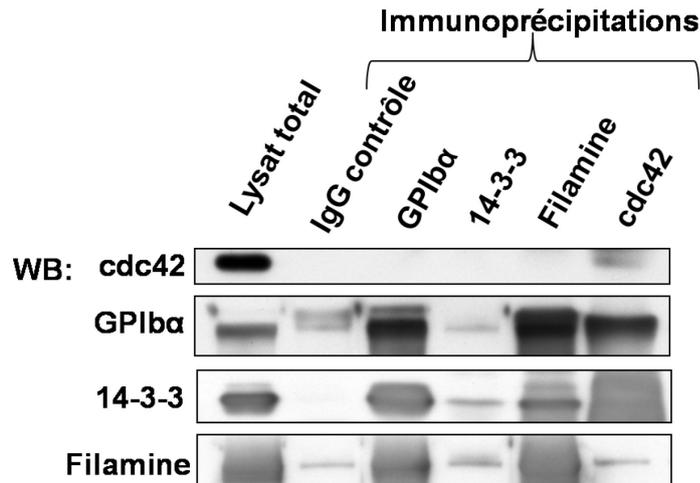
Le rôle de Cdc42 a ensuite été évalué en réponse à des agonistes solubles sur des plaquettes en suspension (**Annexe 1, Figure 3C**). Les plaquettes de souris Cdc42<sup>+/+</sup> et Cdc42<sup>-/-</sup> se contractent et émettent des filopodes de la même façon en réponse à l'ADP ou la thrombine.

Ces résultats obtenus en conditions d'adhésion ou de stimulation par les agonistes solubles suggèrent un rôle de Cdc42 spécifique dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante. Par ailleurs, la présence de plaquettes discoïdes montre également un rôle de Cdc42 dans le processus de contraction accompagnant l'émission de filopodes.

#### 1.1.4 Evaluation de l'interaction entre Cdc42 et le complexe GPIb-V-IX

Devant ce rôle spécifique nous avons essayé de déterminer si Cdc42 pouvait interagir avec le complexe GPIb-V-IX dans des expériences d'immunoprécipitation (Figure 54).

Précédemment, Cdc42 a été décrit pour interagir avec la filamine et la 14-3-3 (Bialkowska et al., 2003; Ohta et al., 1999), deux partenaires établis de la GPIb indiquant un mécanisme possible de liaison entre Cdc42 et le complexe.



**Figure 54** Etude de l'interaction entre Cdc42 et le complexe GPIb-V-IX ou ses partenaires intracellulaires (Filamine A et 14-3-3). Des plaquettes humaines lavées ( $3 \times 10^6$  pl/ $\mu$ l) ont été lysées en présence de Triton X-100, puis les lysats ont été immunoprécipités par 10  $\mu$ g d'anticorps MOPC.31 (IgG contrôle), ALMA.12 (GPIb $\alpha$ ), H-8 (14-3-3 $\beta$ ), MAB1678 (Filamine) et CDC42 (Cdc42). Le lysat total et le produit des différentes IP ont été déposés sur un gel d'acrylamide 12% et des immunoempreintes (WB) ont été réalisées en présence d'Ac dirigés contre Cdc42, GPIb $\alpha$ , 14-3-3 et filamine. n=2.

Le Western Blot correspondant à Cdc42 révèle une bande pour le lysat total et l'immunoprécipitation (IP) de Cdc42, mais aucune bande pour les autres IPs. Dans l'expérience inverse, l'IP par Cdc42 révèle une bande avec un poids moléculaire qui pourrait correspondre à la GPIb $\alpha$ , mais aucune positivité pour 14-3-3 et Filamine A. Cette expérience demande confirmation car le poids moléculaire observé ( $\sim 130$  kDa) est proche de celui d'une IgG en condition non réduite. Ce résultat suggère que Cdc42 n'est pas capable d'interagir avec la Filamine et 14-3-3. A l'inverse, l'IP par ALMA.12 révèle, comme attendu, une coprécipitation de la Filamine A et de la 14.3.3. De même, les IPs 14.3.3 et Filamine A révèlent chacune une bande correspondant à la GPIb $\alpha$ , confirmant que ces deux protéines sont des partenaires du complexe GPIb-V-IX.

1.1.5 Annexe 1 : Increased granule secretion and accelerated thrombus formation in mice lacking Cdc42 in platelets

**Article soumis à Blood**

**Increased granule secretion and accelerated thrombus formation in mice lacking Cdc42 in platelets**

Running title: Cdc42 in platelets

Irina Pleines<sup>1</sup>, Anita Eckly<sup>2</sup>, Margitta Elvers<sup>1</sup>, Ina Hagedorn<sup>1</sup>, Sandra Eliautou<sup>2</sup>, Markus Bender<sup>1</sup>, Xunwei Wu<sup>3</sup>, Francois Lanza<sup>2</sup>, Christian Gachet<sup>2</sup>, Cord Brakebusch<sup>3</sup>, and Bernhard Nieswandt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Würzburg, Chair of Vascular Medicine, University Clinic, and Rudolf Virchow Center, DFG Research Center for Experimental Biomedicine; <sup>2</sup>UMR-S949 Inserm-Université de Strasbourg, EFS-Alsace, Strasbourg, France, <sup>3</sup>BRIC, Biomedical Institute, University of Copenhagen, Denmark

Scientific Section Heading: Thrombosis and Hemostasis

total word count: 4997

abstract word count: 197

**Address correspondence to:**

Bernhard Nieswandt, PhD  
Chair of Vascular Medicine,  
Rudolf Virchow Center  
DFG Research Center for Experimental Biomedicine  
University Clinic Würzburg  
Josef-Schneider-Str. 2  
97080 Würzburg  
Fon: + 49 931 31 80405  
Fax: + 49 931 201 48068  
E-mail: [bernhard.nieswandt@virchow.uni-wuerzburg.de](mailto:bernhard.nieswandt@virchow.uni-wuerzburg.de)

## **ABSTRACT**

Platelet activation at sites of vascular injury is crucial for hemostasis, but it may also cause myocardial infarction or stroke. Cytoskeletal reorganization is essential for the process of platelet activation and secretion. The small GTPase Cdc42 has been implicated as an important mediator of filopodia formation, as well as exocytosis in various cell types, but its exact function in platelets is not established. Here we show that the megakaryocyte/platelet-specific loss of Cdc42 leads to mild thrombocytopenia and a small increase in platelet size in mice. Unexpectedly, Cdc42-deficient platelets were able to form normally shaped filopodia and spread fully on fibrinogen upon activation, whereas filopodia formation upon selective induction of GPIb signaling was reduced compared to wild-type platelets. Surprisingly, Cdc42-deficient platelets showed enhanced secretion of  $\alpha$  and dense granules, a higher ADP/ATP content, increased aggregation at low agonist concentrations and enhanced aggregate formation on collagen under flow. In vivo, Cdc42-deficient platelets displayed a markedly decreased life span, suggesting a pre-activated state of the cells under physiological conditions. The hyperactivity of Cdc42-deficient platelets lead to faster occlusion of ferric chloride injured arterioles. These data point to a novel function of Cdc42 in the regulation of platelet activation and degranulation.

Signalement bibliographique ajouté par :

**l'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de la Documentation**

**Increased granule secretion and accelerated thrombus formation in mice lacking Cdc42 in platelets**

Irina PLEINES, Anita ECKLY, Margitta ELVERS, Ina HAGEDORN, Sandra ELIAUTOU, Markus BENDER, Xunwei WU, Francois LANZA, Christian GACHET, Cord BRAKEBUSCH, and Bernhard NIESWANDT

***Blood, soumis, 2009***

**Annexe 1 : p. 139-172**

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

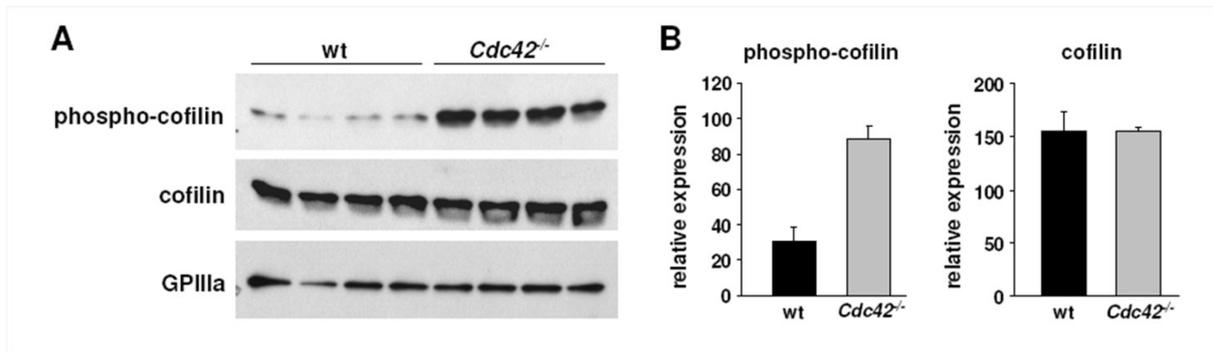
Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

## Supplemental Figure 2



### 1.1.6 Conclusion

Afin d'évaluer le rôle de Cdc42 dans l'émission de filopodes, deux approches ont été utilisées. La première, basée sur l'utilisation de l'inhibiteur spécifique, la Sécramine A, a montré une inhibition mais ne permettait pas de conclure entièrement au vu de l'effet potentiellement aspécifique de la Sécramine A sur les plaquettes au repos. La deuxième, utilisant les plaquettes de souris déficientes pour Cdc42 a montré de manière plus convaincante l'implication de Cdc42 dans l'émission de filopodes en aval de GPIIb. Ce rôle semble spécifique de cette voie puisque l'absence de Cdc42 n'affecte pas l'émission de filopodes et les autres changements morphologiques en aval du fibrinogène et d'agonistes solubles médiés par l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Il serait cependant intéressant de réaliser des expériences complémentaires avec de faibles doses d'agonistes (ADP, Thrombine,..) permettant de compléter cette étude. Précédemment, deux études, utilisant la Secramine A, avaient montré un rôle activateur de Cdc42 dans l'émission de filopodes en aval de l'intégrine  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 et de GPVI (Chang et al., 2005; Pula et al., 2006). Au vu de l'effet aspécifique de la Secramine A, ces résultats sont à prendre avec précautions et devraient être confirmés dans les souris Cdc42<sup>-/-</sup>. L'absence du rôle de Cdc42 en aval des autres voies d'activation observée dans notre étude pourrait être en accord avec les données de la littérature qui montrent que l'absence de Cdc42 n'empêche pas la formation des filopodes dans les fibroblastes (Czuchra et al., 2005). Des études récentes suggèrent l'existence des mécanismes d'émission de filopodes indépendant de Cdc42 qui pourraient impliquer d'autres GTPases comme Rif

ou LRP1 (Ellis and Mellor, 2000; Sigal et al., 2007). Cdc42 a été décrit, dans des fibroblastes Swiss 3T3, pour interagir avec la Filamine A qui est un partenaire du complexe GPIb-V-IX (Ohta et al., 1999). Dans la plaquette, nos premiers résultats d'IP n'ont pas permis de montrer une interaction de Cdc42 avec le complexe ou avec un de ses partenaires. Des expériences complémentaires utilisant d'autres anticorps et une analyse des bandes coprécipitées en spectrométrie de masse pourraient permettre une détection plus sensible. Des expériences réalisées avec des plaquettes de souris Cdc42<sup>-/-</sup> en présence d'inhibiteur de src kinase PP2 ne révèlent pas d'effet additionnel d'inhibition des filopodes (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que Cdc42 se trouve dans la voie de signalisation connue passant par src (en aval ou en amont) plutôt que dans une voie distincte, supplémentaire.

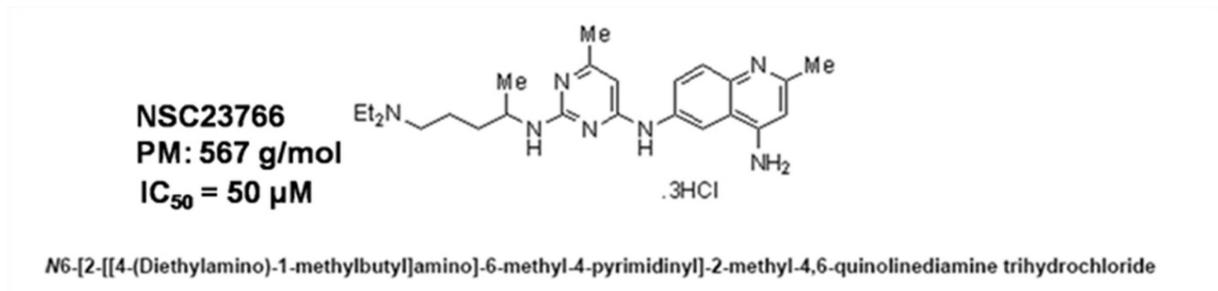
D'autres fonctions plaquettaires des souris déficientes pour Cdc42 ont été évaluées (**Annexe 1**). De façon inattendue, Cdc42 semble exercer un effet négatif sur la sécrétion des granules denses et  $\alpha$  dans la plaquette alors qu'elle est connue pour favoriser l'exocytose dans d'autres types cellulaires. Les mécanismes impliqués dans les phénomènes d'exocytose plaquettaire ne sont pas clairement définis. Une possibilité pourrait être que Cdc42 régule négativement la réorganisation du cytosquelette nécessaire à l'exocytose dont les mécanismes sont controversés dans la plaquette. Une autre explication possible de la sécrétion augmentée en absence de Cdc42 pourrait être la concentration plus importante d'ADP/ATP stockée dans les granules qui ont également une plus grande taille. De plus Cdc42 semble réprimer l'activation plaquettaire en aval de GPVI et des agonistes solubles, qui se traduit dans les plaquettes de souris Cdc42<sup>-/-</sup> par une augmentation i) de l'agrégation à faible doses d'agonistes, ii) de l'exposition de P-sélectine, iii) de la taille du thrombus *in vivo*.

L'absence de Cdc42 se traduit donc par plusieurs modifications des réponses plaquettaires par des mécanismes encore mal définis. Cependant, son implication nette dans une réponse spécifique en aval de GPIb en fait un modèle intéressant pour étudier le rôle de cette voie d'activation.

## 1.2 Rac1

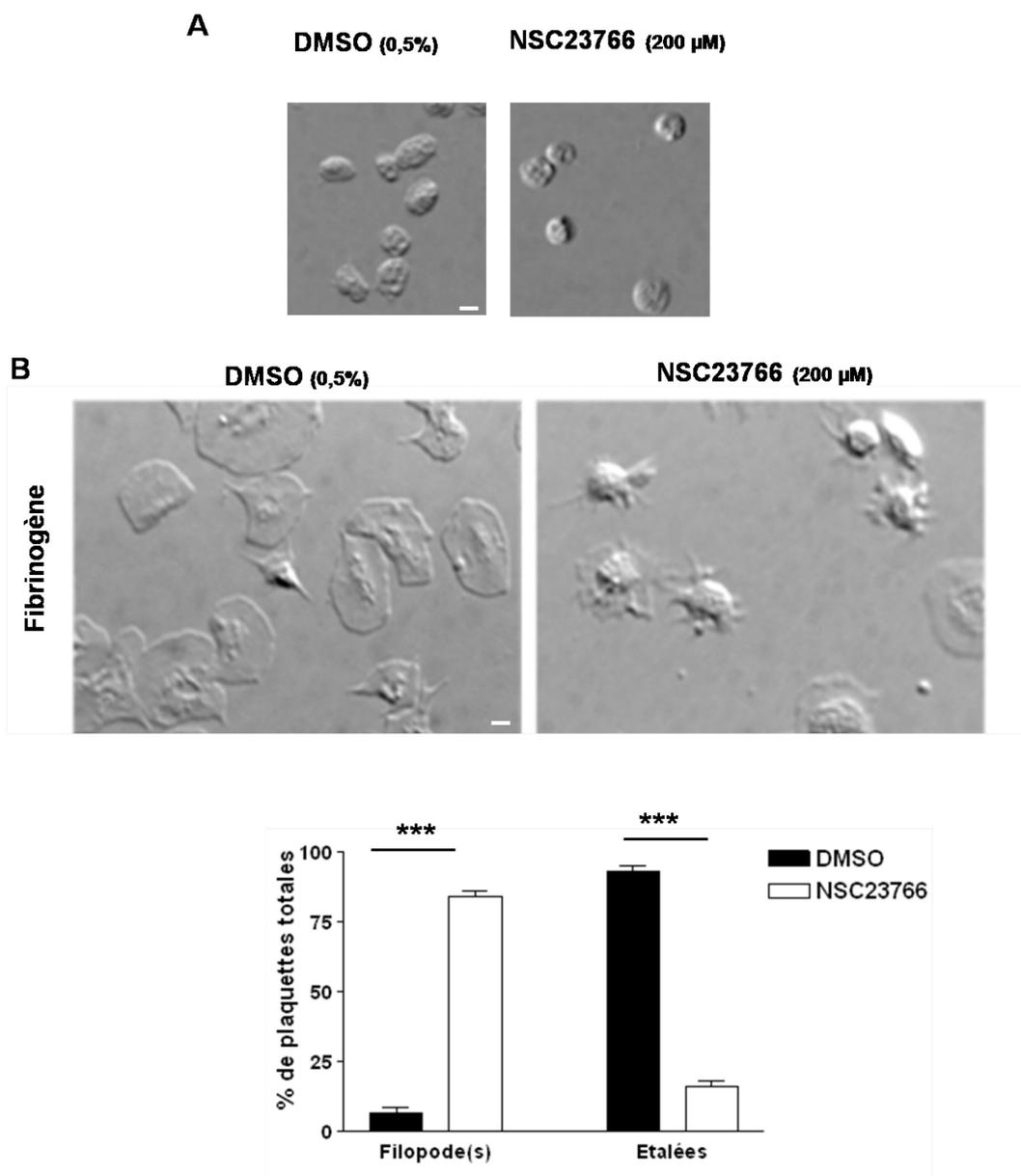
Rac1 a essentiellement été décrit pour réguler la formation des lamellipodes dans différents types cellulaires y compris dans la plaquette (Guillou et al., 2008; McCarty et al., 2005). Un rôle dans l'émission de filopode a également été rapporté dans *Dictyostelium discoideum* exprimant des mutants actifs ou inactifs (Dumontier et al., 2000). Pour déterminer son rôle dans l'émission de filopode GPIIb-V-IX dépendante, un inhibiteur sélectif de Rac1, le NSC23766, a été utilisé (Figure 55). De plus des expériences supplémentaires ont été réalisées sur des plaquettes de souris Rac1<sup>-/-</sup>.

### 1.2.1 Effet de NSC23766



**Figure 55 NSC23766 : inhibiteur pharmacologique de Rac1.**

Les plaquettes humaines non stimulées traitées par le NSC23766 restent discoïdes (Figure 56 A). Afin de vérifier si NSC23766 inhibe la formation de lamellipodes, des expériences d'adhésion sur fibrinogène ont été réalisées. Les plaquettes traitées par le NSC23766 forment peu de lamellipodes et ne s'étalent pas sur cette surface contrairement aux plaquettes non traitées (Figure 56 B). On peut noter que dans ces conditions, les plaquettes sont cependant capables d'émettre des filopodes.

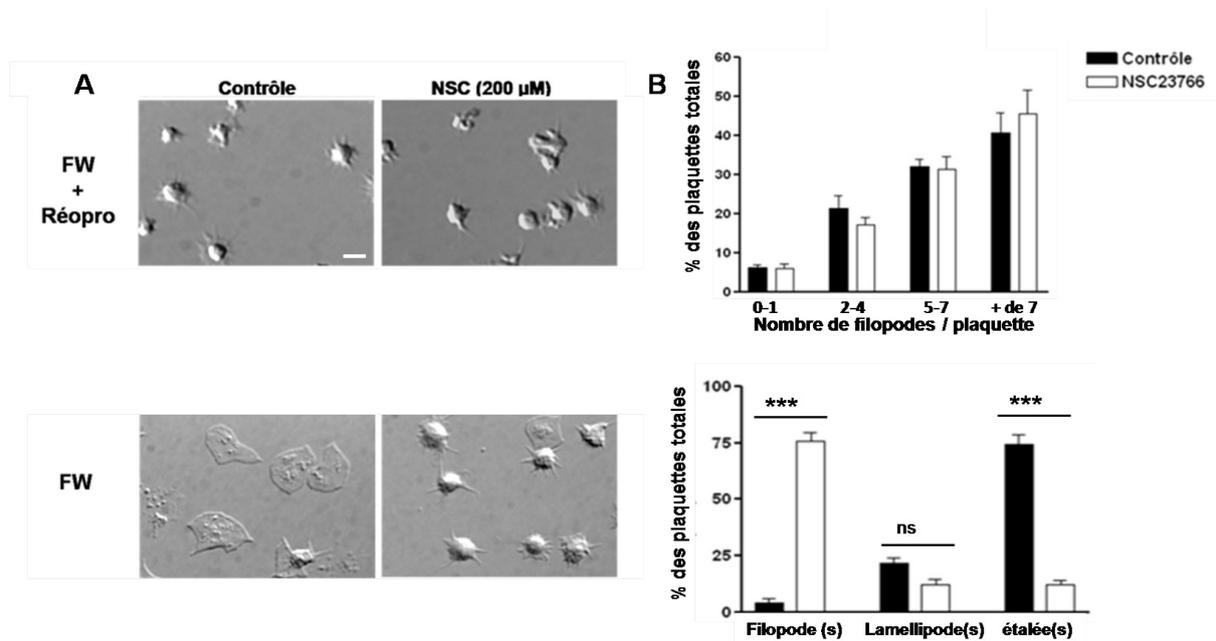


**Figure 56** Effet de l'inhibiteur de Rac1, NSC23766, sur les plaquettes non activées ou qui adhèrent sur fibrinogène. **A)** Les plaquettes humaines lavées ont été incubées avec du NSC23766 (200  $\mu$ M) pendant 10 min à 37°C puis fixées au PFA 4 %. **B)** Adhésion sur une surface recouverte de fibrinogène (100  $\mu$ g/ml) pendant 30 min à 37°C, puis lavage et fixation des plaquettes au PFA 4%. Les échantillons sont observés en microscopie DIC. (n=3, Barre = 1 $\mu$ m). Quantification du nombre de plaquettes avec filopode(s) ou étalées. Test statistique de Mann-Whitney qui montre que NSC23766 inhibe l'étalement de manière significative \*\*\*p<0,001.

### 1.2.2 Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante

Dans des conditions où l'étalement est inhibé par le Réopro, le traitement par NSC23766 (200  $\mu$ M) ne modifie pas la capacité des plaquettes à émettre des filopodes après adhésion sur FW (Figure 57 A). En absence de Réopro, alors que les plaquettes non traitées s'étaient, celles traitées par le

NSC23766 présentent essentiellement des filopodes (Figure 54 B). Ces résultats montrent que Rac1 n'est pas impliquée dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante et que son rôle semble limité à l'étape d'étalement que ce soit en réponse au fibrinogène ou au FW.

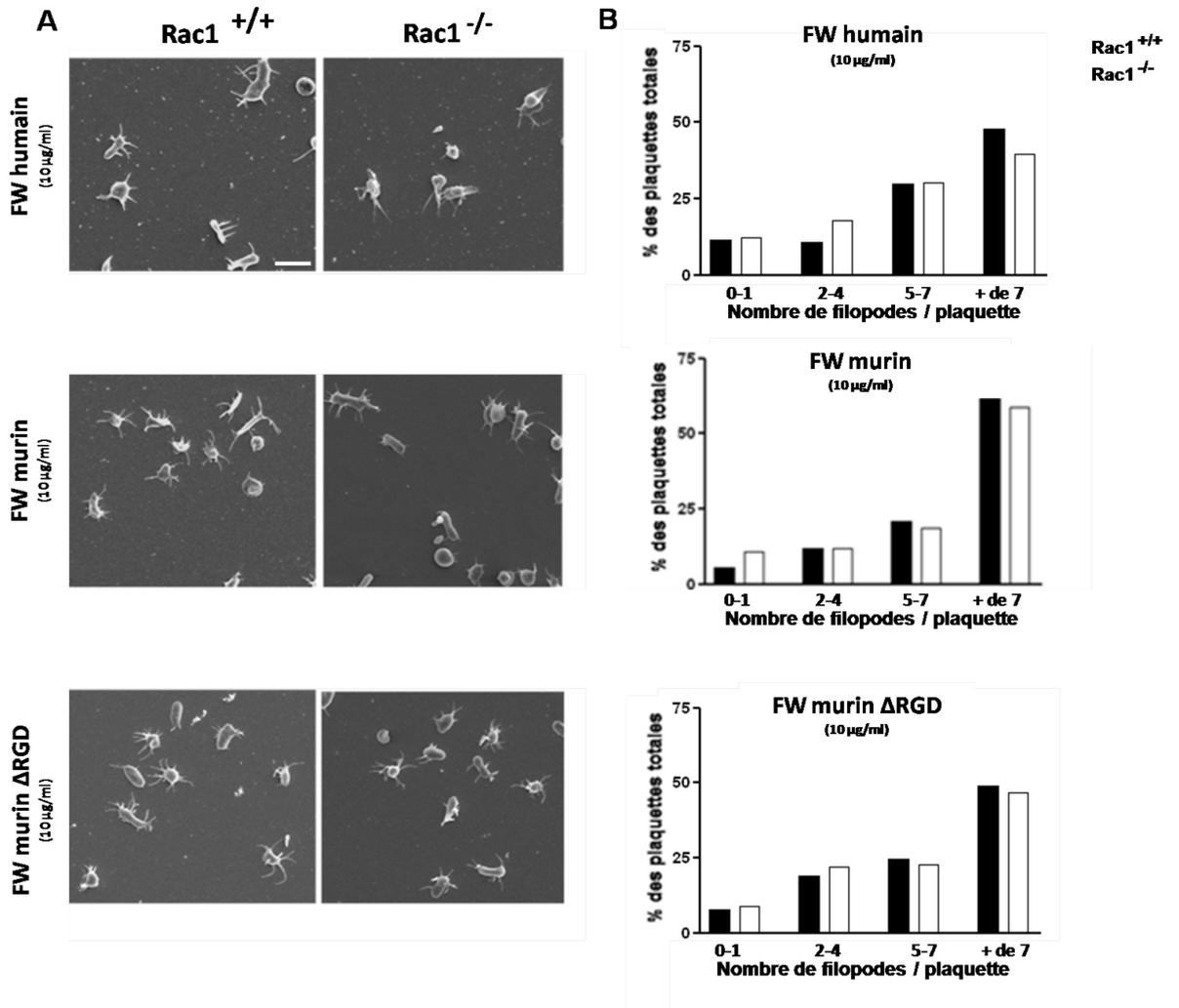


**Figure 57** Effet de l'inhibiteur de Rac1, NSC23766, sur l'émission de filopodes et l'étalement après adhésion sur FW. **A**) Des plaquettes humaines lavées (30 000 pl/µl), traitées avec du DMSO (contrôle, 0,5%) ou du NSC23766 (200 µM) pendant 10 min sont mises à adhérer pendant 20 min sur du FW humain (10 µg/ml) en présence de botrocétine (2 µg/ml) avec ou sans Réopro (40 µg/ml). Les plaquettes sont fixées avec du PFA 4 % et observées en microscopie DIC. (n=3. Barre = 3 µm). **B**) Quantification de l'émission de filopodes dans les conditions traitées par Réopro et répartition en 3 classes (filopodes, lamellipodes et étalées) en absence de traitement par Réopro. Test statistique non paramétrique de Mann-Whitney qui montre que le NSC23766 n'a pas d'effet sur la formation de filopodes mais inhibe de manière significative la formation de lamellipodes et l'étalement \*\*\*p<0,001.

Afin de confirmer ces résultats, les plaquettes de souris n'exprimant plus Rac1 dans la lignée mégacaryocytaire (Rac1<sup>-/-</sup>) ont été évaluées. Ces souris ont un nombre et une taille des plaquettes comparables aux souris Rac1<sup>+/+</sup>. Les fonctions plaquettaires de ces souris ont été étudiées précédemment par d'autres équipes révélant que Rac1 est essentiel i) pour la formation de lamellipodes, ii) pour l'activation de PLCγ2 dépendante des récepteurs ITAM (Pleines et al., 2009), et iii) pour la sécrétion des granules et l'hémostase (Akbar et al., 2007).

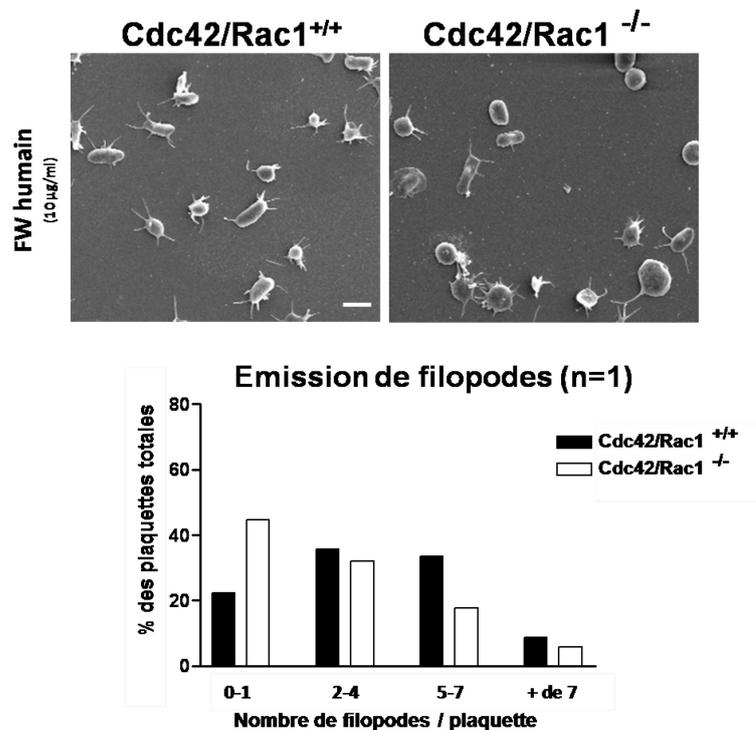
Les plaquettes de souris Rac1<sup>-/-</sup> se contractent et émettent normalement des filopodes après adhésion sur une surface de FW (Figure 58). L'absence de Rac1 ne modifie pas la capacité des

plaquettes à adhérer sur FW (Figure 58 C). Ces résultats ajoutés à ceux obtenus avec le NSC23766 montrent que Rac1 ne joue pas de rôle dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante.



**Figure 58** Effet de l'absence de Rac1 sur l'émission de filopodes après adhésion des plaquettes sur FW. **A)** Adhésion des plaquettes lavées de souris Rac1<sup>+/+</sup> (30 000 pl/μl) ou Rac1<sup>-/-</sup> sur une surface de FW humain, murin ou murin ΔRGD selon la technique détaillée dans la figure 36. Barre = 3 μm, n=1. **B)** Quantification de l'émission de filopodes **C)** et de l'adhésion.

L'utilisation de la lignée double KO Cdc42/Rac1a permis d'évaluer l'impact de l'extinction des deux GTPases. Tout comme dans le simple KO Cdc42, il y a deux fois plus de plaquettes double KO qui restent discoïdes après adhésion sur FW indiquant l'absence d'effet inhibiteur additionnel lié à Rac1 (Figure 59). Ces résultats confirment également le rôle de Cdc42 dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante.



**Figure 59** Effet de l'absence simultanée de Cdc42 et Rac1 sur l'émission de filopodes après adhésion des plaquettes sur FW. Adhésion des plaquettes lavées de souris Cdc42/Rac1<sup>+/+</sup> (30 000 pl/μl) et Cdc42/Rac1<sup>-/-</sup> sur une surface de FW humain (10 μg/ml) selon la technique détaillée dans la figure 33. Barre = 3 μm.

Les résultats dans les souris Rac1<sup>-/-</sup> et Cdc42/Rac1<sup>-/-</sup> montrent que Rac1 n'est pas impliqué dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante et que son rôle est limité à la formation des lamellipodes.

### 1.2.3 Conclusion

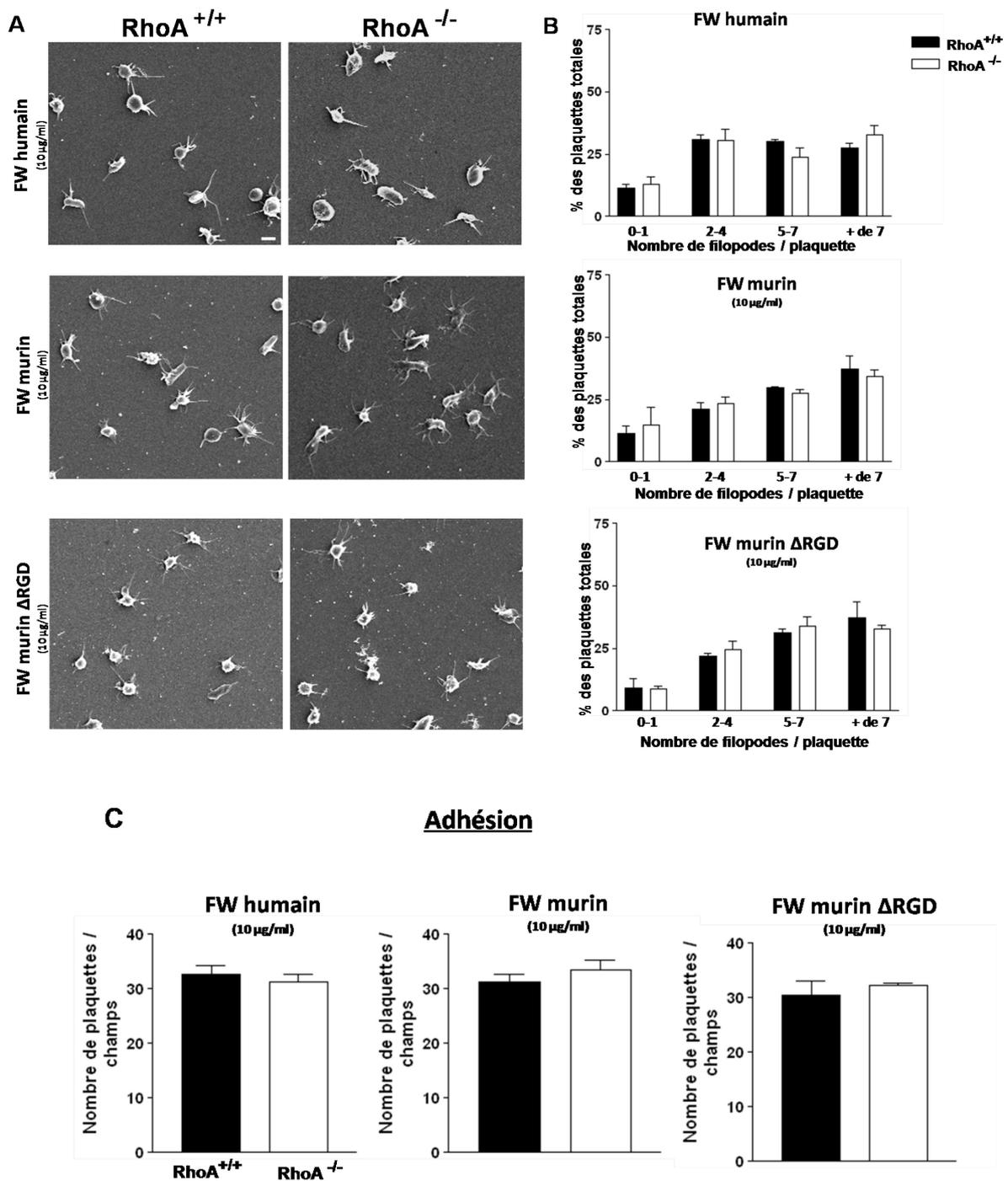
Le rôle de Rac1 dans la plaquette semble clairement établi et concerne spécifiquement la formation des lamellipodes et l'étalement. L'inhibiteur NSC23766 est un inhibiteur relativement spécifique qui a été décrit pour ne pas affecter l'activation d'autres GTPase telles que Cdc42 et RhoA (Gao et al., 2004). Les résultats obtenus avec cet inhibiteur et confirmés dans la souris KO montrent que Rac1 n'est pas impliqué dans l'émission de filopodes après adhésion sur FW et sur fibrinogène. L'utilisation de double KO Cdc42/Rac1 ne montre aucun effet additionnel de l'absence de Rac1 sur l'inhibition provoquée par l'absence de Cdc42. Etant donné l'inhibition incomplète de l'émission de filopodes dans les plaquettes dépourvues de Cdc42 et le rôle d'autres GTPases dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, il est envisageable que plusieurs GTPases autre que Rac1 participent à l'émission de filopodes parmi lesquelles Rif ou TC10. L'inactivation ou l'invalidation simultanée de plusieurs de ces GTPases pourrait permettre de vérifier cette hypothèse.

## 1.3 RhoA

RhoA est connue pour son implication dans la formation des fibres de stress dans divers types cellulaires dont la plaquette (Vexler et al., 1996). Un rôle dans l'émission de filopodes a été montré dans des cellules de rat contenant des mutants actifs ou inactifs de RhoA (Heckman et al., 2009). Son rôle dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante a été évalué en utilisant une lignée de souris RhoA<sup>-/-</sup>. Celles-ci présentent des plaquettes de taille normale et une numération similaire aux souris RhoA<sup>+/+</sup>. L'effet sur les fonctions plaquettaires de ces KO n'a pas encore été évalué.

### 1.3.1 Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante

Les plaquettes de souris RhoA<sup>-/-</sup> adhèrent normalement sur FW humain, murin ou murin  $\Delta$ RGD et se contractent et émettent des filopodes de façon comparable aux souris RhoA<sup>+/+</sup> (Figure 60). Ces résultats indiquent que cette GTPase n'a pas de rôle dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante.



**Figure 60** Effet de l'absence de RhoA sur l'émission de filopodes après adhésion des plaquettes sur FW. **A**) Adhésion des plaquettes lavées de souris RhoA<sup>+/+</sup> (30 000 pl/µl) ou RhoA<sup>-/-</sup> sur une surface recouverte de FW humain, murin ou murin ΔRGD selon la technique détaillée dans la figure 36, (n=2, Barre = 2 µm). **B**) Quantification de l'émission de filopodes **C**) et de l'adhésion. Test statistique de Mann-Whitney qui ne montre pas de différence significative.

### 1.3.2 Conclusion

Les expériences réalisées dans les souris RhoA<sup>-/-</sup> montrent que RhoA ne semble pas être impliquée dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante. Le rôle de RhoA dans l'émission de filopodes (Heckman et al., 2009) a été étudié dans un système complexe où plusieurs GTPases sont impliquées notamment Cdc42 qui est déjà bien connue pour son rôle dans ce mécanisme. RhoA ne semble pas être impliquée réellement dans l'émission de filopodes mais plus, d'après la littérature, dans la formation des points focaux d'adhésion et les fibres de stress. Nous n'avons pas pu vérifier par manque d'animaux l'effet de la formation des fibres de stress par exemple lors de l'étalement sur fibrinogène en présence d'agonistes.

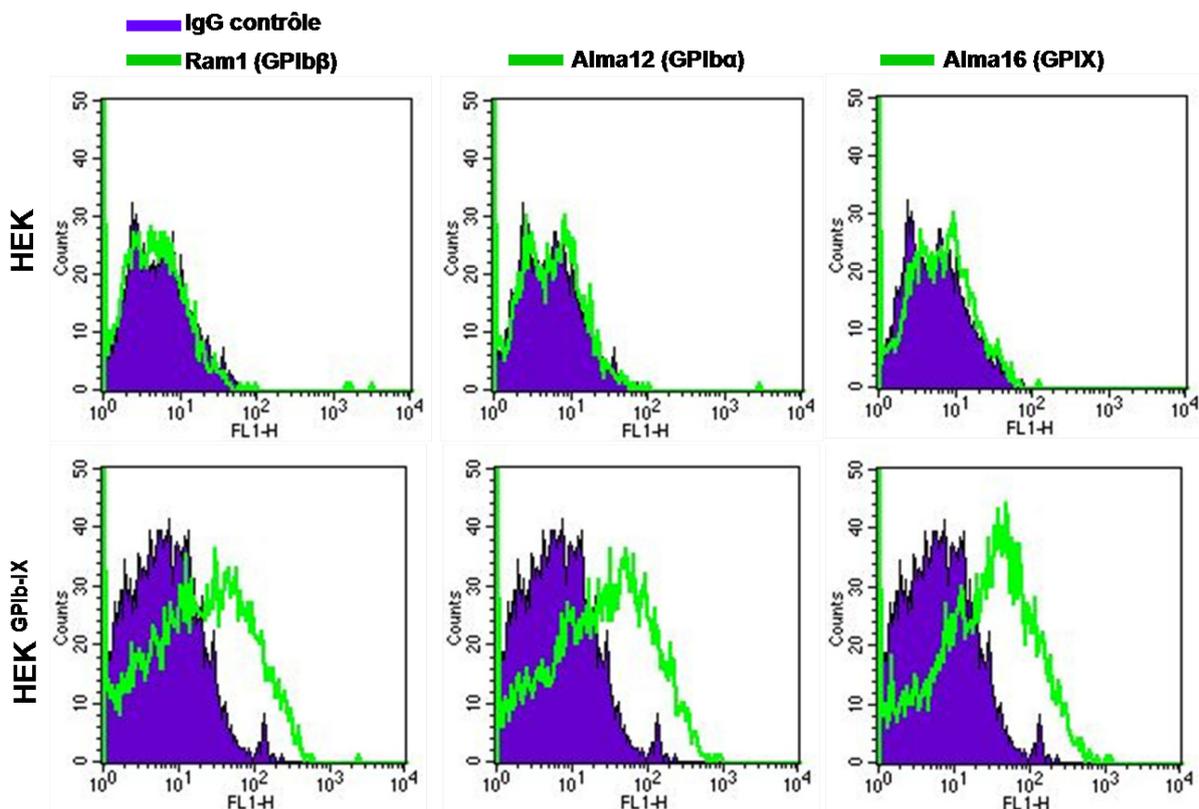
## 2) Ras GTPase : RalA

RalA fait partie de la sous-famille des Ras-GTPases et tout comme les Rho-GTPases, son activité est régulée par un cycle GTPasique. Un rôle de RalA a été décrit principalement dans des mécanismes d'endocytose et d'exocytose (Vitale et al., 2005). Récemment, son rôle dans l'émission de filopodes a été mis en évidence dans des fibroblastes transfectés par des mutants actifs ou inactifs de RalA (Ohta et al., 1999; Sugihara et al., 2002). Il n'existe pas d'inhibiteur pharmacologique sélectif, ni de souris transgénique pour l'étude de son rôle dans la plaquette. Pour évaluer sa fonction dans l'émission de filopodes GPIb-dépendante, la stratégie a été d'inhiber son expression par l'utilisation de shRNA. La plaquette ne se prêtant pas à cette approche, nous avons utilisé des cellules transfectées par le complexe GPIb-IX. Des cellules CHO transfectées par le complexe GPIb- IX ont montré précédemment une capacité à adhérer et à émettre des filopodes sur une surface recouverte de FW (David et al., 2006; Strassel et al., 2006). L'utilisation de shRNA d'origine humaine a nécessité, le développement d'une lignée humaine HEK (Human Embryonic Kidney) transfectée par GPIb-IX (HEK<sup>GPIb-IX</sup>).

### 2.1 Développement d'une lignée HEK exprimant le complexe GPIb-IX

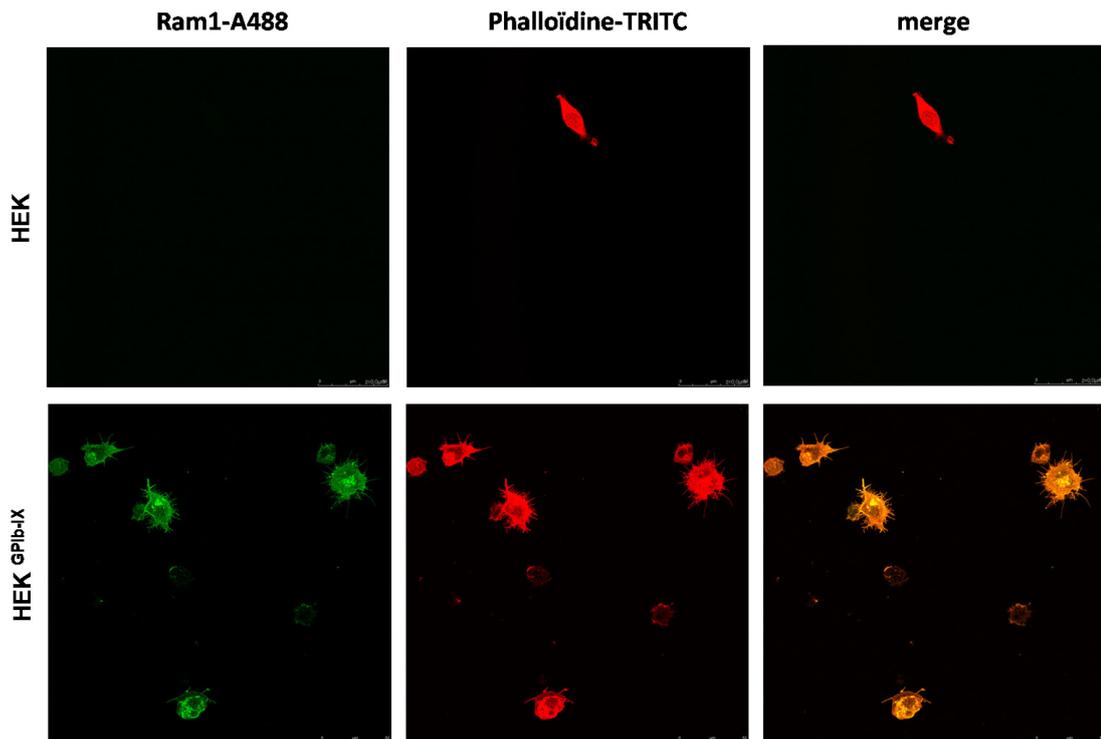
Une transfection transitoire des 3 sous-unités GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  et GPIX, a été réalisée pour établir les conditions d'une expression efficace du complexe GPIb-IX (résultats non décrits). Une transfection stable a ensuite été réalisée et des clones sélectionnés grâce à leur résistance à plusieurs antibiotiques (G418, Zéocine et Hygromycine). L'expression du complexe à la surface membranaire a été contrôlée par cytométrie de flux. La transfection de GPV n'est pas nécessaire pour l'expression efficace et la liaison au FW.

Le co-marquage des cellules par les anticorps RAM.1 (anti-GPIb $\beta$ ), ALMA.12 (anti-GPIb $\alpha$ ) et ALMA.16 (anti-GPIX) couplés au fluorophore Cy2 montre que les cellules HEK<sup>GPIb-IX</sup> expriment bien le complexe GPIb-IX (Figure 61).

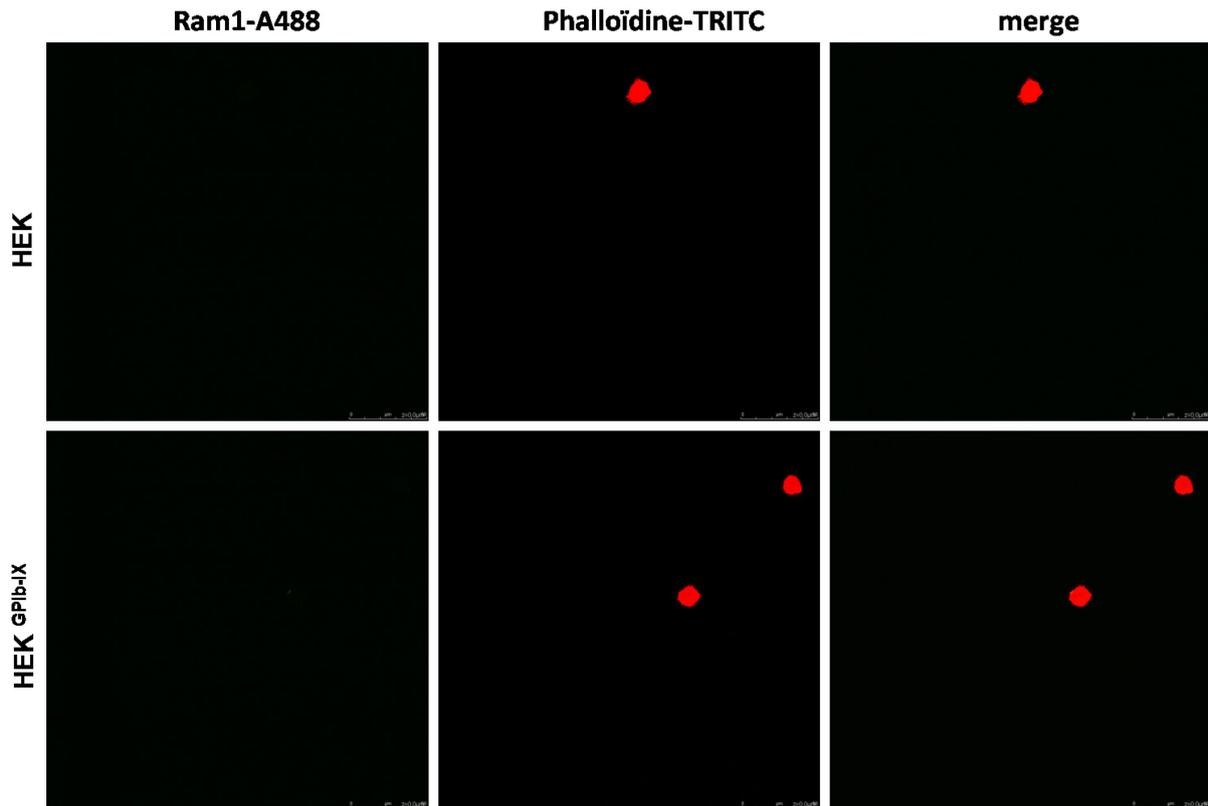


**Figure 61** Mesure de l'expression de GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  et GPIX dans les cellules HEK<sup>GPIb-IX</sup> par cytométrie de flux. Les cellules HEK ou HEK<sup>GPIb-IX</sup> ( $10^6$  cellules/ml) ont été fixées au PFA 4 %, lavées avec du PBS puis incubées avec l'anticorps IgG contrôle MOPC.31 (20  $\mu$ g/ml), l'anticorps anti-GPIb $\beta$  RAM.1 (20  $\mu$ g/ml), anti-GPIb $\alpha$  ALMA.12 (20  $\mu$ g/ml) ou anti-GPIX ALMA.16 (20  $\mu$ g/ml) pendant 20 min à 4°C. Après lavage l'anticorps secondaire couplé à Cy2 (15  $\mu$ g/ml) a été rajouté pendant 20 min à 4°C. Le pic de fluorescence violet représente le pic contrôle obtenu avec l'anticorps MOPC31.

Alors que les cellules HEK natives sont incapables d'adhérer sur FW, même en présence de botrocétine, les cellules transfectées par le complexe GPIb-IX (visualisées par marquage RAM.1-Alexa488) adhèrent et émettent des filopodes (Figure 62). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans la lignée CHO<sup>GPIb-IX</sup>, confirmant que l'addition du complexe confère aux cellules, à l'image des plaquettes, la capacité d'adhérer et de s'activer en réponse au FW.

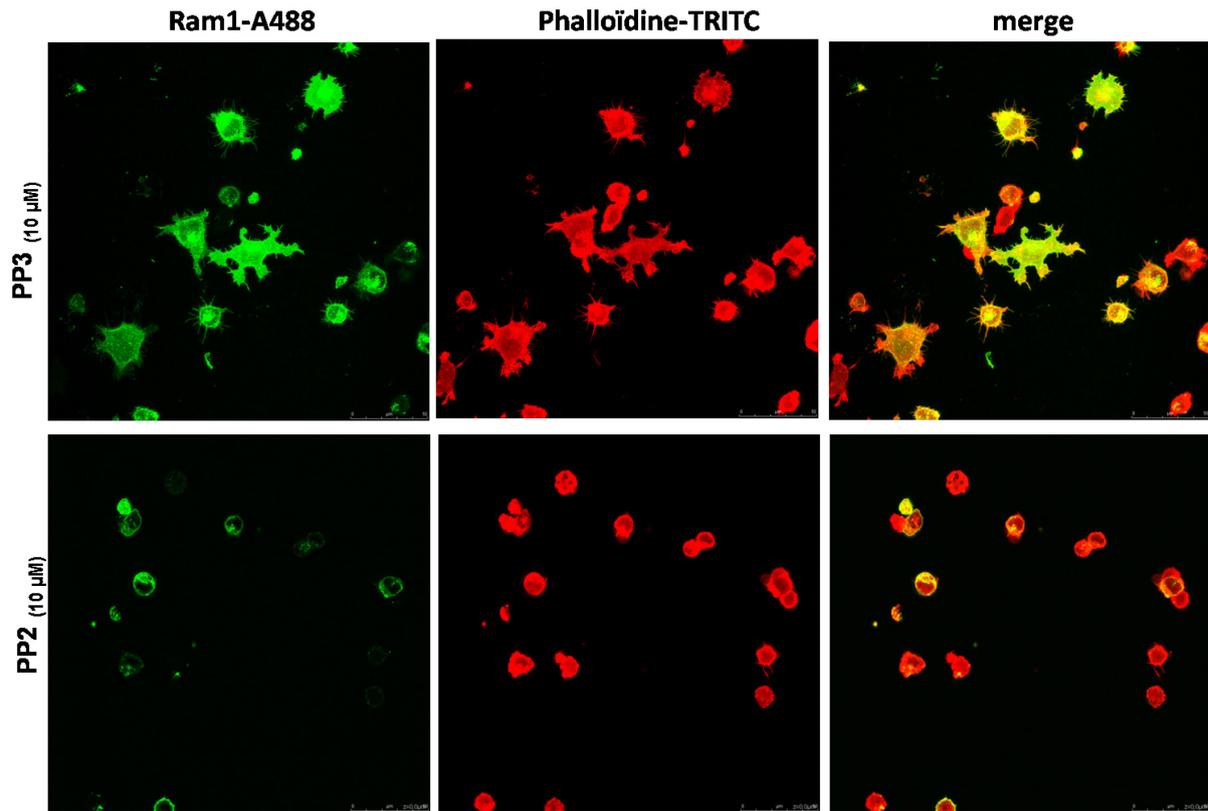


**Figure 62** Adhésion des cellules HEK<sup>GPIb-IX</sup> sur FW. Adhésion des cellules HEK natives ou transfectées par le complexe GPIb-IX (HEK<sup>GPIb-IX</sup>) sur une surface de FW humain. 300  $\mu$ l de cellules ( $10^6$  de cellules/ml) sont incubées avec de la botrocétine (2  $\mu$ g/ml) et du Réopro (40  $\mu$ g/ml) pendant 10 min puis mises à adhérer sur du FW (10  $\mu$ g/ml). Après 30 min d'adhésion à 37°C et lavages au PBS, les cellules sont fixées au PFA 4% et marquées avec 10  $\mu$ g/ml de RAM.1-Alexa488 et 2  $\mu$ g/ml de phalloïdine-TRITC. Observation des échantillons par microscopie confocale.



**Figure 63** Adhésion des cellules HEK <sup>GPIb-IX</sup> en présence d'un anticorps bloquant l'interaction FW / GPIb-V-IX. Adhésion sur FW des cellules HEK non transfectées ou transfectées par le complexe GPIb-IX (HEK <sup>GPIb-IX</sup>) selon les techniques détaillées dans la figure 62 avec au préalable incubation des cellules avec 10 µg/ml d'ALMA.12 pendant 10 min.

La spécificité GPIb de ces réponses est montrée par l'inhibition de l'adhésion par l'anticorps ALMA.12 bloquant la liaison au domaine A1 du FW (Figure 63), les rares cellules adhérentes n'étant pas capables d'émettre des filopodes.



**Figure 64** Adhésion des cellules HEK <sup>GPIb-IX</sup> en présence de l'inhibiteur des src kinases PP2. Adhésion sur FW des cellules HEK transfectées par le complexe GPIb-IX (HEK <sup>GPIb-IX</sup>) selon les techniques détaillées dans la figure 62 et en présence de l'inhibiteur des src kinase PP2, ou le contrôle non inhibiteur PP3.

L'inhibition de l'émission de filopodes par l'inhibiteur des src kinases, PP2, suggère que la voie de signalisation est similaire à celle observée dans les plaquettes (Figure 64).

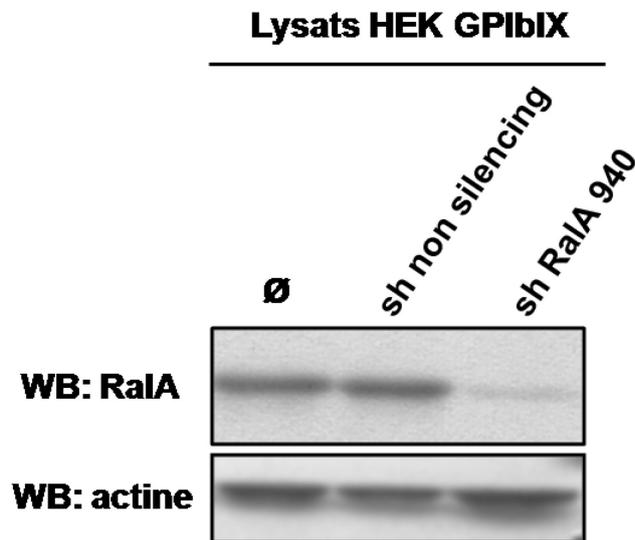
Ces résultats montrent que les cellules HEK <sup>GPIb-IX</sup> sont un bon modèle pour étudier l'implication de RalA dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante.

## 2.2 Etude de l'émission de filopodes en présence de shRNA de RalA

### 2.2.1 Obtention d'une lignée HEKGPIb-IX/RalA-

Pour étudier le rôle de RalA, les cellules HEK <sup>GPIb-IX</sup> ont été transfectées de manière stable par des shRNA spécifiques de cette GTPase (HEK <sup>GPIb-IX</sup>/RalA<sup>-</sup>). Les shRNA ont été choisis par analyse informatique (OpenBiosystems) mais n'ayant pas été testés préalablement sur leur capacité à éteindre

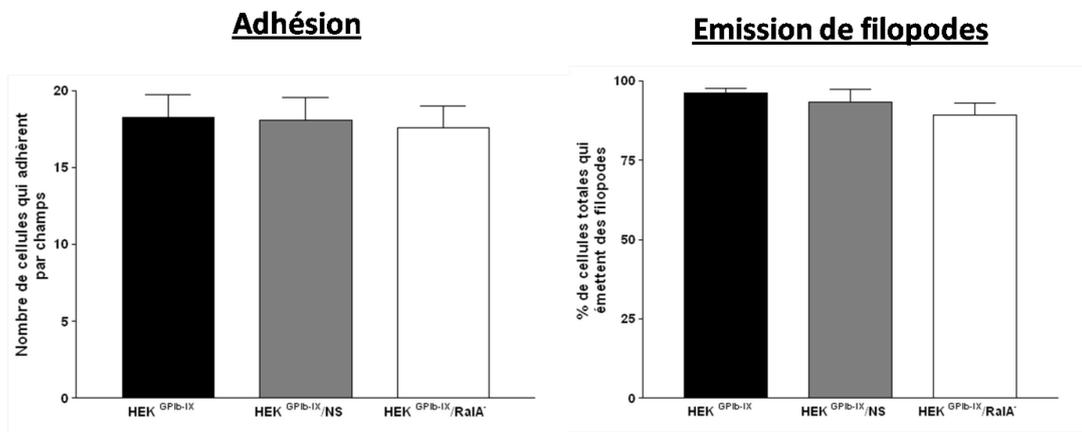
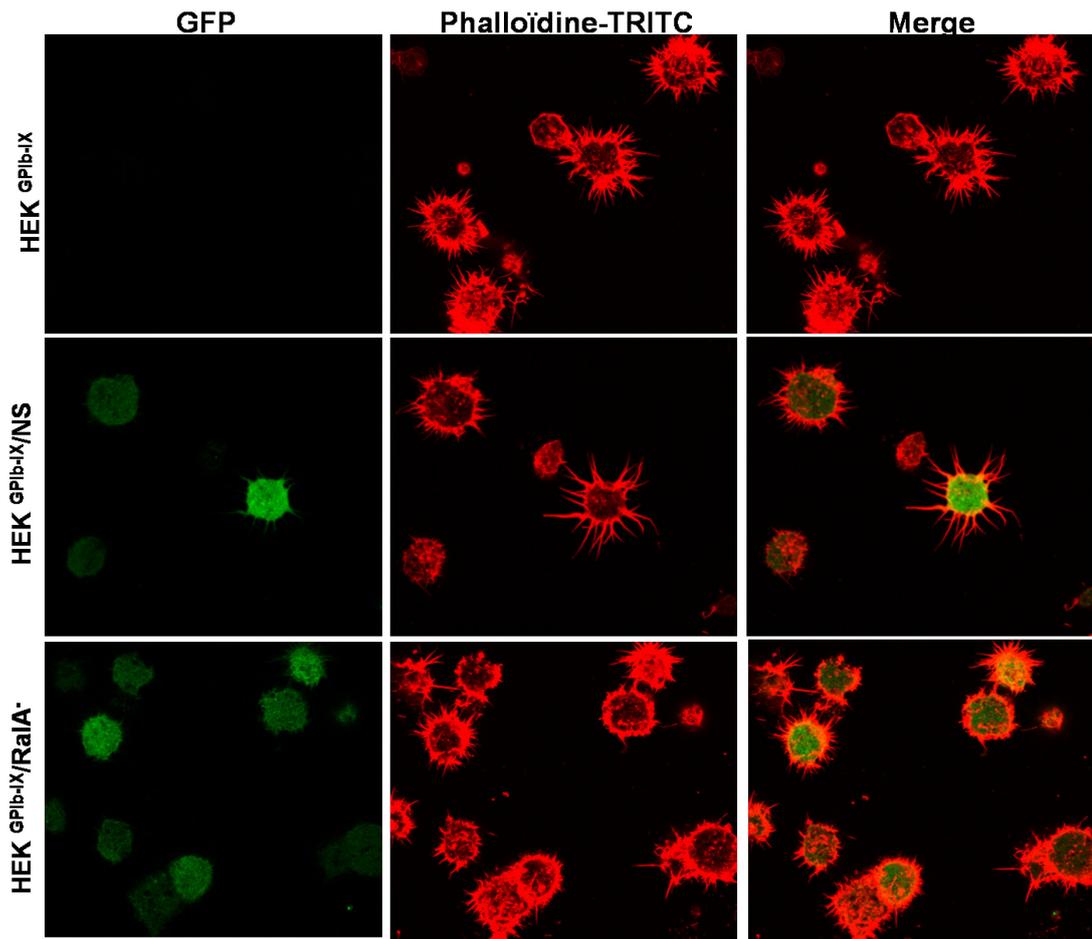
l'expression de la protéine. Trois shRNA différents ont été testés en parallèle. Une lignée stable a été sélectionnée correspondant au shRNA 940 sur la diminution importante de l'expression de la protéine évaluée par WB par comparaison à la lignée non transfectées ou contenant un shRNA Non Silencing.



**Figure 65** Inhibition de l'expression de RalA dans les cellules HEK<sup>GPIb-IX</sup> transfectées par un shRNA RalA. Les lysats de cellules HEK<sup>GPIb-IX</sup>, HEK<sup>GPIb-IX/NS</sup> et HEK<sup>GPIb-IX/RalA</sup> réalisés avec 1% Triton X-100 ont été déposés sur un gel d'acrylamide 12%. RalA et l'actine ont été révélés par immuno-empreinte avec respectivement un anticorps anti-RalA et anti-actine (AC40). Résultat représentatif de 2 expériences.

### 2.2.2 Effet de l'absence de RalA sur l'émission de filopodes

Le vecteur codant le shRNA code également pour la GFP permettant la détection des cellules transfectées par microscopie à fluorescence. Les cellules positives pour GFP contenant le shRNA RalA montrent une capacité d'adhésion au FW équivalente à la lignée contrôle ou transfectées par le shRNA Non Silencing. De plus, les cellules transfectées sont capables d'émettre des filopodes indiquant que RalA ne serait pas impliqué dans l'émission de filopode GPIb-V-IX dépendante (Figure 66).



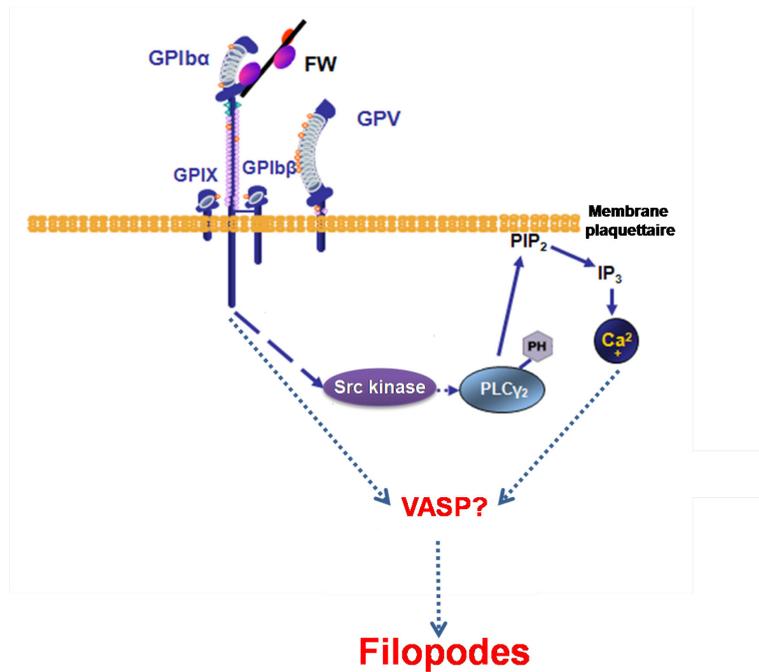
**Figure 66** Effet de l'absence de RalA sur l'adhésion et l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendantes. Adhésion des cellules HEK<sup>GPIb-IX</sup>, HEK<sup>GPIb-IX/NS</sup> et HEK<sup>GPIb-IX/RalA</sup> sur une surface de FW selon les techniques détaillées dans la figure 62. (n=3). Test statistique de Mann-Whitney qui ne montre pas de différence significative dans la capacité des cellules à adhérer et à former des filopodes.

## 2.3 Conclusion

Les outils qui auraient permis d'étudier le rôle fonctionnel de RalA tels que les shRNA, les vecteurs exprimants des mutants actifs ou inactifs de RalA, ne sont pas adaptés à l'étude plaquettaire. En effet, la plaquette ne possède pas de noyau et une capacité limitée de transcription et de biosynthèse. Il a donc été décidé d'utiliser une lignée cellulaire transfectée par le complexe GPIb-IX capable de reproduire la signalisation induite par l'interaction avec le FW. L'obtention de cellules HEK<sup>GPIb-IX</sup> d'origines humaines et l'utilisation de shRNA spécifiques montre que l'extinction de RalA n'affecte pas l'émission de filopodes GPIb dépendante. Afin de compléter la validation de ce modèle cellulaire, il serait intéressant d'y transfecter des shRNA spécifiques de Cdc42 qui au vu des résultats obtenus précédemment avec le KO Cdc42 devraient inhiber l'émission de filopodes. De plus, il serait intéressant, dans ces mêmes cellules, de regarder l'effet additionnel de l'extinction de RalA et de Cdc42. En effet, il a été proposé un lien entre RalA, Cdc42 et la Filamine A dans la régulation de l'émission de filopodes (Ohta et al., 1999). Une autre façon d'évaluer RalA serait l'utilisation de vecteurs mutants actifs ou inactifs qui permettraient d'évaluer à la fois l'impact de l'activation et de l'inactivation de cette GTPase sur l'émission de filopode et non seulement l'effet de l'absence de la protéine (Fu et al., 2007). Ces cellules pourraient également permettre d'évaluer l'effet des toxines qui permettent d'inhiber l'activation des GTPases telle que la toxine C. botulinum exoenzyme C3 qui inhibe l'activation de RalA (Pautsch et al., 2005). Il serait à terme nécessaire d'étendre les résultats à la lignée plaquettaire.

### **D) Famille Ena/VASP : Rôle de VASP**

VASP fait partie de la famille Ena/VASP et son rôle dans l'émission de filopodes a été décrit dans plusieurs systèmes cellulaires après transfection de formes fonctionnellement actives ou inactives. Afin d'étudier son rôle dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante et de façon plus large dans la plaquette, des souris déficientes pour VASP (VASP<sup>-/-</sup>) ont été utilisées (Figure 67).



**Figure 67** Rôle potentiel de VASP dans la signalisation GPIIb-V-IX

Les souris VASP<sup>-/-</sup> ont un nombre et une taille de plaquettes identiques aux plaquettes de souris contrôles C57Bl6. Leurs plaquettes ont été étudiées précédemment et les résultats indiquent un rôle répressur de VASP dans l'activation de l'intégrineαIIbβ3 en réponse aux agonistes et dans l'adhésion des plaquettes *in vivo* après lésion vasculaire (Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999; Massberg et al., 2004).

### 1) Etude de l'émission de filopodes plaquettaires

L'étude de VASP dans l'émission de filopodes dépendante du complexe GPIIb-V-IX, après adhésion sur fibrinogène et après stimulation en suspension par des agonistes solubles, est détaillée dans la publication « Normal filopodia extension in VASP-deficient platelets upon activation by adhesive matrices or soluble agonists » (Annexe 2).

#### 1.1 Annexe 2: Normal filopodia extension in VASP-deficient platelets upon activation by adhesive matrices or soluble agonists

Signalement bibliographique ajouté par :

**L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de la Documentation**

**Normal filopodia extension in VASP-deficient platelets upon activation by adhesive matrices or soluble agonists**

Sandra ELIAUTOU, Pierre Henri MANGIN, Ulrich WALTER, Christian GACHET, François LANZA

***Thrombosis and Haemostasis, 2009, Volume 102***

*Copyright © 2009 Schattauer GmbH, Stuttgart*

**Annexe 2 : p. 191-193**

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1160/TH-09-06-0379>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>



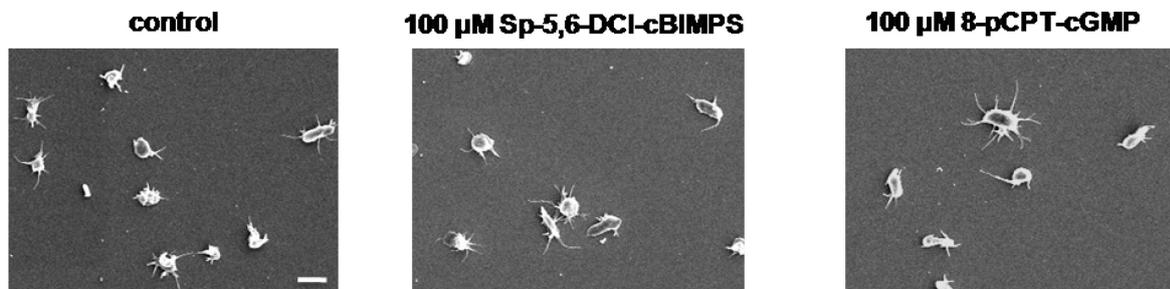
## Supplementary Figure 1:

### Platelet adhesion under condition of cyclic-nucleotide repression.

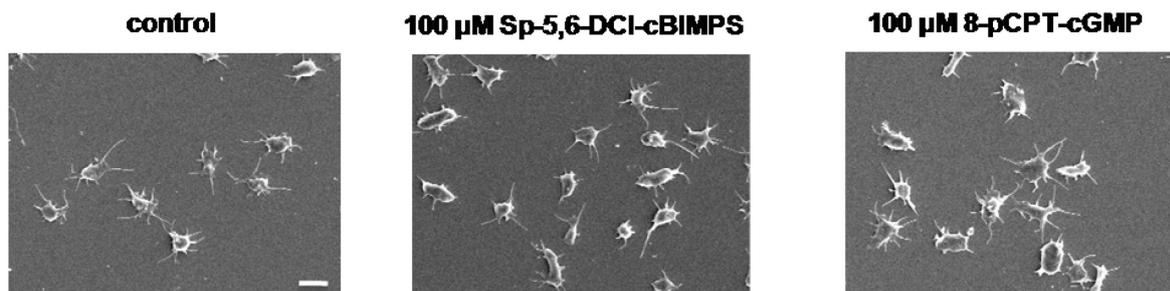
Blood from wild-type mice was drawn from the abdominal aorta into acid citrate dextrose (ACD) anticoagulant and a washed platelet suspension (300 000 platelet/ $\mu$ l) was prepared in Tyrode's albumin buffer as described previously (Mangin et al., 2003). (A) Platelets were pre-incubated with Sp5,6-DCI-cBIMPS or 8-pCPT-cGMP (analogue of cAMP and cGMP, respectively) for 20 min at 37°C and (A) were treated with 40  $\mu$ g/ml Integrilin , 1  $\mu$ g/ml botrocetin and allowed to adhere for 20 min to cover slips coated with 10  $\mu$ g/ml of mouse von Willebrand factor (VWF), (B) were left untreated and allowed to adhere for 60 min on cover slips coated with 100  $\mu$ g/ml of human fibrinogen (FBG). Samples were fixed with 2,5 % glutaraldehyde, processed for Scanning Electron Microscopy. Bar represents 2,5  $\mu$ m.

### Supplementary figure 1

#### (A) VWF



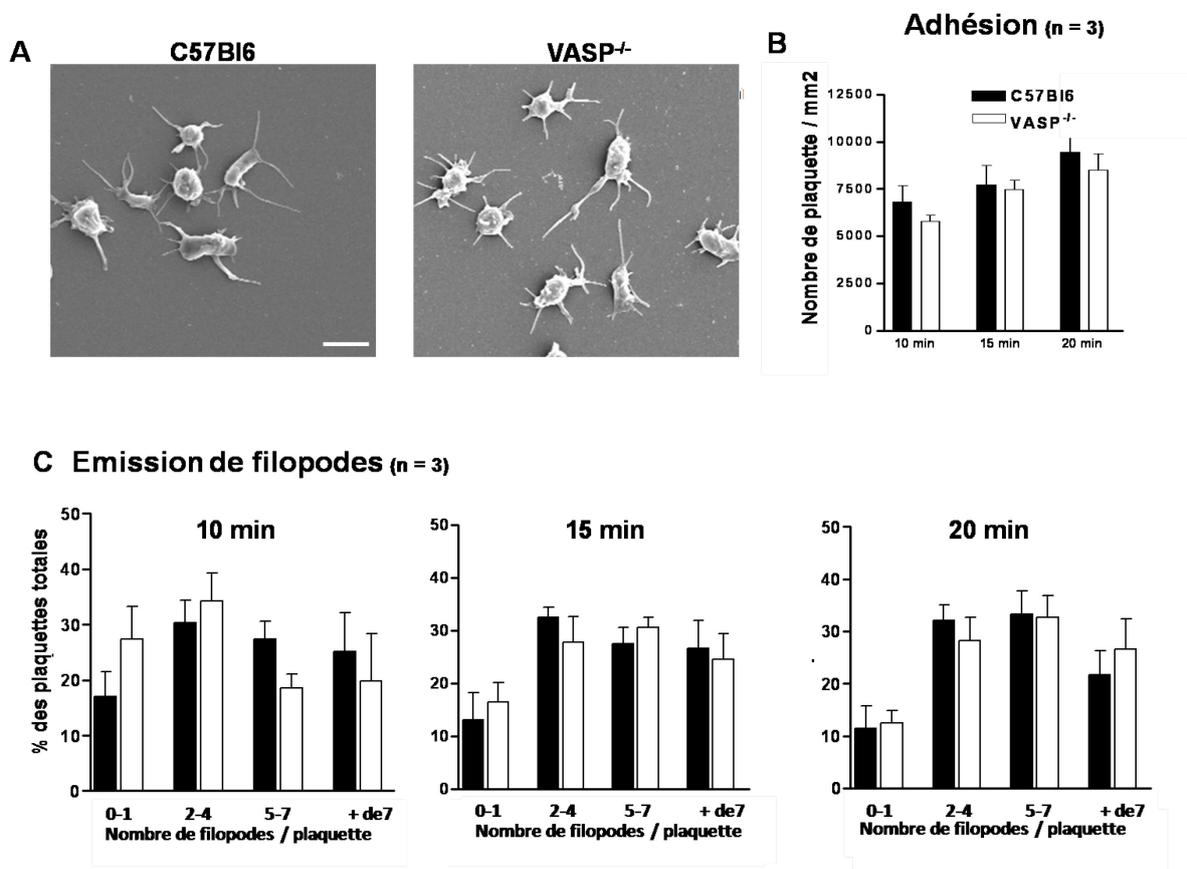
#### (B) FBG



## 1.2 Résultats supplémentaires

Des expériences ne figurant pas dans la publication ont évalué l'adhésion à différents temps sur FW pour révéler des différences possibles à des temps précoces, et sur fibrinogène après stimulation par l'ADP ou la thrombine pour évaluer un effet sur l'étalement des plaquettes.

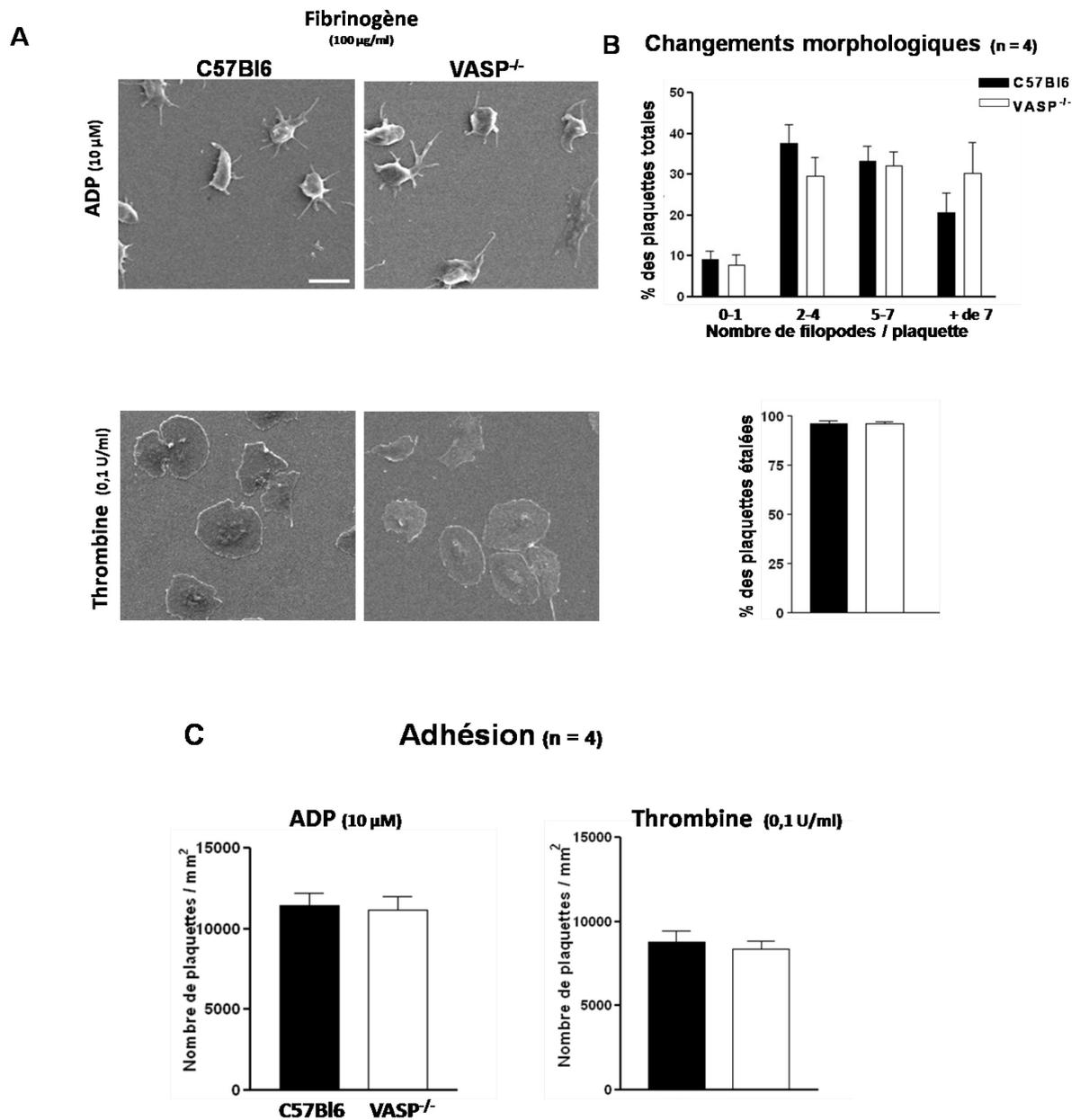
L'étude sur FW murin pour des temps allant de 10 à 20 min ne montre pas de différence dans l'émission de filopodes entre les plaquettes C57Bl6 et VASP<sup>-/-</sup> (Figure 68), éliminant un rôle de VASP dans les temps précoces d'activation.



**Figure 68** Effet de l'absence de VASP sur l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante à différents temps d'adhésion sur FW. A) Adhésion des plaquettes de souris C57Bl6 ou VASP<sup>-/-</sup> (30 000 pl/μl) sur une surface de FW murin (10 μg/ml) selon la technique détaillée de la figure 36 pour des temps d'adhésion de 10, 15 et 20 minutes. (n=3. Barre = 3 μm). B) Quantification de l'adhésion et C) de l'émission de filopodes. Test statistique de Mann-Whitney qui ne montre pas de différence significative.

Lors de l'adhésion sur fibrinogène après stimulation par l'ADP ou la thrombine les plaquettes de souris VASP<sup>-/-</sup> forment des lamellipodes et s'étaient normalement montrant que sur cette surface

VASP n'est impliqué ni dans l'émission de filopodes (résultats Annexe 2) ni dans l'étalement des plaquettes.

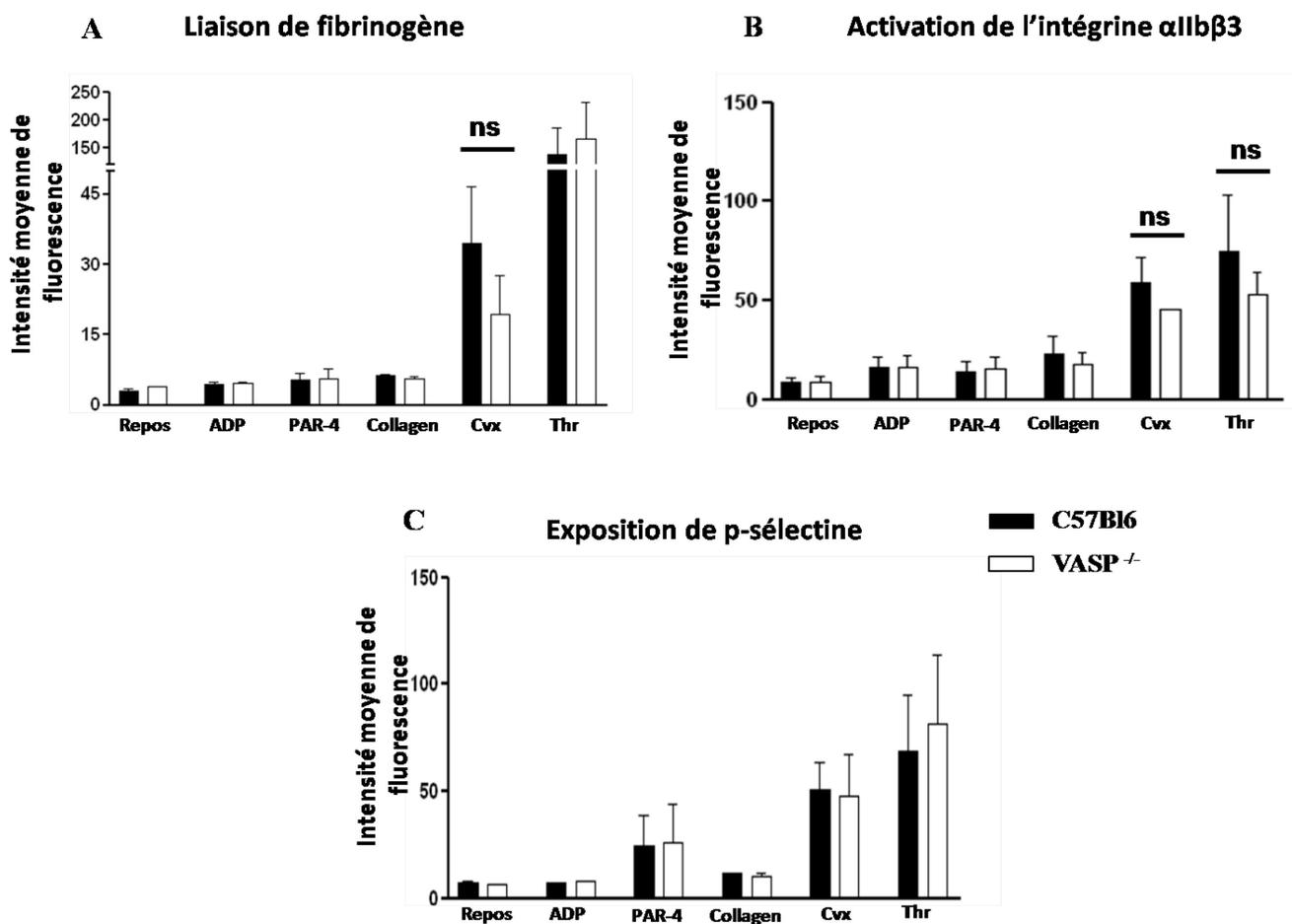


**Figure 69** Effet de l'absence de VASP sur l'émission de filopodes et sur l'étalement des plaquettes sur fibrinogène après stimulation par l'ADP ou la thrombine. A) Adhésion des plaquettes de souris C57Bl6 ou VASP<sup>-/-</sup> (30 000 pl/µl) sur une surface de fibrinogène (100 µg/ml) après stimulation des plaquettes par l'ADP (10 µM) ou la thrombine (0,1 U/ml) selon la technique détaillée dans la figure 37. (n=4. Barre= 3 µm). B) Quantification des changements morphologiques et C) de l'adhésion. Test statistique de Mann-Whitney qui ne montre pas de différence significative.

Ces résultats et ceux publiés montrent que VASP n'est pas impliqué dans l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante et ne joue pas non plus de rôle dans les changements morphologiques en réponse à d'autres conditions d'adhésion ou de stimulation.

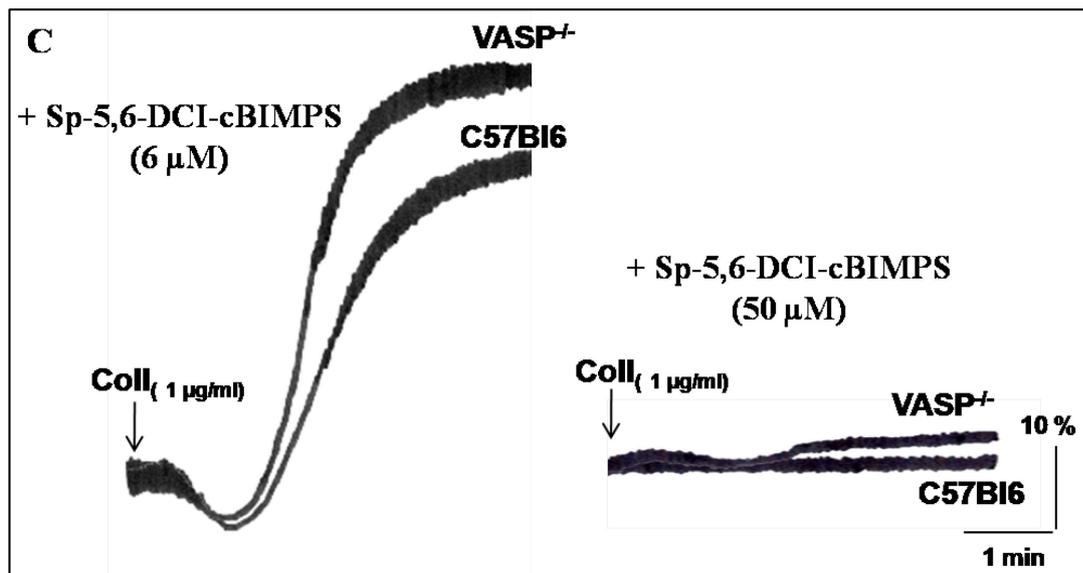
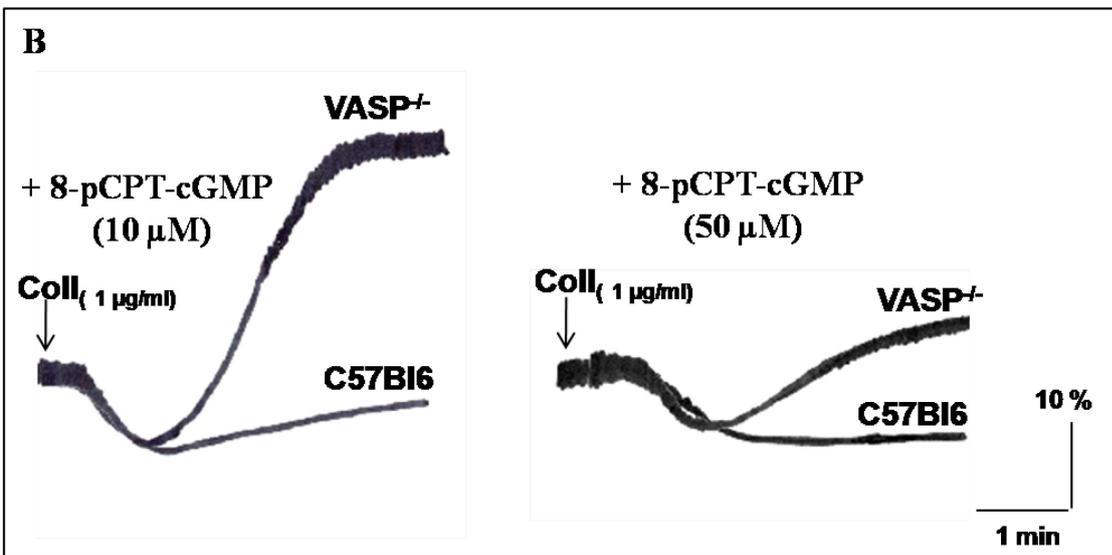
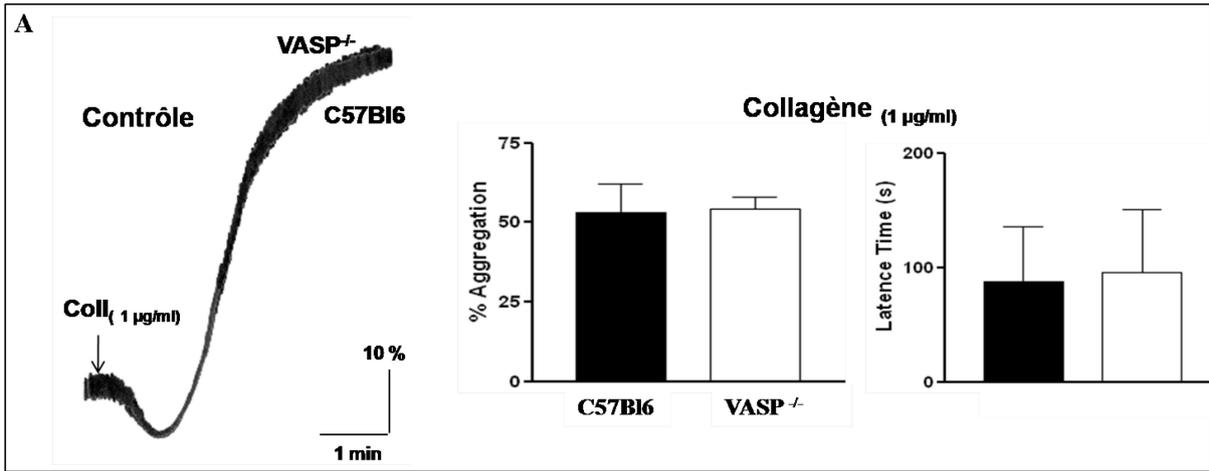
## **2) Rôle dans l'activation plaquettaire**

VASP a été décrit, sur la base d'études des souris KO, pour inhiber l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Dans nos expériences, l'absence de VASP ne modifie pas la capacité des plaquettes à s'étaler sur fibrinogène en présence de thrombine suggérant que VASP n'influencerait pas l'activation de l'intégrine. Des expériences de liaison de fibrinogène et d'exposition de P-sélectine en réponse à différents agonistes ont été réalisées afin de vérifier l'effet de VASP sur l'activation plaquettaire (Figure 70). Les plaquettes de souris VASP<sup>-/-</sup> sont capables de lier le fibrinogène et d'exposer la P-sélectine de la même façon que les plaquettes C57Bl6 en réponse à l'ADP, au peptide activateur PAR4, au collagène, à la convulxine (ligand de GPVI) et à la thrombine. L'expérience réalisée avec l'anticorps JONA-PE (Figure 70 B)) qui mesure directement l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, confirme les données de liaison de fibrinogène.



**Figure 70** Effet de l'absence de VASP sur la liaison de fibrinogène, l'activation de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  et l'exposition de P-sélectine. La liaison de fibrinogène-FITC (20  $\mu\text{g/ml}$ ) (A), de l'anticorps JONA-PE (20  $\mu\text{g/ml}$ ) (B) qui reconnaît l'intégrine sous sa forme activée, et de l'anticorps contre la P-sélectine couplé-FITC (20  $\mu\text{g/ml}$ ) (C), ont été mesurés par cytométrie de flux, sur des plaquettes de souris C57Bl6 ou VASP<sup>-/-</sup> (50 000 pl/ $\mu\text{l}$ ) activées ou non par l'ADP (5  $\mu\text{M}$ ), le peptide PAR-4 (750  $\mu\text{M}$ ), le collagène (100  $\mu\text{g/ml}$ ), la convulxine (15 nM) ou la thrombine (1 U/ml). (n=3). Test statistique t de student qui ne montre pas de différence significative entre les deux génotypes.

Ces résultats diffèrent de ceux de la littérature qui montraient une augmentation de l'activation de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$ . Dans ces études l'augmentation des réponses dans les souris VASP<sup>-/-</sup> par comparaison aux souris VASP<sup>+/+</sup> était plus nette quand les plaquettes étaient préalablement inhibées par des agents augmentant le GMPC ou l'AMPC (le 8-pCPT-cGMP ou le Sp-5,6-DCI-cBIMPS). Les souris VASP<sup>-/-</sup> ont donc été réévaluées dans des expériences d'agrégation en présence de ces composés (Figure 71 B) et C)



**Figure 71 Effet de l'absence de VASP sur l'agrégation des plaquettes en réponse au collagène en présence d'agents qui augmentent le taux d'AMPc ou de GMPc.** A) Agrégation des plaquettes de souris C57Bl6 ou VASP<sup>-/-</sup> (300 000 pl/μl) en réponse au collagène (1 μg/ml) à 37°C, sans ou B) avec incubation des plaquettes pendant 30 min à 37°C avec 10 ou 50 μM de 8-pCPT-cGMP ou C) avec 6 ou 50 μM de Sp-5,6-DCI-cBIMPS. Le pourcentage d'agrégation est réalisé en prenant le maximum d'agrégation à 3 min. Le temps de latence correspond au temps entre l'ajout de l'agoniste et le début de l'agrégation. (n=2). Test statistique t de student qui ne révèle pas de différence entre les deux génotypes.

En absence de ces composés, les plaquettes de souris VASP<sup>-/-</sup> agrègent de la même façon que les plaquettes de souris C57Bl6 en réponse au collagène ou à l'ADP (figure 71 A et résultats non montrés). Par contre, après ajout de 8-pCPT-cGMP, à des concentrations inhibant fortement l'agrégation des plaquettes de souris C57Bl6, on observe une nette agrégation des plaquettes de souris VASP<sup>-/-</sup>, une réponse qui persiste pour une concentration de 8-pCPT-cGMP plus élevée (Figure 71 B). L'ajout de Sp-5,6-DCI-cBIMPS (6 μM), qui inhibe plus faiblement l'agrégation des plaquettes C57Bl6 montre également une réponse augmentée dans les plaquettes VASP<sup>-/-</sup>. Avec une concentration plus forte de Sp-5,6-DCI-cBIMPS (50 μM), cette différence n'est plus visible. Ces résultats indiquent un rôle inhibiteur de VASP mais qui semble modeste puisqu'il n'est révélé dans les plaquettes KO que lors d'une répression par des taux augmentés de nucléotides cycliques (figure 71 C).

### 3) Conclusion

Le rôle de VASP dans l'émission de filopodes a été décrit dans les cellules adhérentes grâce à l'utilisation de mutants (Applewhite et al., 2007; Barzik et al., 2005). Sa capacité à se lier à l'actine et ses propriétés d'anti-capping et d'élongation lui ont valu d'être proposée comme une protéine clé de l'émission de filopodes dans différents types cellulaires. VASP a été impliquée dans l'émission de filopodes des plaquettes adhérant sur collagène. A l'image des résultats obtenus dans les plaquettes de souris PKCδ<sup>-/-</sup>, cette émission de filopodes diffère de celle observée après adhésion sur FW (Pula et al., 2006). Notre étude montre que l'absence de VASP ne modifie pas l'émission de filopodes des plaquettes qui adhèrent sur FW ou sur fibrinogène, ou qui sont activées en suspension par des agonistes solubles. Bien que des études aient montré que le rôle de VASP soit plus marqué en présence d'agents qui augmentent les taux de nucléotides cycliques (Aszodi et al., 1999; Kawato et al.,

2008; Sheth and Colman, 1995), nos expériences d'adhésion en présence de tels agents n'ont pas permis de mettre en évidence un rôle de VASP (**Annexe 2**). Cependant un rôle modulateur négatif de l'agrégation a pu être mis en évidence grâce ses agents. Dans nos conditions expérimentales ce rôle semble mineur et n'est clairement visible qu'à de faibles doses d'agonistes. Si l'on se place dans le contexte vasculaire où une répression de l'activation des plaquettes est exercée par le NO et la PGI<sub>2</sub> produits par les cellules endothéliales, l'augmentation de GMPc et AMPc pourrait maintenir VASP dans un état phosphorylée. VASP phosphorylée est capable de maintenir les plaquettes au repos. Lors d'une brèche vasculaire, la quantité importante d'agonistes libérés provoquant une forte activation plaquettaire dépasserait alors les capacités de VASP à maintenir les plaquettes au repos.

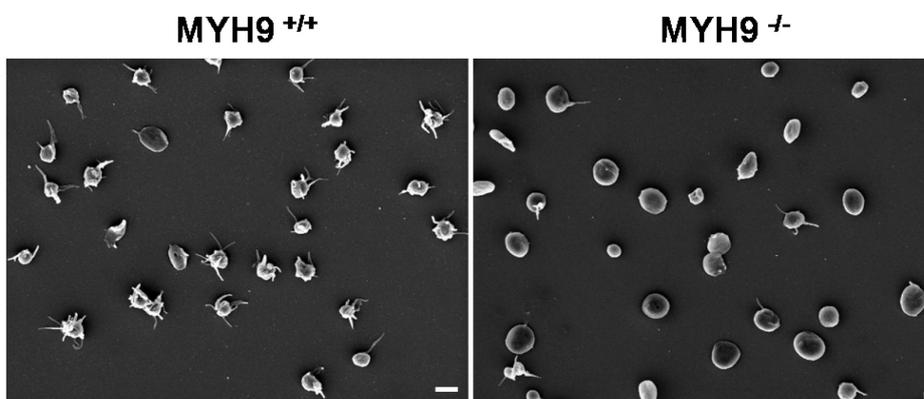
### **E) Rôle de la Myosine IIA**

La myosine est une protéine motrice qui après phosphorylation de sa chaîne légère, entraîne un réarrangement du cytosquelette des plaquettes menant à la contraction et à la perte de la forme discoïde. Le cycle de déphosphorylation/phosphorylation implique respectivement une phosphatase régulée par la Rho kinase et une MLC kinase régulée par le calcium. Le gène *MYH9* code pour une chaîne lourde de la Myosine IIA qui est le seul isoforme connu dans la plaquette. Des mutations du gène *MYH9* chez des patients entraînent une thrombopénie et s'accompagnent d'une perte du changement de forme des plaquettes activées dans l'agrégomètre sans altérer l'agrégation. Un modèle murin n'exprimant pas la Myosine IIA (*MYH9*Δ) dans les mégacaryocytes et les plaquettes a été développé dans notre laboratoire (Leon et al., 2007). Ces souris sont thrombopéniques et leurs plaquettes ont une morphologie altérée. Les souris *MYH9*Δ ont un temps de saignement fortement allongé, une absence de rétraction du caillot et un léger défaut d'agrégation.

## 1) Activation en suspension en réponse à l'ADP

Les plaquettes MYH9<sup>-/-</sup> restent en majorité discoïdes et émettent très peu ou pas de filopodes après activation par l'ADP en comparaison avec les plaquettes MYH9<sup>+/+</sup> (Figure 72). Cette réponse anormale à l'ADP a été la première indication de son rôle dans l'émission de filopodes suggérant un rôle de la Myosine IIA également dans l'émission de filopodes GPIIb-V-IX dépendante.

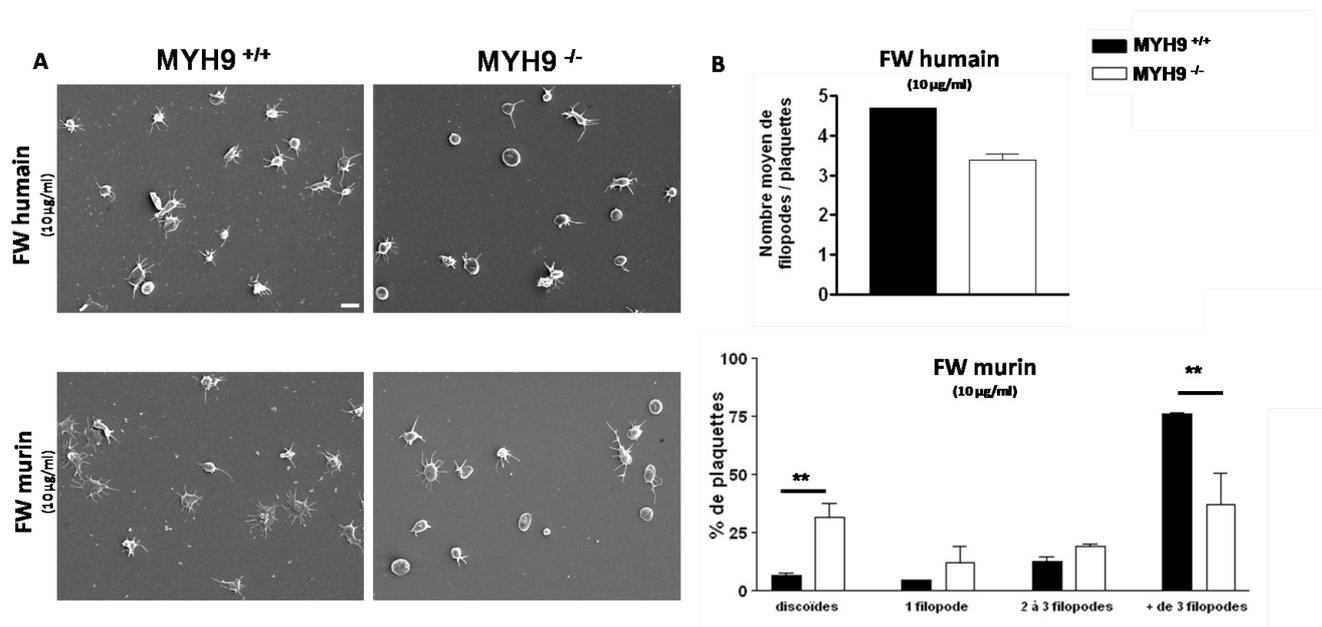
### Activation en suspension en réponse à l'ADP (5 $\mu$ M)



**Figure 72** Effet de l'absence de Myosine IIA sur l'émission de filopodes après activation en suspension par l'ADP. Activation par l'ADP (5  $\mu$ M) des plaquettes de souris MYH9<sup>+/+</sup> ou MYH9<sup>-/-</sup> (300 000 pl/ $\mu$ l) en suspension en présence d'Intégrilin (40  $\mu$ g/ml) à 37°C pendant 1 min puis fixation avec du glutaraldéhyde 2,5% et observation au microscope électronique à balayage. Barre = 2  $\mu$ m.

## 2) Etude de l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante

Les plaquettes de souris MYH9<sup>-/-</sup> qui adhèrent sur FW humain ou murin sont peu réactives avec une proportion importante qui restent discoïdes ou émettent peu de filopodes en comparaison avec les plaquettes MYH9<sup>+/+</sup> (Figure 73). Seulement 30% des plaquettes MYH9<sup>-/-</sup> émettent plus de 3 filopodes contre 75% des plaquettes MYH9<sup>+/+</sup>. Ces différences sont statistiquement significatives avec une valeur de p<0,01. Ces résultats montrent que l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante est également affectée par l'absence de Myosine IIA.

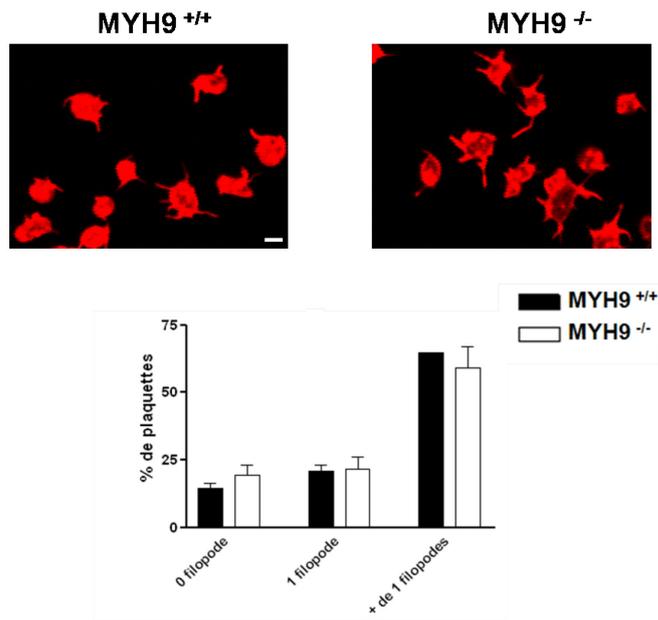


**Figure 73** Effet de l'absence de Myosine IIA sur l'émission de filopodes GPIb-V-IX dépendante. **A)** Adhésion des plaquettes de souris MYH9<sup>+/+</sup> ou MYH9<sup>-/-</sup> (30 000 pl/µl) sur une surface de FW humain (n=2) ou murin (n=3) (10 µg/ml) selon les techniques détaillées de la figure 36. (Barre= 2 µm). **B)** Quantification de l'émission de filopodes en fonction du nombre moyen de filopodes par plaquettes ou par classes (discoïdes, 1, 2 à 3 ou + de 3 filopodes). Test statistique de Mann-Whitney qui montre une augmentation des plaquettes discoïdes et une diminution de l'émission de filopodes significativement différentes pour les plaquettes MYH9<sup>-/-</sup> comparativement aux MYH9<sup>+/+</sup> avec une valeur de p<0,01.

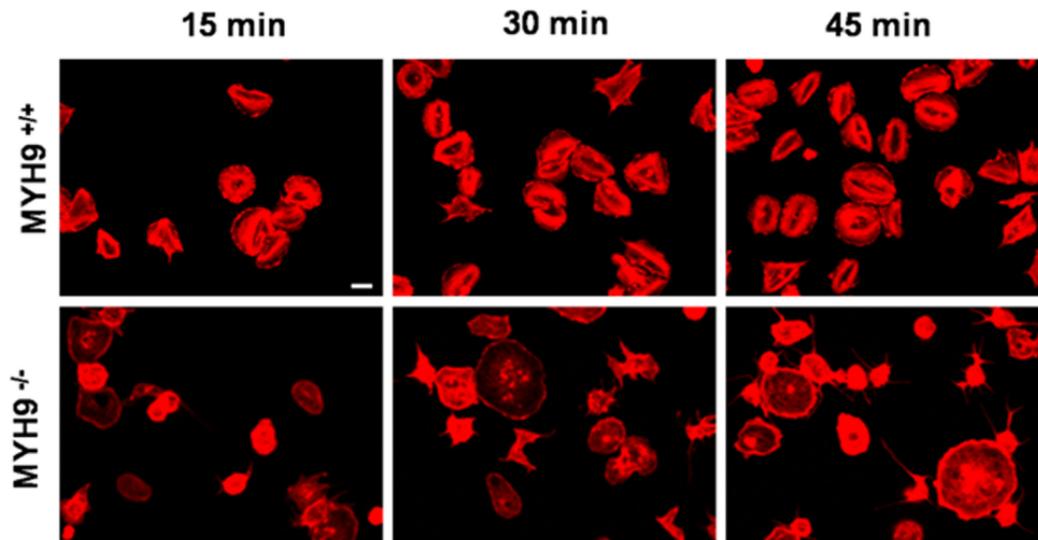
### **3) Etude des changements morphologiques après adhésion sur fibrinogène**

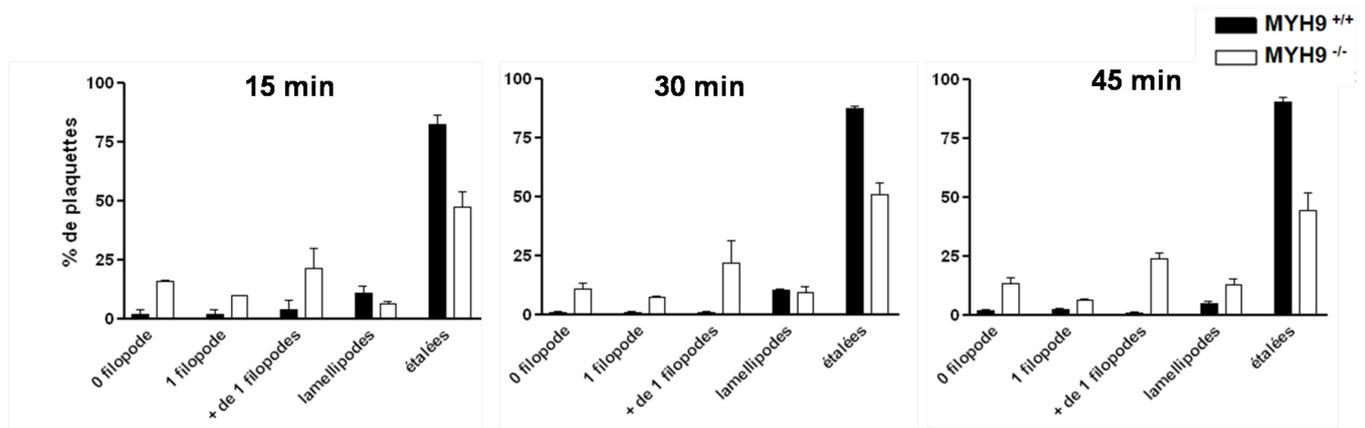
Les plaquettes de souris MYH9<sup>-/-</sup> qui adhèrent sur une surface recouverte de fibrinogène se contractent et émettent des filopodes de la même façon que les plaquettes de souris MYH9<sup>+/+</sup> (Figure 74 A). Par contre après activation par la thrombine, on observe une inhibition de l'étalement et de la formation des fibres de stress des plaquettes MYH9<sup>-/-</sup> qui ne se rétablie pas au cours du temps (Figure 74 B). Seulement 50 % des plaquettes MYH9<sup>-/-</sup> s'étaient pour plus de 80% des plaquettes MYH9<sup>+/+</sup>.

**A** Adhésion sur fibrinogène



**B** Adhésion sur fibrinogène avec stimulation par la thrombine





**Figure 74 Effet de l'absence de Myosine IIA sur les changements morphologiques plaquettaires après adhésion sur fibrinogène.** A) Adhésion des plaquettes de souris MYH9<sup>+/+</sup> et MYH9<sup>-/-</sup> (30 000 pI/ $\mu$ l) sur une surface de Fibrinogène (100  $\mu$ g/ml) sans ou B) avec stimulation par la thrombine (0,1 U/ml). Après 15, 30 ou 45 min (thr) ou 60 min (sans stimulation) d'adhésion les plaquettes sont lavées et fixées au PFA 4%. Les échantillons sont marqués avec de la phalloïdine-TRITC puis observées en microscopie à fluorescence. (n=2, Barre= 1,5  $\mu$ m). Quantification en classes (0, 1, + de 1 filopode (s), lamellipodes ou étalées).

#### 4) Conclusion

Ces résultats montrent que la Myosine IIA est impliquée dans l'émission des filopodes GPIb-V-IX dépendante. Ces résultats sont en accord avec ce qui est connu sur le rôle de cette protéine dans la contraction acto-myosine dépendante mais n'étaient pas connus concernant l'émission de filopodes. La Myosine IIA semble affecter spécifiquement la voie GPIb-V-IX puisque les filopodes observés sur fibrinogène persistent dans les KO Myosine. Cependant, l'absence de Myosine IIA inhibe l'émission de filopodes après activation des plaquettes en suspension par des agonistes solubles. La Myosine IIA est également clairement impliquée en aval de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 dans le processus d'étalement et de formation des fibres de stress. Ces résultats indiquent un rôle général, multiple de la Myosine IIA dans la polymérisation d'actine. L'hypothèse serait qu'elle soit impliquée dans le positionnement intracytoplasmique des différentes protéines impliquées dans ces mécanismes telles que les GTPases Cdc42, Rac1 et Rho. En effet, des expériences préliminaires montrent que ces GTPases présentent une activité GTPasique diminuée en présence de blebbistatine en réponse à la thrombine (Résultats non montrés).



## **Discussion et Perspectives**



## **VI) Discussion et perspectives**

L'objectif central de ce travail était d'améliorer notre connaissance de la signalisation en aval du complexe GPIb-V-IX et particulièrement des mécanismes de l'émission de filopodes en réponse à ce récepteur. Pour cela, la stratégie employée a été d'évaluer le rôle de différents acteurs potentiels en utilisant des plaquettes de souris transgéniques et des inhibiteurs sélectifs. Ce choix impliquait des limites liées à la disponibilité de ces outils. Ceci explique qu'il n'ait été possible de tester qu'une partie des protéines potentiellement impliquées dans l'activation et l'émission de filopodes. Ce travail a cependant permis de mettre en évidence le rôle de deux acteurs importants pour l'émission de filopodes, Cdc42 et la Myosine IIA, et d'éliminer l'implication de plusieurs acteurs potentiels. Dans cette partie, nous nous sommes focalisés sur la discussion des résultats traitant spécifiquement des réponses dépendantes du complexe GPIb-V-IX.

L'adhésion plaquettaire au FW induit, via le complexe GPIb-V-IX, une signalisation impliquant l'activation de PLC $\gamma$ 2 et la mobilisation calcique. Un rôle des src kinases a été mis en évidence en amont de PLC $\gamma$ 2 à des inhibiteurs spécifiques, PP1 et PP2, qui inhibent la phosphorylation de PLC $\gamma$ 2, la mobilisation calcique et l'émission de filopodes (Mangin et al., 2003). L'identité de la ou des src kinases impliquées dans cette réponse reste à ce jour indéterminée. Parmi les src kinases présentes dans la plaquette (c-src, Fyn, Lyn, Hck, Yes, FgR et Lck), un rôle avait été proposé pour c-src et Lyn basé sur leur capacité à interagir avec le complexe (Wu et al., 2003). Le rôle de Lyn était également supposé sur l'analogie entre la signalisation provenant de GPIb et GPVI, cette dernière impliquant Lyn en amont de PLC $\gamma$ 2 (Quek et al., 2000). L'obtention des souris Lyn<sup>-/-</sup> et Lyn<sup>up/up</sup>, respectivement dépourvues de l'enzyme ou exprimant une forme activée constitutive, a permis d'étudier le rôle de cette src kinase dans la signalisation en aval de GPIb. Les résultats obtenus dans ces deux modèles, montrant une capacité normale à émettre des filopodes lors de l'adhésion sur FW, indiquent que Lyn n'est pas la src kinase impliquée dans cette signalisation. Ces résultats semblent en contradiction avec ceux rapportant une moindre réactivité des plaquettes Lyn<sup>-/-</sup> adhérant sur FW (Yin et al., 2008). L'analyse de ces données montre qu'elles reflètent l'activation déclenchée via GPIb mais

également l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 illustré par l'étalement des plaquettes. Ces travaux ne permettent donc pas de conclure sur un rôle spécifique de Lyn dans la voie GPIb. Nos données ne permettent pas non plus d'exclure totalement un rôle de Lyn dans la signalisation GPIb car des mécanismes de compensation par d'autres src kinases sont possibles. Il serait nécessaire pour cela de vérifier le niveau d'expression des autres src kinases et une éventuelle augmentation de leur activité kinase dans les plaquettes Lyn<sup>-/-</sup> et Lyn<sup>up/up</sup>. Si Lyn n'est effectivement pas impliquée, d'autres kinases pourraient être assez directement évaluées en s'appuyant sur les KO existants pour c-src<sup>-/-</sup>, Fyn<sup>-/-</sup>, Yes<sup>-/-</sup>, Hck<sup>-/-</sup>, Fgr<sup>-/-</sup> (Nelson et al., 2009; Quek et al., 2000; Stein et al., 1994). Parmi celles-ci, c-src paraîtrait la plus pertinente au vu de son interaction avec le complexe GPIb-V-IX. Son étude nécessiterait la construction d'un KO conditionnel dans la lignée plaquettaire car les souris c-src<sup>-/-</sup> présentent une forte mortalité.

L'implication des src kinases et de PLC $\gamma$ 2 a été observée aussi bien en aval de GPVI que de GPIb, suggérant qu'une tyrosine kinase participant à la voie GPVI, comme Btk qui active PLC $\gamma$ 2, puisse également intervenir dans la voie GPIb. Nous avons eu accès à des souris transgéniques Btk<sup>Xid</sup> exprimant une kinase inactive permettant l'évaluation du rôle de Btk dans l'émission de filopodes GPIb dépendante. Tout comme pour Lyn, les résultats montrant une émission normale de filopodes, indiquent que cette protéine n'est pas impliquée. Une compensation par Tec, un autre membre de la famille, est envisageable nécessitant la vérification d'une surexpression et/ou une suractivation de Tec dans les souris Btk<sup>Xid</sup>. L'évaluation des simple et double KO Tec et Btk permettrait de déterminer de façon définitive le rôle des Tec kinases dans la signalisation GPIb (Atkinson et al., 2003).

Alors que l'étude des src kinases comme Lyn ciblait des acteurs potentiels situés en amont de la signalisation GPIb, la suite de l'étude a mis l'accent sur les acteurs probablement d'aval connus pour jouer un rôle dans l'émission de filopodes plaquettaire et notamment PKC $\delta$ , VASP et Cdc42, pour lesquels nous avons eu accès à des inhibiteurs spécifiques et/ou des souris transgéniques. Pour la Myosine IIA, qui n'était pas connue pour participer à l'émission de filopodes, l'étude a été motivée par son rôle dans la contraction des plaquettes lors de leur activation, un processus qui est intimement

lié à l'émission de filopodes en réponse à la GPIb et à la majorité des activateurs plaquettaire (surfaces, agonistes solubles...). Le développement au laboratoire, de souris déficientes pour la Myosine IIA spécifiquement dans la plaquette, a permis d'évaluer cette protéine dans ces deux types de changement de forme.

Parmi ces candidats, PKC $\delta$  et VASP, ont été précédemment décrits pour jouer un rôle dans l'émission de filopodes en réponse au collagène en aval de GPVI (Pula et al., 2006). Nos données indiquent qu'ils ne sont pas impliqués dans l'émission de filopodes en aval de GPIb ni après activation par d'autres agonistes parmi lesquels nous n'avons malheureusement pas évalué les réponses après adhésion sur collagène. L'émission de filopodes observée lors de l'adhésion des plaquettes sur collagène dans l'étude publiée, est différente et plus tardive que celle observée dans les étapes initiales de l'activation plaquettaire lors de l'adhésion sur FW, sur fibrinogène et même sur collagène. L'analyse de la littérature montre que plusieurs modèles ou mécanismes ont été proposés pour l'émission de filopodes (Cf Revue bibliographique, Figures 18-20). Le mécanisme qui semble le plus adapté aux étapes précoces de l'activation plaquettaire, est celui de la formation de filopodes « de novo ». Au contraire, pour l'adhésion sur collagène, où une deuxième vague de filopodes naît plus tardivement à partir de lamellipodes préformés, le mécanisme pourrait correspondre au modèle de l'élongation convergente (Pula et al., 2006) qui a été proposé sur l'observation de cellules adhérentes, comme les cellules de mélanome B16F1, lors de leur migration (Svitkina et al., 2003). Il est donc envisageable que deux modes de formation des filopodes distincts existent dans la plaquette selon le type d'activation, qui pourraient obéir à différents acteurs. Dans cette hypothèse, PKC $\delta$  et VASP pourraient jouer un rôle dans l'émission de filopodes obéissant au modèle de l'élongation convergente mais ne soient pas impliqués en aval de GPIb où la formation de filopodes « de novo » paraît être le modèle le plus adapté.

Parmi les protéines évaluées, seules Cdc42 et la Myosine IIA semblent clairement impliquées dans l'émission de filopodes en aval de GPIb. Ces deux protéines ont pu être évaluées grâce à l'utilisation de souris déficientes spécifiquement dans la lignée plaquettaire. Elles sont impliquées à la

fois dans le changement de forme aboutissant à la contraction des plaquettes et l'émission de filopodes. L'implication de la Myosine IIA dans la transformation d'une forme discoïde à sphérique était anticipée au vu de son activité motrice au sein du complexe acto-myosine et des défauts de changements de formes observés chez les patients présentant des mutations du gène *MYH9* (Johnson et al., 2007). A l'inverse, alors que le rôle de Cdc42 dans l'émission de filopodes était bien établi, son rôle dans le processus de contraction n'a jamais été décrit (Nobes and Hall, 1995). Bien que des études aient également proposé un rôle de Cdc42 dans l'émission de filopodes en aval des voies GPVI et  $\alpha6\beta1$  (Chang et al., 2005; Pula et al., 2006), notre étude suggère un rôle spécifique dans la voie GPIb. Il est à rappeler que les études publiées s'appuyaient sur l'utilisation de la Secramine A, un composé décrit pour être spécifique de Cdc42. Nos résultats montrant un effet activateur sur les plaquettes au repos, soulèvent des questions quant à l'interprétation des résultats de ces études (Figure 51). Ce rôle spécifique de Cdc42 en aval de GPIb semble limité à la plaquette au vu des travaux précédents impliquant Cdc42 dans des cellules adhérentes comme les fibroblastes et les cellules épithéliales qui n'expriment pas de GPIb et pour lesquelles Cdc42 agirait en aval d'autres récepteurs d'adhésion comme des intégrines (Filipenko et al., 2005). L'absence de défaut des souris *Cdc42<sup>-/-</sup>* lors de l'adhésion sur fibrinogène, qui implique l'intégrine  $\alpha IIb\beta3$ , montre à nouveau l'existence de mécanismes différents dans la plaquette.

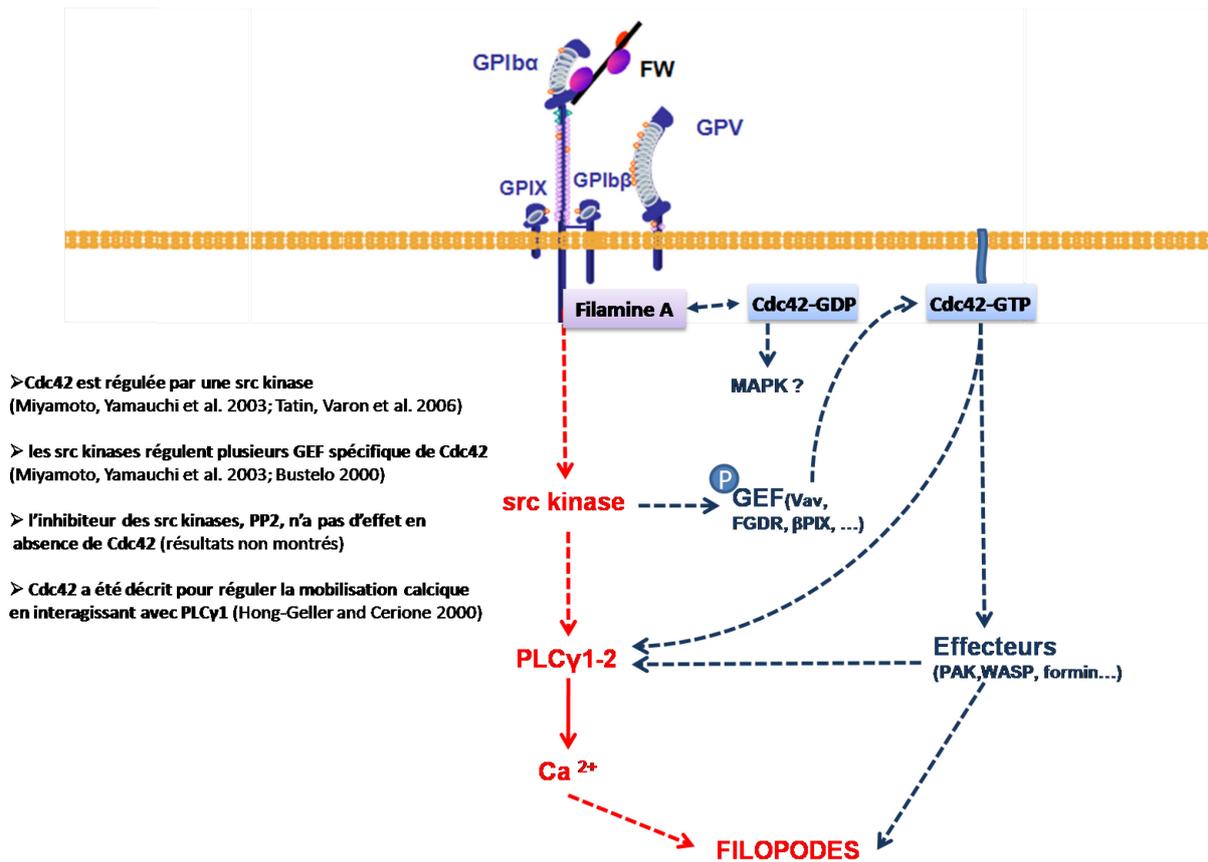
Plusieurs possibilités peuvent être envisagées pour placer Cdc42 dans une voie de signalisation provenant de GPIb-V-IX. Il est possible que Cdc42 intervienne i) de manière proximale en interagissant avec le complexe, en amont de src, ii) plus en aval après activation de PLC $\gamma$ 2 et de la mobilisation du calcium, mais dans ce cas se pose la question de la spécificité vis-à-vis de GPIb, iii) ou dans une voie de signalisation entièrement indépendante de celle passant par src, PLC $\gamma$ 2 et la mobilisation calcique.

Concernant la première hypothèse, d'une association avec le complexe, Cdc42-GDP a été décrit, dans les fibroblastes, pour interagir avec la Filamine A, qui est un des partenaires du complexe GPIb-V-IX. Bien que Cdc42-GDP soit dans un état inactif, il pourrait posséder une fonction de

signalisation en activant une MAPKinase (Arozarena et al., 2001). L'association entre Cdc42 et la Filamine A n'a pas pu être mise en évidence dans une première série d'immunoprécipitation réalisée dans la plaquette (Figure 54) ne permettant pas de conclure sur une interaction possible avec le complexe via la Filamine A. Toujours dans cette première hypothèse, la possibilité d'une participation de Cdc42 en aval de src est suggérée par des résultats dans des cellules HEK et des cellules endothéliales montrant que Cdc42 était régulée par des src kinases (Miyamoto et al., 2003; Tatin et al., 2006). Nous avons montré dans les plaquettes de souris Cdc42<sup>-/-</sup> que l'addition d'un inhibiteur de src kinase, PP2, n'exerce pas d'effet inhibiteur additionnel sur le changement de forme (résultats non montrés), un résultat compatible avec la participation de Cdc42 dans cette voie de signalisation en amont ou en aval d'une src kinase. Enfin, un lien entre Cdc42 et la mobilisation calcique a déjà été décrit où Cdc42 régulerait la mobilisation calcique en interagissant avec la PLC $\gamma$ 1 (Hong-Geller and Cerione, 2000). Concernant la deuxième hypothèse, Cdc42 pourrait être impliquée en aval de la mobilisation calcique comme ce qui a été décrit dans des cellules gliales où l'activation de Cdc42 est dépendante du calcium (Rosso et al., 2002). Dans ce cas, il est difficile de comprendre pourquoi les plaquettes de souris Cdc42<sup>-/-</sup> sont toujours capables d'émettre des filopodes en réponse à la thrombine ou à l'ADP qui entraînent également la mobilisation calcique. La dernière hypothèse d'une voie parallèle ne paraît pas envisageable au vu des expériences réalisées avec PP2 dans les plaquettes de souris Cdc42<sup>-/-</sup>. L'hypothèse qui paraît donc la plus probable est celle d'une implication de Cdc42 dans la signalisation décrite passant par src, PLC $\gamma$ 2 et mobilisation calcique.

Dans cette hypothèse la plus probable Cdc42 sous sa forme GTP influence l'émission de filopodes. Plusieurs mécanismes sont envisageables pour permettre le passage de la forme inactive à active liée au GTP et il existe également plusieurs effecteurs possibles permettant l'émission de filopodes. Cdc42, et les GTPases en général, sont actives et ont une fonction de signalisation lorsqu'elles sont sous une forme liée au GTP. Cependant elles se trouvent dans le cytosol sous une forme inactive liée au GDP et doivent subir une modification postraductionnelle pour pouvoir s'ancrer de manière stable à la membrane plasmique et être activées par une GEF (Guanine nucleotide exchange factor). L'échange du GDP en GTP est assuré par une GEF (Gibson et al., 2004; Glomset and

Farnsworth, 1994; Maltese and Sheridan, 1990). Il existe de multiples GEF de Cdc42 dont Dbl, Dbp, Ost, DOCK, Tiam-1, PIX (PAK-Interacting exchange factor), Vav et d'autres (Johnson, 1999; Schiller, 2006; Schmidt and Hall, 2002; Sinha and Yang, 2008). Vav, pourrait réguler Cdc42 dans la signalisation GPIb, car elle a déjà été décrite dans la plaquette pour participer à l'activation de PLC $\gamma$ 2 (Pearce et al., 2007). De plus, Vav a été décrite, dans des lymphocytes B et T, pour être régulée par les src kinases (Bustelo, 2000). Cdc42 sous sa forme GTP peut interagir et activer des effecteurs tels que WASP, PAK ou les formines (mDia1) qui sont présents dans la plaquette et qui ont été décrits pour participer à l'émission de filopodes et de lamellipodes (Abo et al., 1998; Pearce et al., 2007; Vidal et al., 2002). Une autre hypothèse, par analogie avec ce qui a été décrit dans d'autres systèmes cellulaires, pourrait être la régulation de Cdc42 via la formation d'un complexe associant  $\beta$ PIX/GTI1 avec PLC $\gamma$ .  $\beta$ PIX qui est une GEF de Cdc42 et GTI1 qui est ~~une~~ ~~adapt~~ adaptatrice activée notamment par les src kinases s'associent et se lient avec la PLC $\gamma$  (Jones and Katan, 2007). Le complexe  $\beta$ PIX/GTI1/PLC $\gamma$  permet l'activation de Cdc42 qui active alors ses effecteurs et régule la formation des filopodes. Ce schéma serait cependant moins compatible avec une signalisation GPIb spécifique car GTI1 interagit également avec l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 pour induire l'activation de Rac1 dans la plaquette (Sato et al., 2008). Un schéma non exhaustif résumant les différentes hypothèses pour le rôle de Cdc42 en aval de GPIb est représenté dans la figure 75.



**Figure 75** Mécanismes possibles de l'activation et de l'implication de Cdc42 dans la signalisation GPIb-V-IX.

Plusieurs approches expérimentales sont envisageables pour localiser le niveau auquel intervient Cdc42 dans la signalisation GPIb. Cependant une difficulté est de détecter l'activité GTPasique, dans les conditions de faible activation générée lors de l'adhésion au FW. Des expériences dans des conditions d'agrégation en présence de FW et de ristocétine seraient sujettes à caution du fait de la supposition de plusieurs signaux provenant d'autres récepteurs dans ces conditions. Un moyen de situer Cdc42 par rapport à PLCγ2 et la mobilisation de calcium sera d'évaluer l'émission de filopodes en présence d'inhibiteur de PLC et de chélateur calcique qui pourra être complétée par la mesure de la réponse calcique lors de l'adhésion par utilisation de sondes fluorescentes et de microscopie confocale.

Au-delà de Cdc42 dont l'implication dans l'émission de filopodes était bien établi, d'autres GTPases de la même famille telles que Rac1 et RhoA avaient également été décrites pour jouer un rôle dans ce mécanisme dans d'autres types cellulaires (Dumontier et al., 2000; Heckman et al., 2009). Nos

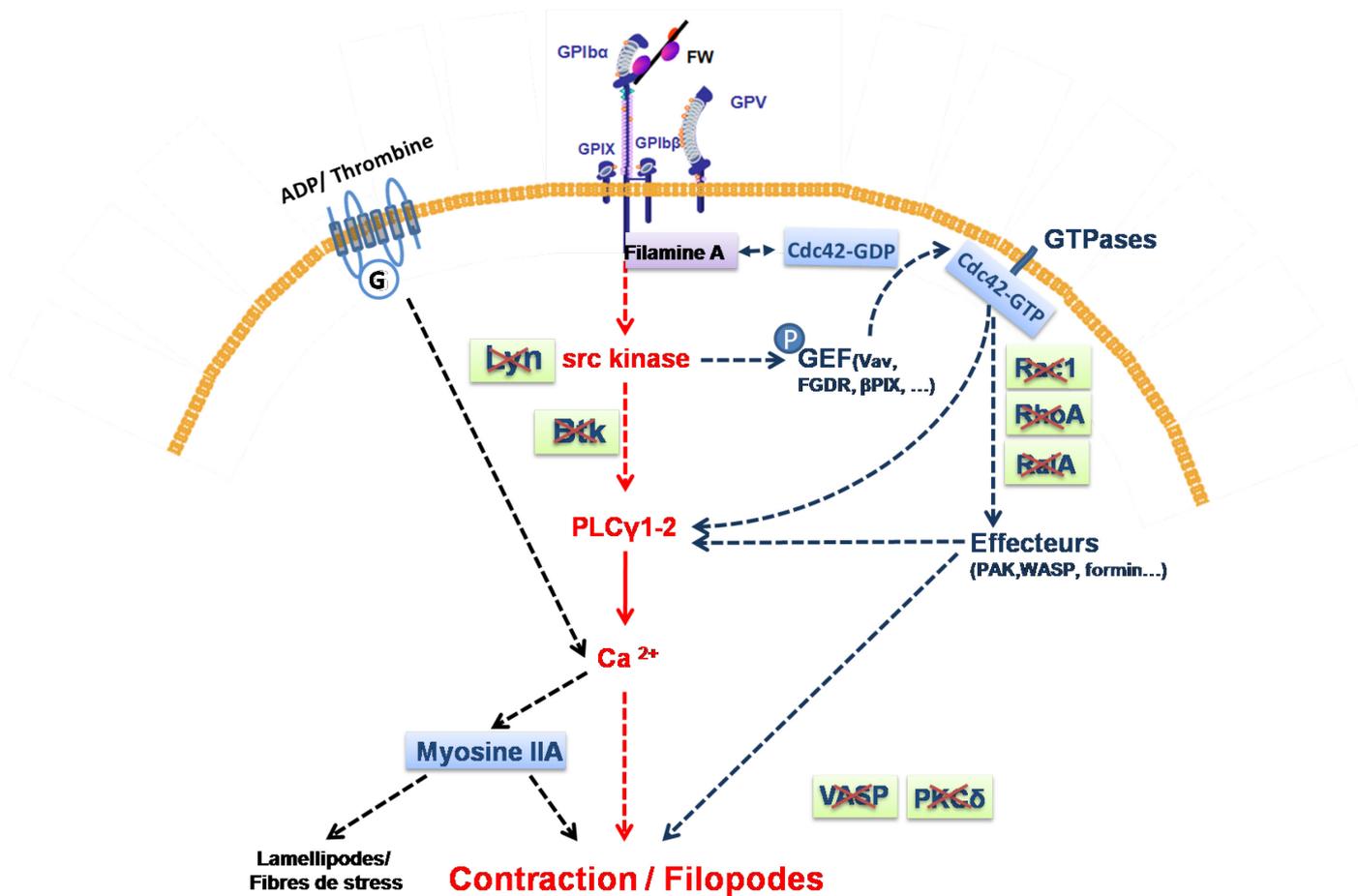
résultats montrent qu'elles ne sont pas impliquées dans l'émission de filopodes plaquettaire et que leur rôle semble restreint à ceux classiquement décrits dans la formation des lamellipodes pour Rac1 et de fibres de stress pour RhoA.

Le rôle de la Myosine IIA ne semble pas, contrairement à Cdc42, être restreint à l'émission de filopodes en aval de GPIb et porte également sur la formation des fibres de stress en réponse à différentes matrices et agonistes solubles (Figures 72-74) (Leon et al., 2007). Son implication dans la formation des fibres de stress, qui sont des filaments d'actines antiparallèles interagissant avec la Myosine, était bien connue et indiquait la capacité de la myosine à modifier l'organisation du réseau d'actine (Honer and Jockusch, 1988; Kreisberg et al., 1997). Les résultats obtenus, dans l'émission de filopodes, avec les souris MYH9 $\Delta$  et avec des plaquettes humaines traitées avec un inhibiteur spécifique de la myosine, la blebbistatine (Résultats non montrés), indiquent une deuxième propriété modulatrice en lien avec l'actine qui n'a encore jamais été rapportée dans la littérature (Lucas-Lopez et al., 2008). En accord avec cette propriété il a été montré, au laboratoire, que les plaquettes de souris MYH9 $\Delta$ , stimulées en suspension par la thrombine, polymérisent deux fois moins d'actine que les plaquettes contrôles. Le mécanisme impliqué dans ce processus n'est pas encore déterminé mais pourrait impliquer un défaut dans l'échaffaudage et le positionnement des protéines qui participent à la réorganisation du cytosquelette d'actine telles que les GTPases et mDia1 présentes dans la plaquette (Higashi et al., 2008). La Myosine IIA est régulée par la kinase MLCK (Myosin Light Chain Kinase) qui est elle-même régulée par l'augmentation du calcium intracellulaire et la Rho kinase (Johnson et al., 2007). C'est donc en aval du calcium et de façon non spécifique à GPIb que la Myosine IIA pourrait jouer un rôle dans les différentes signalisations menant à l'émission de filopodes.

Le rôle de la GTPase RalA n'a jamais été évalué dans l'émission de filopodes plaquettaires bien que plusieurs arguments suggèrent son implication notamment dans l'émission de filopodes lors de son interaction sous sa forme GTP avec la filamine A (Ohta et al., 1999; Sugihara et al., 2002). Pour RalA, tout comme pour d'autres protéines potentiellement impliquées dans l'émission de filopodes GPIb dépendante telles que Rif, TC10 ou Wrch1, l'étude de leur rôle dans la plaquette se

heurte à l'absence d'inhibiteurs spécifiques et de souris génétiquement modifiées (Neudauer et al., 1998; Pellegrin and Mellor, 2005; Saras et al., 2004). Afin de pouvoir étudier ces différentes protéines dans l'émission de filopodes GPIb dépendante, la stratégie mise en place a été d'établir une lignée cellulaire humaine exprimant de manière stable le complexe GPIb-IX afin d'y insérer des shRNA ou des vecteurs codants pour des formes actives ou inactives de ces protéines. La lignée HEK<sup>GPIb-IX</sup> établie lors de ce travail a montré que l'adhésion et l'émission de filopodes observées sont spécifiques de la signalisation GPIb car inhibées par un anticorps bloquant l'interaction au FW et par les inhibiteurs de src kinases et PLC. Dans ce modèle, l'utilisation de shRNA inhibant de près de 95% l'expression de RalA a permis d'éliminer cette GTPase comme acteur de la signalisation GPIb. Ce modèle cellulaire pourrait être utilisé pour y insérer un shRNA inhibant l'expression de Cdc42 afin de confirmer les résultats obtenus dans les plaquettes Cdc42<sup>-/-</sup> et ainsi valider cette approche non plaquettaire. Il serait également intéressant d'évaluer des vecteurs mutants actifs et inactifs de Cdc42 afin de déterminer s'il existe une mutation de Cdc42 spécifique de la voie GPIb. L'approche mise en place pour RalA pourra permettre d'évaluer le rôle d'autres protéines potentiellement impliquées dans l'émission de filopodes dont une liste a été établie au vu de la littérature (Figure 23). Parmi celles-ci, certaines n'ont pas encore été identifiées dans la plaquette. Bien qu'étant dépourvues de noyaux les plaquettes contiennent des niveaux suffisants d'ARNm permettant leur détection par PCR et l'évaluation de transcrits pour les différentes protéines candidates. Les premières expériences de RT-PCR ont permis de détecter la présence de transcrits pour Nck, Rif et TC10 et l'absence de c-Abl, mDia2 et Wrch1. Ces résultats devront être confirmés par détection des protéines par immunoempreinte. A terme, il est envisagé d'évaluer le rôle de ces protéines dans la plaquette par une approche plus rapide que l'inactivation génique par recombinaison homologe s'appuyant sur la transduction virale de progéniteurs hématopoïétiques. Le laboratoire a récemment mis au point les outils (vecteurs lentiviraux, cultures et différenciation de progéniteurs et greffe de progéniteurs transduits) permettant d'envisager l'évaluation de shRNA ou de transgènes pour les différentes protéines retenues. Leur rôle pourra être évalué dans les précurseurs des plaquettes, les mégacaryocytes cultivés *in vitro* ou dans les plaquettes circulantes après greffe de souris irradiées.

Le schéma de la figure 76 récapitule les résultats obtenus durant ce travail sur le rôle des différentes cibles potentiellement impliquées dans la signalisation GPIb-V-IX menant à l'émission de filopodes. Il intègre les mécanismes proposés pour expliquer la participation de Cdc42 et de la Myosine.



**Figure 76** Schéma récapitulatif des protéines évaluées et leur implication dans l'émission de filopodes GPIb dépendante

A terme, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'émission de filopodes plaquettaire pourra permettre d'apprécier l'importance de cette réponse dans l'hémostase primaire notamment lors des étapes précoces qui suivent la lésion d'un vaisseau et où domine le rôle du complexe GPIIb-V-IX. Des hypothèses ont été émises sur le rôle des filopodes dans l'augmentation des interactions ligands / récepteurs et le ralentissement des plaquettes lors du roulement sur une surface en conditions de flux (Hensler et al., 1992; Maxwell et al., 2006). A ce jour, le rôle

physiologique des différents types de changements morphologiques déployés par les plaquettes reste à établir notamment par manque de modèle pertinent utilisables *in vivo*. Un moyen serait de cibler (inactiver/activer) dans la souris une protéine spécifiquement impliquée dans la signalisation GPIb. Parmi les acteurs mis en évidence dans ce travail, Cdc42 semble être spécifique de cette voie de signalisation. Les souris Cdc42<sup>-/-</sup> présentent un temps de saignement augmenté qui serait en faveur d'un rôle des filopodes dans le processus hémostatique. Cependant, une analyse complète des fonctions plaquettaires de ces souris suggère que Cdc42 aurait également un rôle inhibiteur de la sécrétion ou du stockage des nucléotides. Il paraît donc difficile de s'appuyer entièrement sur ce modèle pour évaluer spécifiquement le rôle des filopodes. Concernant la Myosine IIA, qui est également impliquée dans l'émission de filopodes, les souris KO montrent un temps de saignement augmenté. Cependant, cette protéine perturbe de nombreuses autres fonctions pouvant affecter l'hémostase et notamment la capacité à former des lamellipodes et des fibres de stress, et à rétracter le caillot de fibrine. Ces souris ne représentent donc pas un bon modèle pour évaluer le rôle des filopodes dans l'hémostase. Un moyen plus spécifique serait de pouvoir agir directement au niveau du complexe GPIb-V-IX en mutant par exemple un domaine intracellulaire impliqué dans la transmission de la signalisation. Une étude récente du laboratoire a mis en évidence, dans un modèle cellulaire CHO transfecté par GPIb-IX, un rôle du domaine intracellulaire de la GPIb $\beta$  et a identifié des mutations entraînant une inhibition de l'émission de filopodes suite à l'interaction FW/GPIb (David et al., 2009). Ces mutations et leur impact sur l'émission de filopodes et dans l'hémostase pourraient être évalués dans des modèles utilisant des progéniteurs hématopoïétiques transduits avec la forme mutée de GPIb $\beta$  et greffés aux souris KO pour GPIb $\beta$  développées au laboratoire (Strassel et al., 2007).

Si l'on considère l'émission de filopodes en aval de GPVI ou de récepteurs aux agonistes solubles, dont les mécanismes restent encore à préciser, il est possible que l'inhibition de filopodes affecte de manière moindre l'hémostase puisque ces activations sont beaucoup plus fortes et entraînent rapidement l'étalement des plaquettes. Au-delà de l'hémostase, la capacité à inhiber sélectivement le signal GPIb permettra d'évaluer son rôle dans la thrombose. Une hypothèse pourrait être que l'inhibition de cette étape précoce de formation du thrombus, notamment au niveau artériel, où le rôle

de la voie GPIb est bien établi (Denis et al., 2009; Marx et al., 2008; Pendu et al., 2009; Ruggeri, 2007), puisse présenter une approche pharmacologique intéressante pour des anti-thrombotiques.

# **Références**



## **VII) Références**

- Abo A, Qu J, Cammarano MS, Dan C, Fritsch A, Baud V, Belisle B and Minden A (1998) PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *Embo J* **17**(22):6527-6540.
- Aitken A (2006) 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* **16**(3):162-172.
- Akbar H, Kim J, Funk K, Cancelas JA, Shang X, Chen L, Johnson JF, Williams DA and Zheng Y (2007) Genetic and pharmacologic evidence that Rac1 GTPase is involved in regulation of platelet secretion and aggregation. *J Thromb Haemost* **5**(8):1747-1755.
- Allain JP, Cooper HA, Wagner RH and Brinkhous KM (1975) Platelets fixed with paraformaldehyde: a new reagent for assay of von Willebrand factor and platelet aggregating factor. *J Lab Clin Med* **85**(2):318-328.
- Andrews RK, Booth WJ, Gorman JJ, Castaldi PA and Berndt MC (1989) Purification of botrocetin from Bothrops jararaca venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry* **28**(21):8317-8326.
- Andrews RK, Munday AD, Mitchell CA and Berndt MC (2001) Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* **98**(3):681-687.
- Applewhite DA, Barzik M, Kojima S, Svitkina TM, Gertler FB and Borisy GG (2007) Ena/VASP proteins have an anti-capping independent function in filopodia formation. *Mol Biol Cell* **18**(7):2579-2591.
- Arozarena I, Matallanas D and Crespo P (2001) Maintenance of CDC42 GDP-bound state by Rho-GDI inhibits MAP kinase activation by the exchange factor Ras-GRF. evidence for Ras-GRF function being inhibited by Cdc42-GDP but unaffected by CDC42-GTP. *The Journal of biological chemistry* **276**(24):21878-21884.
- Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S and Fassler R (1999) The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *Embo J* **18**(1):37-48.
- Atkinson BT, Ellmeier W and Watson SP (2003) Tec regulates platelet activation by GPVI in the absence of Btk. *Blood* **102**(10):3592-3599.
- Atkinson BT, Stafford MJ, Pears CJ and Watson SP (2001) Signalling events underlying platelet aggregation induced by the glycoprotein VI agonist convulxin. *Eur J Biochem* **268**(20):5242-5248.
- Barkalow KL, Falet H, Italiano JE, Jr., van Vugt A, Carpenter CL, Schreiber AD and Hartwig JH (2003) Role for phosphoinositide 3-kinase in Fc gamma RIIA-induced platelet shape change. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**(4):C797-805.
- Barzik M, Kotova TI, Higgs HN, Hazelwood L, Hanein D, Gertler FB and Schafer DA (2005) Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *The Journal of biological chemistry* **280**(31):28653-28662.
- Bear JE, Svitkina TM, Krause M, Schafer DA, Loureiro JJ, Strasser GA, Maly IV, Chaga OY, Cooper JA, Borisy GG and Gertler FB (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* **109**(4):509-521.
- Behnke O and Zelander T (1967) Filamentous substructure of microtubules of the marginal bundle of mammalian blood platelets. *Journal of ultrastructure research* **19**(1):147-165.
- Berning AK, Eicher EM, Paul WE and Scher I (1980) Mapping of the X-linked immune deficiency mutation (xid) of CBA/N mice. *J Immunol* **124**(4):1875-1877.

- Bialkowska K, Zaffran Y, Meyer SC and Fox JE (2003) 14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta. *The Journal of biological chemistry* **278**(35):33342-33350.
- Bradford HN, Pixley RA and Colman RW (2000) Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation. *The Journal of biological chemistry* **275**(30):22756-22763.
- Brass LF, Hoxie JA and Manning DR (1993) Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation. *Thromb Haemost* **70**(1):217-223.
- Buensuceso CS, Obergefell A, Soriani A, Eto K, Kiesses WB, Arias-Salgado EG, Kawakami T and Shattil SJ (2005) Regulation of outside-in signaling in platelets by integrin-associated protein kinase C beta. *The Journal of biological chemistry* **280**(1):644-653.
- Bustelo XR (2000) Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* **20**(5):1461-1477.
- Calderwood DA, Shattil SJ and Ginsberg MH (2000) Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *The Journal of biological chemistry* **275**(30):22607-22610.
- Canobbio I, Balduini C and Torti M (2004) Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal* **16**(12):1329-1344.
- Canobbio I, Bertoni A, Lova P, Paganini S, Hirsch E, Sinigaglia F, Balduini C and Torti M (2001) Platelet activation by von Willebrand factor requires coordinated signaling through thromboxane A2 and Fc gamma IIA receptor. *The Journal of biological chemistry* **276**(28):26022-26029.
- Carlier MF, Ducruix A and Pantaloni D (1999) Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection. *Chemistry & biology* **6**(9):R235-240.
- Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B and Gachet C (2004) Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol* **272**:13-28.
- Celikel R, McClintock RA, Roberts JR, Mendolicchio GL, Ware J, Varughese KI and Ruggeri ZM (2003) Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha. *Science* **301**(5630):218-221.
- Chang JC, Chang HH, Lin CT and Lo SJ (2005) The integrin alpha6beta1 modulation of PI3K and Cdc42 activities induces dynamic filopodium formation in human platelets. *J Biomed Sci* **12**(6):881-898.
- Cho MJ, Pestina TI, Steward SA, Lowell CA, Jackson CW and Gartner TK (2002) Role of the Src family kinase Lyn in TxA2 production, adenosine diphosphate secretion, Akt phosphorylation, and irreversible aggregation in platelets stimulated with gamma-thrombin. *Blood* **99**(7):2442-2447.
- Chopek MW, Girma JP, Fujikawa K, Davie EW and Titani K (1986) Human von Willebrand factor: a multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry* **25**(11):3146-3155.
- Clemetson KJ (1997) Platelet GPIb-V-IX complex. *Thrombosis and haemostasis* **78**(1):266-270.
- Clemetson KJ and Clemetson JM (2004) Platelet receptor signalling. *Hematol J* **5 Suppl 3**:S159-163.
- Clough RR, Sidhu RS and Bhullar RP (2002) Calmodulin binds RalA and RalB and is required for the thrombin-induced activation of Ral in human platelets. *The Journal of biological chemistry* **277**(32):28972-28980.
- Coughlin SR (2005) Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* **3**(8):1800-1814.
- Czuchra A, Wu X, Meyer H, van Hengel J, Schroeder T, Geffers R, Rottner K and Brakebusch C (2005) Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Mol Biol Cell* **16**(10):4473-4484.
- David T, Ohlmann P, Eckly A, Moog S, Cazenave JP, Gachet C and Lanza F (2006) Inhibition of adhesive and signaling functions of the platelet GPIb-V-IX complex by a cell penetrating GPIbalpha peptide. *J Thromb Haemost* **4**(12):2645-2655.

- David T, Strassel C, Eckly A, Cazenave JP, Gachet C and Lanza F (2009) The Platelet Glycoprotein GPIIb/IIIa intracellular domain participates in von Willebrand factor induced-filopodia formation independently of the Ser 166 phosphorylation site. *J Thromb Haemost*.
- De Marco L, Mazzucato M, Masotti A and Ruggeri ZM (1994) Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein Ib alpha. *The Journal of biological chemistry* **269**(9):6478-6484.
- Denis CV, Marx I, Badirou I, Pendu R and Christophe O (2009) Mouse models to study von Willebrand factor structure-function relationships in vivo. *Hamostaseologie* **29**(1):17-18, 20.
- Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, Philippar U, Barzik M, Rubinson DA, Gupton S, Van Veen JE, Furman C, Zhang J, Alberts AS, Mori S and Gertler FB (2007) Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat Cell Biol* **9**(12):1347-1359.
- Dopheide SM, Maxwell MJ and Jackson SP (2002) Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood* **99**(1):159-167.
- Dowal L and Flaumenhaft R Targeting Platelet G-Protein Coupled Receptors (GPCRs): Looking Beyond Conventional GPCR Antagonism. *Current vascular pharmacology*.
- Dumas JJ, Kumar R, McDonagh T, Sullivan F, Stahl ML, Somers WS and Mosyak L (2004) Crystal structure of the wild-type von Willebrand factor A1-glycoprotein Iba1 complex reveals conformation differences with a complex bearing von Willebrand disease mutations. *The Journal of biological chemistry* **279**(22):23327-23334.
- Dumontier M, Hocht P, Mintert U and Faix J (2000) Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in Dictyostelium. *J Cell Sci* **113 ( Pt 12)**:2253-2265.
- Dyson JM, Munday AD, Kong AM, Huysmans RD, Matzaris M, Layton MJ, Nandurkar HH, Berndt MC and Mitchell CA (2003) SHIP-2 forms a tetrameric complex with filamin, actin, and GPIb-IX-V: localization of SHIP-2 to the activated platelet actin cytoskeleton. *Blood* **102**(3):940-948.
- Ellis S and Mellor H (2000) The novel Rho-family GTPase rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. *Curr Biol* **10**(21):1387-1390.
- Emsley J, King SL, Bergelson JM and Liddington RC (1997) Crystal structure of the I domain from integrin alpha2beta1. *The Journal of biological chemistry* **272**(45):28512-28517.
- Faix J and Rottner K (2006) The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol* **18**(1):18-25.
- Falet H, Hoffmeister KM, Neujahr R and Hartwig JH (2002a) Normal Arp2/3 complex activation in platelets lacking WASp. *Blood* **100**(6):2113-2122.
- Falet H, Hoffmeister KM, Neujahr R, Italiano JE, Jr., Stossel TP, Southwick FS and Hartwig JH (2002b) Importance of free actin filament barbed ends for Arp2/3 complex function in platelets and fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(26):16782-16787.
- Feig LA (2003) Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol* **13**(8):419-425.
- Feng S, Resendiz JC, Christodoulides N, Lu X, Arboleda D, Berndt MC and Kroll MH (2002) Pathological shear stress stimulates the tyrosine phosphorylation of alpha-actinin associated with the glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry* **41**(4):1100-1108.
- Filipenko NR, Attwell S, Roskelley C and Dedhar S (2005) Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX. *Oncogene* **24**(38):5837-5849.
- Fox JE (2001) Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thrombosis and haemostasis* **86**(1):198-213.
- Freson K, De Vos R, Wittevrongel C, Thys C, Defoor J, Vanhees L, Vermeylen J, Peerlinck K and Van Geet C (2005) The TUBB1 Q43P functional polymorphism reduces the risk of cardiovascular disease in men by modulating platelet function and structure. *Blood* **106**(7):2356-2362.

- Fu D, van Dam EM, Brymora A, Duggin IG, Robinson PJ and Roufogalis BD (2007) The small GTPases Rab5 and RalA regulate intracellular traffic of P-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1773**(7):1062-1072.
- Fukuda K, Doggett TA, Bankston LA, Cruz MA, Diacovo TG and Liddington RC (2002) Structural basis of von Willebrand factor activation by the snake toxin botrocetin. *Structure* **10**(7):943-950.
- Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J and Zheng Y (2004) Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20):7618-7623.
- Gear AR (1984) Rapid platelet morphological changes visualized by scanning-electron microscopy: kinetics derived from a quenched-flow approach. *British journal of haematology* **56**(3):387-398.
- Gibson RM, Gandhi PN, Tong X, Miyoshi J, Takai Y, Konieczkowski M, Sedor JR and Wilson-Delfosse AL (2004) An activating mutant of Cdc42 that fails to interact with Rho GDP-dissociation inhibitor localizes to the plasma membrane and mediates actin reorganization. *Exp Cell Res* **301**(2):211-222.
- Glomset JA and Farnsworth CC (1994) Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol* **10**:181-205.
- Gross BS, Wilde JI, Quek L, Chapel H, Nelson DL and Watson SP (1999) Regulation and function of WASp in platelets by the collagen receptor, glycoprotein VI. *Blood* **94**(12):4166-4176.
- Gu M, Xi X, Englund GD, Berndt MC and Du X (1999) Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3) using a reconstituted mammalian cell expression model. *J Cell Biol* **147**(5):1085-1096.
- Guillou H, Depraz-Depland A, Planus E, Vianay B, Chaussy J, Grichine A, Albiges-Rizo C and Block MR (2008) Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling. *Exp Cell Res* **314**(3):478-488.
- Gupton SL and Gertler FB (2007) Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci STKE* **2007**(400):re5.
- Harder KW, Parsons LM, Armes J, Evans N, Kountouri N, Clark R, Quilici C, Grail D, Hodgson GS, Dunn AR and Hibbs ML (2001) Gain- and loss-of-function Lyn mutant mice define a critical inhibitory role for Lyn in the myeloid lineage. *Immunity* **15**(4):603-615.
- Hartwig JH (2006) The platelet: form and function. *Seminars in hematology* **43**(1 Suppl 1):S94-100.
- Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M, Gambaryan S, Krenn V, Geiger J, Glazova M, Rohde E, Horak I, Walter U and Zimmer M (1999) Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14):8120-8125.
- Heckman CA, Demuth JG, Deters D, Malwade SR, Cayer ML, Monfries C and Mamais A (2009) Relationship of p21-activated kinase (PAK) and filopodia to persistence and oncogenic transformation. *J Cell Physiol* **220**(3):576-585.
- Hemric ME, Tracy PB and Haeberle JR (1994) Caldesmon enhances the binding of myosin to the cytoskeleton during platelet activation. *The Journal of biological chemistry* **269**(6):4125-4128.
- Hensler ME, Frojmovic M, Taylor RG, Hantgan RR and Lewis JC (1992) Platelet morphologic changes and fibrinogen receptor localization. Initial responses in ADP-activated human platelets. *The American journal of pathology* **141**(3):707-719.
- Hibbs ML, Tarlinton DM, Armes J, Grail D, Hodgson G, Maglitta R, Stacker SA and Dunn AR (1995) Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* **83**(2):301-311.
- Higashi T, Ikeda T, Shirakawa R, Kondo H, Kawato M, Horiguchi M, Okuda T, Okawa K, Fukai S, Nureki O, Kita T and Horiuchi H (2008) Biochemical characterization of the Rho GTPase-regulated actin assembly by diaphanous-related formins, mDia1 and Daam1, in platelets. *The Journal of biological chemistry* **283**(13):8746-8755.

- Higgs HN and Pollard TD (1999) Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *The Journal of biological chemistry* **274**(46):32531-32534.
- Hitchcock IS, Fox NE, Prevost N, Sear K, Shattil SJ and Kaushansky K (2008) Roles of focal adhesion kinase (FAK) in megakaryopoiesis and platelet function: studies using a megakaryocyte lineage specific FAK knockout. *Blood* **111**(2):596-604.
- Honer B and Jockusch BM (1988) Stress fiber dynamics as probed by antibodies against myosin. *Eur J Cell Biol* **47**(1):14-21.
- Hong-Geller E and Cerione RA (2000) Cdc42 and Rac stimulate exocytosis of secretory granules by activating the IP(3)/calcium pathway in RBL-2H3 mast cells. *J Cell Biol* **148**(3):481-494.
- Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ and Gros P (2002) Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science* **297**(5584):1176-1179.
- Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJ, Moroi M, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, Ozaki Y and Watson SP (2006) Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood* **107**(4):1405-1412.
- Italiano JE, Jr., Bergmeier W, Tiwari S, Falet H, Hartwig JH, Hoffmeister KM, Andre P, Wagner DD and Shivdasani RA (2003) Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood* **101**(12):4789-4796.
- Jackson SP, Cranmer S, Mangin P and Yuan Y (2007) Are Erk, Btk, and PECAM-1 major players in GPIb signaling? The challenge of unraveling signaling events downstream of platelet GPIb. *Blood* **109**(2):846-847; discussion 847-848.
- Jen CJ, Chen HI, Lai KC and Usami S (1996) Changes in cytosolic calcium concentrations and cell morphology in single platelets adhered to fibrinogen-coated surface under flow. *Blood* **87**(9):3775-3782.
- Johnson DI (1999) Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(1):54-105.
- Johnson GJ, Leis LA, Krumwiede MD and White JG (2007) The critical role of myosin IIA in platelet internal contraction. *J Thromb Haemost* **5**(7):1516-1529.
- Jones NP and Katan M (2007) Role of phospholipase Cgamma1 in cell spreading requires association with a beta-Pix/GIT1-containing complex, leading to activation of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* **27**(16):5790-5805.
- Kang F, Laine RO, Bubbs MR, Southwick FS and Purich DL (1997) Profilin interacts with the Gly-Pro-Pro-Pro-Pro sequences of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): implications for actin-based Listeria motility. *Biochemistry* **36**(27):8384-8392.
- Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM and Shattil SJ (2004) Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors. *Blood* **103**(9):3403-3411.
- Kasirer-Friede A, Moran B, Nagrampa-Orje J, Swanson K, Ruggeri ZM, Schraven B, Neel BG, Koretzky G and Shattil SJ (2007) ADAP is required for normal alphaIIb beta3 activation by VWF/GP Ib-IX-V and other agonists. *Blood* **109**(3):1018-1025.
- Kasirer-Friede A, Ware J, Leng L, Marchese P, Ruggeri ZM and Shattil SJ (2002) Lateral clustering of platelet GP Ib-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of integrin alpha IIb beta 3. *The Journal of biological chemistry* **277**(14):11949-11956.
- Kawato M, Shirakawa R, Kondo H, Higashi T, Ikeda T, Okawa K, Fukai S, Nureki O, Kita T and Horiuchi H (2008) Regulation of platelet dense granule secretion by the Ral GTPase-exocyst pathway. *The Journal of biological chemistry* **283**(1):166-174.
- Keeney S and Cumming AM (2001) The molecular biology of von Willebrand disease. *Clin Lab Haematol* **23**(4):209-230.
- Kjoller L and Hall A (1999) Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* **253**(1):166-179.

- Kobe B and Deisenhofer J (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends in biochemical sciences* **19**(10):415-421.
- Kozma R, Ahmed S, Best A and Lim L (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **15**(4):1942-1952.
- Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ and Gertler FB (2003) Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**:541-564.
- Kreisberg JI, Ghosh-Choudhury N, Radnik RA and Schwartz MA (1997) Role of Rho and myosin phosphorylation in actin stress fiber assembly in mesangial cells. *Am J Physiol* **273**(2 Pt 2):F283-288.
- Kroll MH, Harris TS, Moake JL, Handin RI and Schafer AI (1991) von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *J Clin Invest* **88**(5):1568-1573.
- Kroll MH, Hellums JD, Guo Z, Durante W, Razdan K, Hrbolich JK and Schafer AI (1993) Protein kinase C is activated in platelets subjected to pathological shear stress. *The Journal of biological chemistry* **268**(5):3520-3524.
- Krugmann S, Jordens I, Gevaert K, Driessens M, Vandekerckhove J and Hall A (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol* **11**(21):1645-1655.
- Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Miyata S and Yoshioka A (1999) Cytosolic calcium changes in a process of platelet adhesion and cohesion on a von Willebrand factor-coated surface under flow conditions. *Blood* **94**(4):1149-1155.
- Kwiatkowski AV, Gertler FB and Loureiro JJ (2003) Function and regulation of Ena/VASP proteins. *Trends Cell Biol* **13**(7):386-392.
- Lebart MC, Mejean C, Casanova D, Audemard E, Derancourt J, Roustan C and Benyamin Y (1994) Characterization of the actin binding site on smooth muscle filamin. *The Journal of biological chemistry* **269**(6):4279-4284.
- Leon C, Eckly A, Hechler B, Aleil B, Freund M, Ravanat C, Jourdain M, Nonne C, Weber J, Tiedt R, Gratacap MP, Severin S, Cazenave JP, Lanza F, Skoda R and Gachet C (2007) Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood* **110**(9):3183-3191.
- Li Z, Kim ES and Bearer EL (2002) Arp2/3 complex is required for actin polymerization during platelet shape change. *Blood* **99**(12):4466-4474.
- Liu J, Fitzgerald ME, Berndt MC, Jackson CW and Gartner TK (2006) Bruton tyrosine kinase is essential for botrocetin/VWF-induced signaling and GPIb-dependent thrombus formation in vivo. *Blood* **108**(8):2596-2603.
- Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V and Berndt MC (1998) Bernard-Soulier syndrome. *Blood* **91**(12):4397-4418.
- Lopez JA, Chung DW, Fujikawa K, Hagen FS, Davie EW and Roth GJ (1988) The alpha and beta chains of human platelet glycoprotein Ib are both transmembrane proteins containing a leucine-rich amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(7):2135-2139.
- Lucas-Lopez C, Allingham JS, Lebl T, Lawson CP, Brenk R, Sellers JR, Rayment I and Westwood NJ (2008) The small molecule tool (S)-(-)-blebbistatin: novel insights of relevance to myosin inhibitor design. *Org Biomol Chem* **6**(12):2076-2084.
- Luo SZ, Mo X, Afshar-Kharghan V, Srinivasan S, Lopez JA and Li R (2007) Glycoprotein Ibalpha forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibbeta subunits in the resting platelet. *Blood* **109**(2):603-609.
- Maltese WA and Sheridan KM (1990) Isoprenoid modification of G25K (Gp), a low molecular mass GTP-binding protein distinct from p21ras. *The Journal of biological chemistry* **265**(29):17883-17890.

- Mangin P, David T, Lavaud V, Cranmer SL, Pikovski I, Jackson SP, Berndt MC, Cazenave JP, Gachet C and Lanza F (2004) Identification of a novel 14-3-3zeta binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ibalpha. *Blood* **104**(2):420-427.
- Mangin P, Yuan Y, Goncalves I, Eckly A, Freund M, Cazenave JP, Gachet C, Jackson SP and Lanza F (2003) Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA. *The Journal of biological chemistry* **278**(35):32880-32891.
- Mangin PH, Receveur N, Wurtz V, David T, Gachet C and Lanza F (2009) Identification of five novel 14-3-3 isoforms interacting with the GPIb-IX complex in Platelets. *J Thromb Haemost*.
- Marx I, Christophe OD, Lenting PJ, Rupin A, Vallez MO, Verbeuren TJ and Denis CV (2008) Altered thrombus formation in von Willebrand factor-deficient mice expressing von Willebrand factor variants with defective binding to collagen or GPIIbIIIa. *Blood* **112**(3):603-609.
- Massberg S, Gruner S, Konrad I, Garcia Arguinzonis MI, Eigenthaler M, Hemler K, Kersting J, Schulz C, Muller I, Besta F, Nieswandt B, Heinzmann U, Walter U and Gawaz M (2004) Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood* **103**(1):136-142.
- Mattila PK and Lappalainen P (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(6):446-454.
- Maxwell MJ, Dopheide SM, Turner SJ and Jackson SP (2006) Shear induces a unique series of morphological changes in translocating platelets: effects of morphology on translocation dynamics. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**(3):663-669.
- Maxwell MJ, Yuan Y, Anderson KE, Hibbs ML, Salem HH and Jackson SP (2004) SHIP1 and Lyn Kinase Negatively Regulate Integrin alpha IIb beta 3 signaling in platelets. *The Journal of biological chemistry* **279**(31):32196-32204.
- May JA, Ratan H, Glenn JR, Losche W, Spangenberg P and Heptinstall S (1998) GPIIb-IIIa antagonists cause rapid disaggregation of platelets pre-treated with cytochalasin D. Evidence that the stability of platelet aggregates depends on normal cytoskeletal assembly. *Platelets* **9**(3-4):227-232.
- Mazzucato M, Pradella P, Cozzi MR, De Marco L and Ruggeri ZM (2002) Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibalpha mechanoreceptor. *Blood* **100**(8):2793-2800.
- McCarty OJ, Larson MK, Auger JM, Kalia N, Atkinson BT, Pearce AC, Ruf S, Henderson RB, Tybulewicz VL, Machesky LM and Watson SP (2005) Rac1 is essential for platelet lamellipodia formation and aggregate stability under flow. *The Journal of biological chemistry* **280**(47):39474-39484.
- McCarty OJ, Zhao Y, Andrew N, Machesky LM, Staunton D, Frampton J and Watson SP (2004) Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion. *J Thromb Haemost* **2**(10):1823-1833.
- Medalia O, Beck M, Ecke M, Weber I, Neujahr R, Baumeister W and Gerisch G (2007) Organization of actin networks in intact filopodia. *Curr Biol* **17**(1):79-84.
- Menche D, Israel A and Karparkin S (1980) Platelets and microtubules. Effect of colchicine and D2O on platelet aggregation and release induced by calcium ionophore A23187. *The Journal of clinical investigation* **66**(2):284-291.
- Miyamoto Y, Yamauchi J and Itoh H (2003) Src kinase regulates the activation of a novel FGD-1-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor in the signaling pathway from the endothelin A receptor to JNK. *The Journal of biological chemistry* **278**(32):29890-29900.
- Mody NA and King MR (2007) Influence of Brownian motion on blood platelet flow behavior and adhesive dynamics near a planar wall. *Langmuir* **23**(11):6321-6328.
- Munday AD, Berndt MC and Mitchell CA (2000) Phosphoinositide 3-kinase forms a complex with platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and 14-3-3zeta. *Blood* **96**(2):577-584.

- Muszbek L and Laposata M (1989) Glycoprotein Ib and glycoprotein IX in human platelets are acylated with palmitic acid through thioester linkages. *The Journal of biological chemistry* **264**(17):9716-9719.
- Nachmias VT (1980) Cytoskeleton of human platelets at rest and after spreading. *J Cell Biol* **86**(3):795-802.
- Nakata T and Hirokawa N (1987) Cytoskeletal reorganization of human platelets after stimulation revealed by the quick-freeze deep-etch technique. *J Cell Biol* **105**(4):1771-1780.
- Natarajan P, May JA, Sanderson HM, Zabe M, Spangenberg P and Heptinstall S (2000) Effects of cytochalasin H, a potent inhibitor of cytoskeletal reorganisation, on platelet function. *Platelets* **11**(8):467-476.
- Nelson MP, Metz AE, Li S, Lowell CA and Steele C (2009) The absence of Hck, Fgr, and Lyn tyrosine kinases augments lung innate immune responses to *Pneumocystis murina*. *Infect Immun* **77**(5):1790-1797.
- Nesbitt WS, Giuliano S, Kulkarni S, Dopheide SM, Harper IS and Jackson SP (2003) Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth. *J Cell Biol* **160**(7):1151-1161.
- Nesbitt WS, Kulkarni S, Giuliano S, Goncalves I, Dopheide SM, Yap CL, Harper IS, Salem HH and Jackson SP (2002) Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha IIb beta 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. *The Journal of biological chemistry* **277**(4):2965-2972.
- Neudauer CL, Joberty G, Tatsis N and Macara IG (1998) Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10. *Curr Biol* **8**(21):1151-1160.
- Nobes CD and Hall A (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**(1):53-62.
- Ohlmann P, Hechler B, Cazenave JP and Gachet C (2004) Measurement and manipulation of  $[Ca^{2+}]_i$  in suspensions of platelets and cell cultures. *Methods Mol Biol* **273**:229-250.
- Ohta Y, Suzuki N, Nakamura S, Hartwig JH and Stossel TP (1999) The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5):2122-2128.
- Pasquet JM, Quek L, Stevens C, Bobe R, Huber M, Duronio V, Krystal G and Watson SP (2000) Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate regulates  $Ca^{2+}$  entry via btk in platelets and megakaryocytes without increasing phospholipase C activity. *Embo J* **19**(12):2793-2802.
- Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, Drabek K, Isaac NA, Hoffmeister K, Shivdasani RA, Bulinski JC, Galjart N, Hartwig JH and Italiano JE, Jr. (2008) Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood* **111**(9):4605-4616.
- Patel SR, Richardson JL, Schulze H, Kahle E, Galjart N, Drabek K, Shivdasani RA, Hartwig JH and Italiano JE, Jr. (2005) Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* **106**(13):4076-4085.
- Pautsch A, Vogelsgesang M, Trankle J, Herrmann C and Aktories K (2005) Crystal structure of the C3bot-RalA complex reveals a novel type of action of a bacterial exoenzyme. *Embo J* **24**(20):3670-3680.
- Pearce AC, McCarty OJ, Calaminus SD, Vigorito E, Turner M and Watson SP (2007) Vav family proteins are required for optimal regulation of PLCgamma2 by integrin alphaIIb beta3. *Biochem J* **401**(3):753-761.
- Pears CJ, Thornber K, Auger JM, Hughes CE, Grygielska B, Protty MB, Pearce AC and Watson SP (2008) Differential roles of the PKC novel isoforms, PKCdelta and PKCepsilon, in mouse and human platelets. *PLoS One* **3**(11):e3793.
- Pellegrin S and Mellor H (2005) The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol* **15**(2):129-133.

- Pendu R, Christophe OD and Denis CV (2009) Mouse models of von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* **7 Suppl 1**:61-64.
- Perrault C, Mangin P, Santer M, Baas MJ, Moog S, Cranmer SL, Pikovski I, Williamson D, Jackson SP, Cazenave JP and Lanza F (2003) Role of the intracellular domains of GPIb in controlling the adhesive properties of the platelet GPIb/V/IX complex. *Blood* **101**(9):3477-3484.
- Perrault C, Moog S, Rubinstein E, Santer M, Baas MJ, de la Salle C, Ravanat C, Dambach J, Freund M, Santoso S, Cazenave JP and Lanza F (2001) A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIIb/IIIa modulates vWF mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost* **86**(5):1238-1248.
- Pleines I, Elvers M, Strehl A, Pozgajova M, Varga-Szabo D, May F, Chrostek-Grashoff A, Brakebusch C and Nieswandt B (2009) Rac1 is essential for phospholipase C-gamma2 activation in platelets. *Pflugers Arch* **457**(5):1173-1185.
- Pula G, Schuh K, Nakayama K, Nakayama KI, Walter U and Poole AW (2006) PKCdelta regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation. *Blood* **108**(13):4035-4044.
- Quek LS, Pasquet JM, Hers I, Cornall R, Knight G, Barnes M, Hibbs ML, Dunn AR, Lowell CA and Watson SP (2000) Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway. *Blood* **96**(13):4246-4253.
- Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH and Italiano JE, Jr. (2005) Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* **106**(13):4066-4075.
- Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC and Lopez JA (1999) The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* **190**(6):803-814.
- Rosner H, Moller W, Wassermann T, Mihatsch J and Blum M (2007) Attenuation of actinomyosinII contractile activity in growth cones accelerates filopodia-guided and microtubule-based neurite elongation. *Brain Res* **1176**:1-10.
- Rosso L, Peteri-Brunback B, Vouret-Craviari V, Deroanne C, Van Obberghen-Schilling E and Mienville JM (2002) Vasopressin and oxytocin reverse adenosine-induced pituicyte stellation via calcium-dependent activation of Cdc42. *Eur J Neurosci* **16**(12):2324-2332.
- Rottner K, Behrendt B, Small JV and Wehland J (1999) VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol* **1**(5):321-322.
- Ruggeri ZM (1997) von Willebrand factor. *J Clin Invest* **100**(11 Suppl):S41-46.
- Ruggeri ZM (2007) The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res* **120 Suppl 1**:S5-9.
- Saras J, Wollberg P and Aspenstrom P (2004) Wrch1 is a GTPase-deficient Cdc42-like protein with unusual binding characteristics and cellular effects. *Exp Cell Res* **299**(2):356-369.
- Sato H, Suzuki-Inoue K, Inoue O and Ozaki Y (2008) Regulation of adaptor protein GIT1 in platelets, leading to the interaction between GIT1 and integrin alpha(IIb)beta3. *Biochem Biophys Res Commun* **368**(1):157-161.
- Savage B, Shattil SJ and Ruggeri ZM (1992) Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *The Journal of biological chemistry* **267**(16):11300-11306.
- Schiller MR (2006) Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases--GEFs what's the link. *Cell Signal* **18**(11):1834-1843.
- Schirenbeck A, Arasada R, Bretschneider T, Schleicher M and Faix J (2005) Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6):1256-1259.

- Schirenbeck A, Arasada R, Bretschneider T, Stradal TE, Schleicher M and Faix J (2006) The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(20):7694-7699.
- Schmidt A and Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**(13):1587-1609.
- Sheth SB and Colman RW (1995) Regulatory and catalytic domains of platelet cAMP phosphodiesterases: targets for drug design. *Semin Hematol* **32**(2):110-119.
- Sigal YJ, Quintero OA, Cheney RE and Morris AJ (2007) Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein. *J Cell Sci* **120**(Pt 2):340-352.
- Sinha S and Yang W (2008) Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. *Cell Signal* **20**(11):1927-1934.
- Soriani A, Moran B, de Virgilio M, Kawakami T, Altman A, Lowell C, Eto K and Shattil SJ (2006) A role for PKC $\theta$  in outside-in  $\alpha$ (IIb) $\beta$ 3 signaling. *J Thromb Haemost* **4**(3):648-655.
- Steffen A, Faix J, Resch GP, Linkner J, Wehland J, Small JV, Rottner K and Stradal TE (2006) Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol Biol Cell* **17**(6):2581-2591.
- Stein PL, Vogel H and Soriano P (1994) Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev* **8**(17):1999-2007.
- Strassel C, David T, Eckly A, Baas MJ, Moog S, Ravanat C, Trzeciak MC, Vinciguerra C, Cazenave JP, Gachet C and Lanza F (2006) Synthesis of GPIb beta with novel transmembrane and cytoplasmic sequences in a Bernard-Soulier patient resulting in GPIb-defective signaling in CHO cells. *J Thromb Haemost* **4**(1):217-228.
- Strassel C, Nonne C, Eckly A, David T, Leon C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C and Lanza F (2007) Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**(1):241-247.
- Sugihara K, Asano S, Tanaka K, Iwamatsu A, Okawa K and Ohta Y (2002) The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation. *Nat Cell Biol* **4**(1):73-78.
- Suzuki-Inoue K, Wilde JJ, Andrews RK, Auger JM, Siraganian RP, Sekiya F, Rhee SG and Watson SP (2004) Glycoproteins VI and Ib-IX-V stimulate tyrosine phosphorylation of tyrosine kinase Syk and phospholipase C $\gamma$ 2 at distinct sites. *The Biochemical journal* **378**(Pt 3):1023-1029.
- Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM and Borisy GG (2003) Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* **160**(3):409-421.
- Tatin F, Varon C, Genot E and Moreau V (2006) A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *J Cell Sci* **119**(Pt 4):769-781.
- Tokuo H and Ikebe M (2004) Myosin X transports Mena/VASP to the tip of filopodia. *Biochem Biophys Res Commun* **319**(1):214-220.
- Tokuo H, Mabuchi K and Ikebe M (2007) The motor activity of myosin-X promotes actin fiber convergence at the cell periphery to initiate filopodia formation. *J Cell Biol* **179**(2):229-238.
- Varga-Szabo D, Braun A and Nieswandt B (2009) Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost* **7**(7):1057-1066.
- Vexler ZS, Symons M and Barber DL (1996) Activation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange is necessary for RhoA-induced stress fiber formation. *The Journal of biological chemistry* **271**(37):22281-22284.
- Vidal C, Geny B, Melle J, Jandrot-Perrus M and Fontenay-Roupie M (2002) Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood* **100**(13):4462-4469.

- Vitale N, Mawet J, Camonis J, Regazzi R, Bader MF and Chasserot-Golaz S (2005) The Small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *The Journal of biological chemistry* **280**(33):29921-29928.
- Watson SP, Auger JM, McCarty OJ and Pearce AC (2005) GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* **3**(8):1752-1762.
- Watson SP and Hambleton S (1989) Phosphorylation-dependent and -independent pathways of platelet aggregation. *Biochem J* **258**(2):479-485.
- Wheeler-Jones CP, Learmonth MP, Martin H and Aitken A (1996) Identification of 14-3-3 proteins in human platelets: effects of synthetic peptides on protein kinase C activation. *Biochem J* **315** (Pt 1):41-47.
- White JG (1968) Effects of colchicine and Vinca alkaloids on human platelets. I. Influence on platelet microtubules and contractile function. *The American journal of pathology* **53**(2):281-291.
- White JG, Krumwiede M and Sauk JJ (1985) Microtubule reassembly in surface-activated platelets. *Blood* **65**(6):1494-1503.
- Wolthuis RM, Franke B, van Triest M, Bauer B, Cool RH, Camonis JH, Akkerman JW and Bos JL (1998) Activation of the small GTPase Ral in platelets. *Mol Cell Biol* **18**(5):2486-2491.
- Wood W and Martin P (2002) Structures in focus--filopodia. *Int J Biochem Cell Biol* **34**(7):726-730.
- Wu X, Quondamatteo F, Lefever T, Czuchra A, Meyer H, Chrostek A, Paus R, Langbein L and Brakebusch C (2006) Cdc42 controls progenitor cell differentiation and beta-catenin turnover in skin. *Genes Dev* **20**(5):571-585.
- Wu Y, Asazuma N, Satoh K, Yatomi Y, Takafuta T, Berndt MC and Ozaki Y (2003) Interaction between von Willebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinase in human platelets: role of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* **101**(9):3469-3476.
- Wu Y, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Asazuma N, Yatomi Y, Berndt MC and Ozaki Y (2001) Role of Fc receptor gamma-chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling. *Blood* **97**(12):3836-3845.
- Xu B, Pelish H, Kirchhausen T and Hammond GB (2006) Large scale synthesis of the Cdc42 inhibitor secramine A and its inhibition of cell spreading. *Org Biomol Chem* **4**(22):4149-4157.
- Xu Y, Harder KW, Huntington ND, Hibbs ML and Tarlinton DM (2005) Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* **22**(1):9-18.
- Yap CL, Anderson KE, Hughan SC, Dopheide SM, Salem HH and Jackson SP (2002) Essential role for phosphoinositide 3-kinase in shear-dependent signaling between platelet glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha(IIb)beta(3). *Blood* **99**(1):151-158.
- Yin H, Liu J, Li Z, Berndt MC, Lowell CA and Du X (2008) Src family tyrosine kinase Lyn mediates VWF/GPIb-IX-induced platelet activation via the cGMP signaling pathway. *Blood* **112**(4):1139-1146.
- Yuan Y, Kulkarni S, Ulsemer P, Cranmer SL, Yap CL, Nesbitt WS, Harper I, Mistry N, Dopheide SM, Hughan SC, Williamson D, de la Salle C, Salem HH, Lanza F and Jackson SP (1999) 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. *The Journal of biological chemistry* **274**(51):36241-36251.
- Zago AC, Simon DI, Wang Y, Sakuma M, Chen Z, Croce K, Ustinov V, Shi C and Martinez Filho EE (2008) The importance of the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet glycoprotein Ib-a for leukocyte recruitment by platelets and for the inflammatory response to vascular injury. *Arq Bras Cardiol* **90**(1):54-63.

## Références Figure 23 :

- 1) Woodring, P. J., J. Meisenhelder, et al. (2004). "c-Abl phosphorylates Dok1 to promote filopodia during cell spreading." *J Cell Biol* **165**(4): 493-503.
- 2) Pula, G., K. Schuh, et al. (2006). "PKCdelta regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation." *Blood* **108**(13): 4035-44.
- 3) Sells, M. A., U. G. Knaus, et al. (1997). "Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells." *Curr Biol* **7**(3): 202-10.
- 4) Dumontier, M., P. Hocht, et al. (2000). "Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in Dictyostelium." *J Cell Sci* **113** ( Pt 12): 2253-65.
- 5) Sugihara, K., S. Asano, et al. (2002). "The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation." *Nat Cell Biol* **4**(1): 73-8.
- 6) Ohta, Y., N. Suzuki, et al. (1999). "The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2122-8.
- 7) Yang, L., L. Wang, et al. (2006). "Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical involvement of Cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts." *Mol Biol Cell* **17**(11): 4675-85.
- 8) Krugmann, S., I. Jordens, et al. (2001). "Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex." *Curr Biol* **11**(21): 1645-55.
- 9) Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." *Cell* **81**(1): 53-62.
- 10) Neudauer, C. L., G. Joberty, et al. (1998). "Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10." *Curr Biol* **8**(21): 1151-60.
- 11) Saras, J., P. Wollberg, et al. (2004). "Wrch1 is a GTPase-deficient Cdc42-like protein with unusual binding characteristics and cellular effects." *Exp Cell Res* **299**(2): 356-69.
- 12) Pellegrin, S. and H. Mellor (2005). "The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2." *Curr Biol* **15**(2): 129-33.
- 13) Gasman, S., Y. Kalaidzidis, et al. (2003). "RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase." *Nat Cell Biol* **5**(3): 195-204.
- 14) Applewhite, D. A., M. Barzik, et al. (2007). "Ena/VASP proteins have an anti-capping independent function in filopodia formation." *Mol Biol Cell* **18**(7): 2579-91.
- 15) Schirenbeck, A., R. Arasada, et al. (2005). "Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6): 1256-9.
- 16) Barzik, M., T. I. Kotova, et al. (2005). "Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins." *J Biol Chem* **280**(31): 28653-62.
- 17) Stradal, T. E., K. Rottner, et al. (2004). "Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins." *Trends Cell Biol* **14**(6): 303-11.
- 18) Nozumi, M., H. Nakagawa, et al. (2003). "Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone." *J Cell Sci* **116**(Pt 2): 239-46.
- 19) Svitkina, T. M., E. A. Bulanova, et al. (2003). "Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network." *J Cell Biol* **160**(3): 409-21.
- 20) Amieva, M. R. and H. Furthmayr (1995). "Subcellular localization of moesin in dynamic filopodia, retraction fibers, and other structures involved in substrate exploration, attachment, and cell-cell contacts." *Exp Cell Res* **219**(1): 180-96.
- 21) Schirenbeck, A., T. Bretschneider, et al. (2005). "The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia." *Nat Cell Biol* **7**(6): 619-25.
- 22) Vignjevic, D., S. Kojima, et al. (2006). "Role of fascin in filopodial protrusion." *J Cell Biol* **174**(6): 863-75.
- 23) Disanza, A., S. Mantoani, et al. (2006). "Regulation of cell shape by Cdc42 is mediated by the synergic actin-bundling activity of the Eps8-IRSp53 complex." *Nat Cell Biol* **8**(12): 1337-47.

- 24)** Yamagishi, A., M. Masuda, et al. (2004). "A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein." J Biol Chem **279**(15): 14929-36.
- 25)** Stradal, T., K. D. Courtney, et al. (2001). "The Abl interactor proteins localize to sites of actin polymerization at the tips of lamellipodia and filopodia." Curr Biol **11**(11): 891-5.
- 26)** Kranewitter, W. J., C. Danninger, et al. (2001). "GEF at work: Vav in protruding filopodia." Cell Motil Cytoskeleton **49**(3): 154-60.
- 27)** Sigal, Y. J., O. A. Quintero, et al. (2007). "Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein." J Cell Sci **120**(Pt 2): 340-52.
- 28)** Bohil, A. B., B. W. Robertson, et al. (2006). "Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12411-6.
- 29)** Tokuo, H. and M. Ikebe (2004). "Myosin X transports Mena/VASP to the tip of filopodia." Biochem Biophys Res Commun **319**(1): 214-20.