



HAL
open science

Rôle fonctionnel du Toll-Like Receptor 4 exprimé par les plaquettes sanguines en tant que cellules inflammatoires de l'immunité

Julien Berthet

► **To cite this version:**

Julien Berthet. Rôle fonctionnel du Toll-Like Receptor 4 exprimé par les plaquettes sanguines en tant que cellules inflammatoires de l'immunité. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2010. Français. NNT : 2010STET007T . tel-00673243

HAL Id: tel-00673243

<https://theses.hal.science/tel-00673243>

Submitted on 23 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE de l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne, Membre de l'Université de Lyon

Pour l'obtention du **DIPLÔME DE DOCTORAT** en Biologie, Médecine, Santé

Présentée et soutenue publiquement le 16 Décembre 2010 par

Julien BERTHET

**RÔLE FONCTIONNEL DU TOLL-LIKE RECEPTOR 4 EXPRIMÉ
PAR LES PLAQUETTES SANGUINES EN TANT QUE CELLULES
INFLAMMATOIRES DE L'IMMUNITÉ**

Les membres du jury :

Dr Martine JANDROT-PERRUS	Rapporteur	INSERM - Université de Paris 7
Pr Bernard PAYRASTRE	Rapporteur	INSERM - Université de Toulouse 3
Pr Françoise DIGNAT-GEORGE	Examineur	INSERM - Université de la Méditerranée
Dr Fabrice COGNASSE	Examineur	Université de Saint-Etienne
Pr Bruno POZZETTO	Président du jury	Université de Saint-Etienne
Pr Olivier GARRAUD	Directeur de thèse	Université de Saint-Etienne

THESE de l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne, Membre de l'Université de Lyon

Pour l'obtention du **DIPLÔME DE DOCTORAT**

Présentée et soutenue publiquement le 16 Décembre 2010 par

Julien BERTHET

**RÔLE FONCTIONNEL DU TOLL-LIKE RECEPTOR 4 EXPRIMÉ
PAR LES PLAQUETTES SANGUINES EN TANT QUE CELLULES
INFLAMMATOIRES DE L'IMMUNITÉ**

Les membres du jury :

Dr Martine JANDROT-PERRUS	Rapporteur	INSERM - Université de Paris 7
Pr Bernard PAYRASTRE	Rapporteur	INSERM - Université de Toulouse 3
Pr Françoise DIGNAT-GEORGE	Examineur	INSERM - Université de la Méditerranée
Dr Fabrice COGNASSE	Examineur	Université de Saint-Etienne
Pr Bruno POZZETTO	Président du jury	Université de Saint-Etienne
Pr Olivier GARRAUD	Directeur de thèse	Université de Saint-Etienne

Remerciements

Je remercie le Docteur Martine JANDROT-PERRUS ainsi que le Professeur Bernard PEYRASTRE de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer cette thèse.

Je tiens à remercier également le Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examineur.

Je remercie le Professeur Bruno POZZETTO, directeur du GIMAP (Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie vivement et sincèrement le Professeur Olivier GARRAUD pour avoir dirigé ma thèse, ainsi que pour sa disponibilité et son écoute mais aussi pour ses capacités à valoriser les travaux.

Je remercie tout particulièrement le Dr Fabrice COGNASSE pour sa présence au quotidien, son écoute, sa réactivité et son encadrement mais aussi sa bonne humeur. Je remercie également le Dr Hind HAMZEH-COGNASSE pour son aide et sa présence au quotidien.

Je souhaite remercier les Docteurs Dominique et Patrick FEVAL ainsi que le Docteur Frédérique BERTHOLON pour m'avoir permis d'enseigner la Physiologie au sein du CIDO (Centre International d'Ostéopathie).

Je remercie vivement l'Établissement Français du Sang Auvergne-Loire pour leur soutien financier ainsi que l'ensemble du personnel que j'ai pu côtoyer durant ces 3 années. Je tiens

aussi à remercier les donneurs de sang qui, en plus de l'importance de leur don, m'ont permis d'effectuer la majeure partie de mes travaux.

Je remercie particulièrement l'ensemble des personnes que j'ai rencontré durant mon parcours associatif associé à cette thèse, notamment les membres et partenaires de l'ASEC-St-Etienne, BioDocs-Lyon, Globule 38, du Réseau national BIOTechno que j'ai eu l'honneur de présider en 2009 et l'équipe de BioVision (et les membres de la Fondation Scientifique de Lyon) ; me permettant une bouffée d'air et surtout une grande ouverture d'esprit durant ce parcours doctoral. Il est toujours très difficile de citer toutes les personnes mais je me dois de nommer en particulier Emy, Elo, Nico, Tony, Simon, Mat', Mél, Flo, Didier, GuiGui, Jean-Phi, ME, Stephy Klaus, Thomas L., Guillaume W, Lydie, Thomas, Karine et tout les autres pour lesquels je m'excuse par avance de ne pas les avoir cités.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du GIMAP mais aussi des autres laboratoires composants la Faculté de Médecine, dont je ne pourrais me permettre la liste complète mais qui se reconnaîtrons. Merci pour cette bonne humeur permanente et pour l'entraide forte entre doctorants que beaucoup ne voient malheureusement pas. J'ai, en tout cas, passé 3 années sympathiques et rencontré des étudiants et doctorants que je n'oublierai pas. Merci à vous. Je n'oublierai ni les Fahd, Nico, Phil, Papa, Amadou, Thibaut, Aurélien, Lara, Olivier D, Olivier J, Yann, Réham, Séverine, Françoise(s), Baboulinet, Amandine M, Guenaelle, Maya et tout les autres que j'ai certainement du oublier et pour lesquels je m'excuse d'avance.

Enfin, je veux remercier de tout mon cœur ma famille parmi lesquels je mettrais aussi mes amis les plus proches, sans qui je ne serais jamais arrivé ici. Merci à ma p'tite mère, mon p'ti père mais aussi mon p'ti frère d'être là. Merci à Birou de m'avoir soutenu, même à distance (quelle idée d'aller en Bretagne !!), j'espère que tu finiras correctement ta thèse et surtout que ton parcours d'après thèse se passera nickel chrome !! Merci à Fab d'avoir toujours su me soutenir moralement et notamment en faisant exprès de perdre à nos nombreuses parties de FIFA (tu faisais exprès hein ??). Je sais que tu ferais n'importe quoi pour me soutenir et j'espère pouvoir te le rendre !! Merci à ma paupinette pour son soutien quotidien, partir de ce

laboratoire va être une grande déchirure, pour des tonnes de raisons mais encore plus par rapport à toi, surtout car je ne pourrais plus passer mes journées à discuter avec toi, que ce soit pour se raconter nos vies ou pour boire une petite goutte de Chartreuse ! C'est aussi grâce à toi si je suis là. Tu es une vraie amie et je ferais tout pour que tu le restes même après mon départ du GIMAP (enfin, si tu le souhaites ;-). Ma didine, toi qui m'a initié au GIMAP mais aussi aux soirées avec paupau, merci d'être là et surtout d'avoir fait ce long déplacement depuis le pays des bucherons ! J'ai déjà remercié de nombreuses personnes de l'asso, mais je ne peux m'empêcher de replacer ici notamment Emy, Nico et Elo qui ont été aussi des amis avant d'être des collègues de l'asso, ainsi que mon Black Bamboo qui a le malheur de me supporter depuis tant d'années.

Enfin, le mot de la fin ira pour celle qui partage ma vie depuis presque 10 mois maintenant et qui me soutient de tout son cœur. Merci Rachel d'avoir illuminé ma vie et de m'avoir aidé à gérer ces derniers mois de thèse qui n'ont pas été les plus faciles. Merci à toi...

Sommaire

RÉSUMÉ	11
INDEX DES ABRÉVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES	17
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	20
SITUATION DU SUJET.....	23
<i>l) Les Plaquettes sanguines.....</i>	<i>24</i>
A. Physiologie plaquettaire.....	24
1. Généralités et thrombopoïèse	24
a. Généralités	24
b. Thrombopoïèse.....	26
2. Les sous-populations de plaquettes	32
3. Morphologie des plaquettes	34
a. La membrane plasmique	34
b. Le cytosquelette.....	36
c. Les organites	37
i. Les granules α	38
ii. Les granules denses.....	39
iii. Les lysosomes.....	39
iv. Les autres organites.....	39
4. Méthode d'obtention de plaquettes pour les études <i>in vitro</i>	40
a. Plasma Riche en Plaquette (PRP).....	40
b. Plaquettes lavées	40
c. Les plaquettes dédiées à la transfusion sanguine.....	41
B. Activation plaquettaire	43
1. Les éléments activateurs des plaquettes.....	43
a. Les agonistes solubles	45
b. Les récepteurs d'adhésion	48
2. L'hémostase.....	49
a. Définition.....	49
b. Le rôle des plaquettes dans l'hémostase	51
3. Physiologie de la plaquette activée	53
a. Adhésion plaquettaire	53
b. Modifications morphologiques	55
c. Agrégation plaquettaire.....	57
C. L'impact de l'activation plaquettaire.....	58
1. Les facteurs solubles plaquettaires	59
a. Un panel diversifié de cytokines/chimiokines et facteurs de croissance	59

b.	ARNm et épissage alternatif : synthèse de novo dans une cellule anucléée	60
c.	Le relargage des facteurs solubles.....	64
d.	Les microvésicules plaquettaires (MVP)	69
2.	Effets indésirables liés aux produits plaquettaires délivrés lors d'une transfusion sanguine	70
D.	Le rôle des plaquettes dans l'immunité et l'inflammation	71
1.	Les interactions entre les plaquettes et les cellules de l'immunité	73
a.	Les plaquettes et le couple CD40/CD40L, lien entre l'immunité innée et adaptative	73
b.	Les autres interactions entre les plaquettes et les cellules de l'immunité.....	74
i.	Plaquettes et lymphocytes.....	74
ii.	Plaquettes et monocytes	78
iii.	Plaquettes et cellules dendritiques.....	79
iv.	Plaquettes et polynucléaires neutrophiles.....	79
2.	Les interactions entre les plaquettes et les agents pathogènes.....	80
a.	Plaquettes et bactéries	81
b.	Plaquettes et virus	85
c.	Plaquettes et parasites	86
II)	<i>Toll-like receptors</i>	88
A.	Introduction	88
B.	Description des différents TLR	89
1.	Structure et ligands des TLR membranaires.....	91
a.	TLR4.....	91
b.	TLR1, TLR2 et TLR6	92
c.	TLR5.....	93
2.	Les TLR intracytoplasmiques, spécifiques des acides nucléiques	93
a.	Structure et ligands	94
i.	TLR3.....	94
ii.	TLR7.....	95
iii.	TLR8.....	95
iv.	TLR9.....	95
b.	Localisation cellulaire	96
C.	Les mécanismes moléculaires de la transduction du signal	96
D.	Les voies de signalisation des TLR.....	98
1.	La voie MyD88-dépendante (figure 23)	99
2.	La voie TRIF-dépendante (figure 24).....	101
E.	Régulation négative de la signalisation TLR	102
F.	Les ligands endogènes.....	104
G.	Les autres PRR.....	105
H.	TLR et apoptose.....	105
I.	Les spécificités du TLR4	106
1.	Les deux voies de signalisation.....	106
2.	Le LPS, un ligand, deux signalisations	108
III)	<i>Les TLR plaquettaires</i>	111

A. Fonctions des TLR plaquettares	111
B. Spécificité du TLR4 plaquettaire	114
C. Fonctionnalités du TLR4 plaquettaire.....	115
1. LPS et ARNm	115
2. L'importance du NFκB plaquettaire	116
OBJECTIF DU TRAVAIL	118
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	120
I) <i>Article I : Altered release of regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein from human, normal platelets: contribution of distinct HIV-1MN gp41 peptides</i>	<i>121</i>
A. But de l'étude.....	121
B. Article publié	122
C. Discussion.....	126
II) <i>Article II: Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways.....</i>	<i>127</i>
A. But de l'étude.....	127
B. Article publié	128
C. Discussion.....	132
III) <i>Article III : Differential platelet TLR4 engagement and subsequent mononuclear cells mobilization after LPS exposure</i>	<i>133</i>
A. But de l'étude.....	133
B. Article en préparation.....	134
C. Discussion.....	166
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	168
ANNEXES.....	178
I) <i>Participation aux activités de recherche du laboratoire.....</i>	<i>179</i>
II) <i>Communications affichées et orales</i>	<i>185</i>
III) <i>Curriculum vitae.....</i>	<i>187</i>
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	191
ABSTRACT	214

Résumé

Les plaquettes sanguines sont des cellules anucléées qui jouent un rôle majeur dans l'hémostase primaire et ont aussi un rôle dans l'inflammation, aujourd'hui bien démontré. Les plaquettes contiennent et sécrètent une grande variété de facteurs solubles, dont des molécules immunomodulatrices, et elles contiennent plusieurs facteurs de transcription exerçant des activités non génomiques, notamment le NFκB.

Parmi les nombreux récepteurs qu'elles expriment à leur surface, les plaquettes expriment les « Toll-Like Receptor » (TLR), récepteurs clés de l'interaction entre l'immunité innée et adaptative. En réponse à un stimulus infectieux, comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram-négative, ligand naturel du TLR4, ou des peptides issus d'une partie de la protéine d'enveloppe du VIH (gp41), les plaquettes vont s'activer de manière différentielle. L'activation plaquettaire est variable en fonction de leur activation par à un stimulus hémostatique (exemple : la thrombine) vs. infectieux (exemple : le LPS) ; le panel de cytokines/chimiokines libéré dans le surnageant plaquettaire semble en fait finement régulé. Afin d'approfondir l'étude de cette régulation, nous avons démontré, dans un premier temps, la présence intra-plaquettaire de la majorité des protéines composant les voies de signalisation du TLR4 eucaryote. Nous avons ensuite montré que ces voies pouvaient être modulées. L'engagement du TLR4 plaquettaire par deux types biochimiques de LPS (smooth vs. rough) entraîne un relargage différentiel des facteurs solubles immunomodulateurs dans le surnageant de culture ; ce surnageant génère une activation différentielle des cellules cibles, comme les cellules mononucléées du sang circulant.

Ces travaux montrent que la réponse inflammatoire plaquettaire est régulée en fonction du stimulus, permettant d'argumenter sur le rôle présumé de sentinelle des plaquettes sanguines humaines. Ainsi, mes travaux s'inscrivent dans la ré-exploration de la fonction inflammatoire des plaquettes sanguines et l'étude du rôle des plaquettes comme cellules de l'immunité innée à composante inflammatoire.

Index des abréviations

ADAMTS13	A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 repeats
ALI	syndrome respiratoire aigu
ATBF	African Tick Bite Fever
CAR	Coxsackie-Adenovirus Receptor
CEI	cellules épithéliales intestinales
CLEC-2	C-type lectin-like protein-2
COAT	Collagen And Thrombine activated platelets
COX-2	cyclooxygénase-2
cPLA2	PhosphoLipaseA2
CR2	récepteur au complément de type II
CSH	cellule souche hématopoïétique
DC	cellule dendritique
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DD	Death Domain
DMS	système membranaire de démarcation
dsRNA	ARN double brin
ECC	Complexe Cœur Exocytique
EGF	Epidermal growth factor
EP3	Recepteur à la prostaglandine E2
EPO	ErythroPOïétine
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FGF	Fibroblast Growth Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GP	glycoprotéine
HLA	Human leukocyte antigen
HMGB1	High-mobility Group Protein B1
HNA	human nuclear antigen
Hsp	Heat-Shock Protein
Ig	Immunoglobuline
IKK	I κ B kinase
IRAK	IL-1 Receptor-Associated Kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motifs
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KO	Knock-Out
LPS	lipopolysaccharide
LRR	Leucine-Rich Repeat
LTA	acide lipoteichoïque
Ly.B	Lymphocyte B
Ly.T	Lymphocyte T

Ly.Tc	lymphocyte T cytotoxique
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MCPS	mélange de concentrés de plaquettes standard
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
MK	mégacaryocytes
MVP	microvésicules plaquettaires
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NAP2	Neutrophil-Activating Protein-2
NET	Neutrophil Extracellular Tras
NF κ B	nuclear factor- <i>kappa B</i>
NK	natural killer
NLR	Nod-like Receptor
NSF	N-ethylmaleimide-Sensitive Factor
OCS	Open Canalicular System
PAF	Platelet-Activating Factor
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAR	Protease-Activated Receptor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBP	Platelet basic protein
pDC	cellules dendritiques plasmacytoïdes
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PEM	précurseur des érythrocytes et MK
PF4	Platelet Factor 4
PGI2	ProstaGlandine I ₂
PGM	précurseur des granulocytes et des monocytes
PGN	peptidoglycane
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PK	kinocidines plaquettaires
PKC	Protein Kinase C
PKG	Protein Kinase G
PMN	polynucléaires neutrophiles
PMP	Protéines Microbicides Plaquettaires
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
PRR	Pattern-Recognition Receptor
PS	phosphatidylsérine
PSL	Produits Sanguins Labiles
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RIP1	Receptor-Interacting Protein 1
RLR	Rig-I-Like Receptor
RP105	RadioProtective 105
SCF	Stem Cell Factor

SCIP	Sustained Calcium-Induced Platelet morphology
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SIGIRR	Single ImmunoGlobulin IL-1R-Related molecule
SIPA	Shear-Induced Platelet Aggregation
SNARE	Soluble NSF Attachment Protein Receptor
SSP	solutés de suspension des plaquettes
ssRNA	ARN simple-brin
ST2L	IL1R1
TAB	TAK1 Binding protein
TAK	Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1
TANK	TRAF family member-Associated NF κ B activator
TBK	TANK Binding Kinase
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGF β	Transforming Growth Factor- β
TIR	Toll-Interleukin-1 Recepto
TIRAP	IR domain containing Adaptor Protein
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNK	tyrosine kinase nonreceptor
TP	recepteur au TxA ₂
TPO	thrombopoïétine
TRADD	TNK Receptor type I-Associated Death Domain protein
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TRAIL	TNF-related-apoptosis-inducing-ligand
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
T-reg	Lymphocyte T-regulator
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TxA ₂	Thromboxane A ₂
uPAR	urokinase Plasminogen Activator Receptor
VAMP	Vesicle-Associated Membrane Protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	facteur von Willebrand
β -TG	β -thromboglobuline

Liste des Figures

<u>Figure 01 : Structure plaquettaire observée en microscopie électronique à balayage</u>	25
<u>Figure 02 : Représentation schématique de la thrombopoïèse</u>	27
<u>Figure 03 : Formation de pro-plaquettes à partir de mégacaryocytes murins en culture, observée en microscopie électronique à balayage</u>	28
<u>Figure 04 : les pro-plaquettes formées vont libérer les plaquettes directement dans la circulation sanguine</u>	30
<u>Figure 05 : Mouvement des rafts lipidiques après activation plaquettaire</u>	36
<u>Figure 06 : Cytosquelette d'actine plaquettaire au repos observé en microscopie électronique à balayage</u>	37
<u>Figure 07 : Schéma global de l'activation plaquettaire</u>	44
<u>Figure 08 : Effet de la thrombine sur son récepteur PAR-1</u>	46
<u>Figure 08 : représentation schématique de l'hémostase</u>	51
<u>Figure 09 : Rôle de la GPIIb/IIIa dans l'activation plaquettaire</u>	49
<u>Figure 11 : Adhésion plaquettaire primaire</u>	55
<u>Figure 12 : Changement morphologique des plaquettes après activation, observé en microscopie électronique à balayage (A et B) ou à transmission (C et D)</u>	56
<u>Figure 13 : Cytosquelette d'actine de plaquettes activées, observé au microscope électronique à transmission</u>	57
<u>Figure 14 : Schéma de la traduction <i>de novo</i> plaquettaire</u>	62
<u>Figure 15 : Schéma de mécanisme de fusion des granules à la membrane, implication des protéines SNARE</u>	65
<u>Figure 16 : La fusion de membranes lors de la sécrétion du contenu des granules</u>	66
<u>Figure 17 : Observation de l'OCS</u>	68
<u>Figure 18 : Les plaquettes sont au centre de l'immunité</u>	72
<u>Figure 19 : Impact des plaquettes sur la physiologie lymphocytaire</u>	75

<u>Figure 20: Vue d'ensemble de récepteurs plaquettaires impliqués dans les interactions plaquettes-virus.....</u>	86
<u>Figure 21 : Les TLR membranaires, leurs ligands et les voies de signalisation</u>	93
<u>Figure 22 : Les TLR intracellulaires, leurs ligands et les voies de signalisation.....</u>	95
<u>Figure 23 : Engagement des TLR et voie de signalisation MyD88-dépendante</u>	101
<u>Figure 24 : Engagement des TLR et voie de signalisation de la voie TRIF-dépendante</u>	103
<u>Figure 25 : Structure d'un dimère de TLR4.....</u>	108
<u>Figure 26 : les différents types de LPS lisses et rugueux</u>	110
<u>Figure 27 : les voies de signalisation du TLR4</u>	111
<u>Tableau 01: Interactions connues entre agents bactériens et plaquettes sanguines</u>	84
<u>Tableau 02 : panel des ligands des TLR humain.....</u>	91

Introduction générale

Les plaquettes sanguines sont de petits éléments anucléés issus de la fragmentation des mégacaryocytes. Primordiales à la réparation vasculaire et au maintien de l'hémostase, la morphologie des plaquettes repose sur un cytosquelette dense mais aussi sur la présence de granules dont le contenu peut être libéré dans l'environnement plaquettaire. Les plaquettes expriment de nombreuses intégrines et récepteurs aux cytokines/chimiokines impliqués dans l'interaction plaquettaire avec son environnement, en particulier les cellules endothéliales mais aussi les cellules de l'immunité venues sur le site de la brèche. La présence en quantité importante, sur la membrane et à l'intérieur des granules, de cytokines, chimiokines, facteurs de croissance permet aux plaquettes de pouvoir influencer de manière conséquente l'environnement cellulaire et moléculaire.

Une activation plaquettaire va provoquer un réarrangement du cytosquelette, une modification de la morphologie avec l'extension de pseudopodes, une dégranulation, une agrégation homotypique voire une adhésion à l'endothélium. Cette activation peut engendrer une inflammation locale par la libération du contenu granulaire. Cependant, de nombreux éléments peuvent activer les plaquettes, pouvant alors mener à un changement de physiologie particulier avec seulement une dégranulation ou une adhésion. Parmi les stimuli activant de manière alternative les plaquettes on retrouve le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram-négative, dont le récepteur, le TLR4, est présent à la surface des plaquettes sanguines humaines.

Le TLR4 appartient à la famille des PRR (Pattern Recognition Receptor), dont les ligands sont des éléments conservés par les pathogènes, par exemples des molécules composant la paroi bactérienne ou des acides nucléiques des pathogènes. Le TLR4 est particulier car il permet, lorsqu'il est exprimé par une cellule eucaryote, et après fixation du LPS, d'activer deux voies de signalisation différentes dont l'orientation initiale se fait par la fixation de protéines adaptatrices (MyD88 et TRIF) et menant à l'induction de facteur de transcription cellulaire pouvant activer la production de cytokines pro-inflammatoires et/ou d'interféron de type I.

La mise en évidence de l'expression des TLR plaquettaires est assez récente et leur fonction n'est pas totalement élucidée. Plusieurs travaux montrent que ces TLR sont fonctionnels, menant à une activation plaquettaire alternative, pouvant même agir au niveau de l'épissage d'ARN-messager plaquettaire. La ré-exploration du rôle plaquettaire dans l'immunité est à mettre en parallèle aux fonctions des récepteurs TLR, qui sont des éléments

important de l'interaction entre immunité innée et adaptative ; au même titre que le facteur immunomodulateur CD40L plaquettaire, déjà bien documenté.

La présence de TLR à la surface des plaquettes a donc amené de nombreuses questions auxquelles nous essayons de répondre dans ce manuscrit. La majorité de ces questions repose sur la capacité de ces cellules anucléées à répondre de manière régulée à des stimuli complexes engageant la voie des TLR.

Situation du sujet

I) Les Plaquettes sanguines

A. *Physiologie plaquettaire*

1. Généralités et thrombopoïèse

a. *Généralités*

Les plaquettes sont des éléments sanguins qui, après une durée de vie de huit à dix jours, sont dégradés dans la rate. Elles sont formées dans la moelle osseuse par la fragmentation des mégacaryocytes (MK) en petits éléments. Les plaquettes sont dépourvues de noyau et elles ne possèdent pas d'ADN nucléaire. Cependant, les plaquettes possèdent des mitochondries, on note donc la présence d'ADN mitochondrial. Néanmoins, il a été démontré que les plaquettes contenaient des pré-ARNm capables d'être traduits, dans certaines conditions, par le spliceosome [1],[2]. Leur cytoplasme contient ainsi (figure 1) [3]:

- Des organites : mitochondries, lysosomes (glycosidases, protéases et protéines cationiques), cytosquelette (actine et tubulines α et β).
- Des granulations dites « alpha » qui comprennent :
 - des molécules d'adhésion dont le CD62P, le facteur von Willebrand (vWF), la glycoprotéine IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) ;
 - des facteurs mitogéniques dont le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ;
 - Le TGF- β (Transforming Growth Factor- β), qui influence négativement la croissance cellulaire ;
 - des facteurs de coagulation dont le fibrinogène, le plasminogène, les facteurs V, VII et XI ;

- des protéases inhibitrices dont le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) et l'inhibiteur de C1 (système du complément).
- Des granulations dites « denses » reliées à la membrane et à la surface de la cellule par le système canaliculaire ouvert (Open Canalicular System, OCS). Elles contiennent des nucléotides (dont l'ADP), des ions (dont le calcium) et des amines (dont la sérotonine et l'histamine).

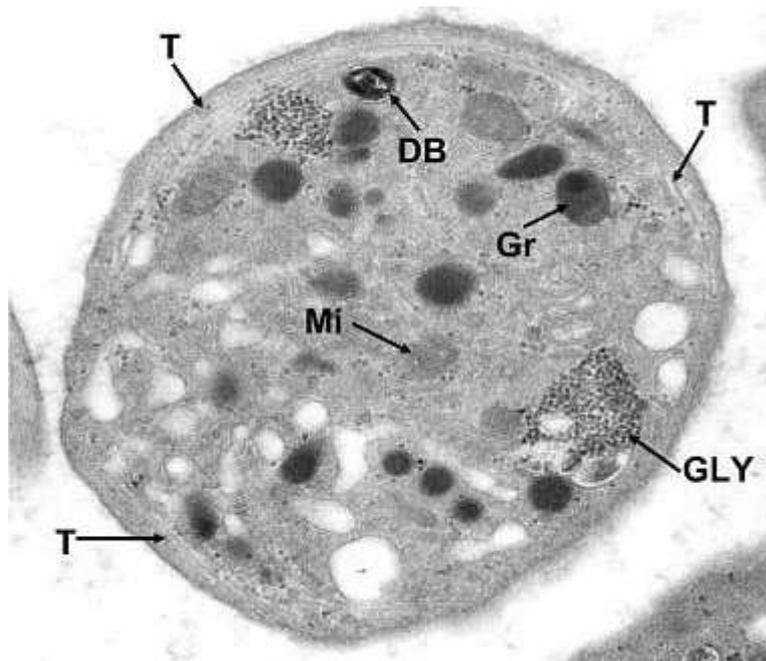


Figure 01 : Structure plaquettaire observée en microscopie électronique à transmission (MET)

(T)= microtubules, (Gr)= granules α , (DB)= granules denses,
(Mi)= Mitochondries, (Gly)= glycogène

De White et Krumwiede [4]

Sur cette image en MET, on distingue clairement la composition granulaire des plaquettes mais aussi les anneaux de tubuline permettant le maintien de la structure.

Le rôle fondamental des plaquettes est de colmater les microbrèches vasculaires dans tout le maillage du système circulatoire (100 km de vaisseaux et 100 000 km de capillaires) et d'en assurer la continuité et l'intégralité. En cas de microtraumatisme ou de blessure vasculaire, il se met en place un colmatage par constitution du clou plaquettaire puis du thrombus.

Néanmoins, depuis environ une quarantaine d'années, les plaquettes sont aussi décrites pour être associées aux réponses immunitaires avec une implication reconnue dans la défense immunitaire et l'inflammation ; si la participation des plaquettes aux mécanismes de défense immunitaire innée et surtout inflammatoires est reconnue de longue date, celui de régulateur possible de l'immunité adaptative est de description plus récente [5],[6],[7]. Par conséquent, les plaquettes font partie intégrante du système immunitaire [8]. En effet, elles participent à l'immunité en libérant une panoplie de médiateurs inflammatoires (IL-1 β , RANTES (Regulated upon Activation Normal T cells Expressed and Secreted), PDGF) sous l'effet d'un agoniste, tel que la thrombine. Elles peuvent aussi agir en tant que cellules effectrices en interagissant directement avec des bactéries, virus, champignons et protozoaires et libérer des protéines antimicrobiennes afin de limiter l'infection [9],[10].

b. Thrombopoïèse

La première observation de la thrombopoïèse remonte à 1906. Wright observait un détachement de fragments ressemblant à des plaques ou des segments de pseudopodes provenant des mégacaryocytes (MK) [11]. La thrombopoïèse s'effectue au niveau de la moelle osseuse. Elle se déroule en plusieurs étapes mettant tour à tour en scène des divisions, des maturations cytoplasmiques et des différenciations cellulaires (figure 2).

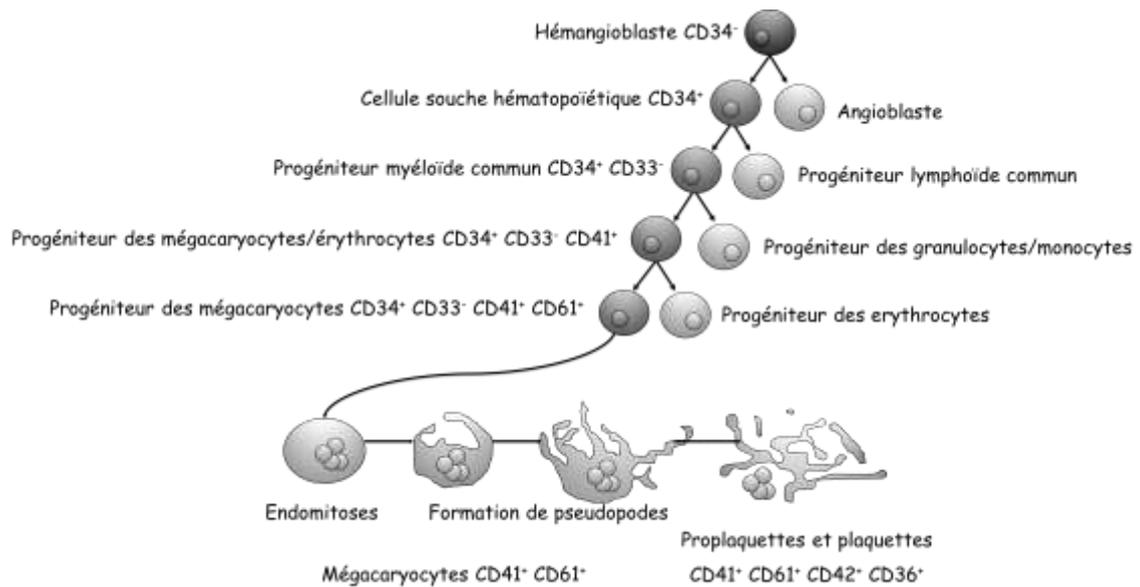


Figure 02 : Représentation schématique de la thrombopoïèse

D'après Deutsch et Tomer [12]

Les plaquettes sont issues des MK après plusieurs étapes de différenciation représentées ici et caractérisant la thrombopoïèse.

Comme toute cellule différenciée, la plaquette dérive d'une cellule souche totipotente, l'hémangioblaste CD34⁻, précurseur de toutes les cellules sanguines [12]. L'hémangioblaste se différencie ensuite en cellule multipotente : la cellule souche hématopoïétique (CSH) CD34⁺, qui se différencie à son tour en progéniteur myéloïde commun CD34⁺ CD33⁻. Cet ensemble donne naissance aux précurseurs des granulocytes et monocytes CD34⁺ CD33⁺ CD13⁺ CD15⁺ et aux précurseurs des érythrocytes et MK CD34⁺ CD33⁻ CD41⁺. Ce paradigme est actuellement « challengé » par des travaux récents portant sur les étapes de filiation monocyttaire et lymphocytaire ainsi que sur l'origine des cellules dendritiques (DC), mais ne remettent pas en cause le lignage des MK [13]. Cette différenciation en précurseurs de chaque lignée est orchestrée par des signaux moléculaires tels que le SCF (Stem Cell Factor) et l'IL-3, contrôlés par des facteurs de transcription: PU.1 qui régule la différenciation en précurseurs des granulocytes et monocytes (PGM) tandis que GATA-1 régule celle des érythrocytes et MK (PEM) [14].



Figure 03 : Formation de pro-plaquettes à partir de mégacaryocytes murins en culture, observée en microscopie électronique à balayage

De Italiano *et al.* [11]

Cette image montre la formation de pro-plaquette (flèche blanche) à partir de MK murins in vitro. Les pro-plaquettes sont formées au bout des extensions.

En réponse aux facteurs environnementaux et cytokiniques (GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor), IL-3, IL-6, IL-11, thrombopoïétine (TPO)), les PEM se différencient en mégacaryoblastes $CD34^+ CD33^- CD41^+ CD61^+$, précurseurs des MK, et en précurseurs des érythrocytes [15]. Les mégacaryoblastes, sous l'influence de la TPO et de l'IL-6, subissent plusieurs cycles de réplication de leur ADN et de maturation de leur cytoplasme. Cette endomitose permet au mégacaryoblaste de devenir une cellule mégacaryocytaire thrombocyto-gène, qui mesure alors de 50 à 100 μm de diamètre et dont le noyau peut avoir une ploïdie supérieure à 128N [16],[17]. À la suite des endomitoses, le noyau va alors se condenser avant d'être éliminé par caryopinocytose, qui correspond à la vésiculation des différents fragments nucléaires puis à leur dégradation par les lysosomes. Les progéniteurs mégacaryocytaires sont caractérisés par leurs marqueurs de surface, permettant de différencier l'état de maturation. Le CD41 (GPIIb) et le CD61 (GPIIIa) sont des marqueurs très spécifiques des MK et des plaquettes. Ils sont les premiers marqueurs plaquettaires à apparaître au cours de la thrombopoïèse. D'autres marqueurs vont ensuite être exprimés tel que le CD42 (GPIb) ou le CD36 (GPIV). Dès lors, les pro-plaquettes, extensions membranaires des MK (de cinq à sept dans les MK), vont être formées à partir d'une seule zone à la surface du mégacaryocyte. L'existence des pro-plaquettes a été montrée à la fois dans le modèle murin [11],[18],[19] ainsi que chez l'homme [20] (figure 3). La fragmentation des pro-plaquettes se situe au niveau de la

circulation sanguine, donnant alors naissance à jusqu'à 5000 plaquettes par MK [21] (figure 4). Les plaquettes sont alors libérées dans le flux sanguin afin qu'elles puissent remplir leur rôle fondamental hémostatique [11]. Les MK sont situés dans la moelle osseuse. Lorsqu'ils mûrissent, ils migrent dans la région sous-endothéliale, proche des sinusoides veineux. Les pro-plaquettes peuvent traverser la barrière endothéliale et entrer dans les vaisseaux sanguins. Cette migration est notamment provoquée par un gradient de SDF-1 (stromal cell-derived factor-1). Des images *in vivo* ont montré que les plaquettes peuvent être séparées à partir des extensions des pro-plaquettes directement dans les vaisseaux sanguins [22]. De larges pro-plaquettes peuvent aussi être relarguées dans la circulation sanguine où elles peuvent alors former des plaquettes par fragmentation. Il a aussi été observé que certains MK matures migrent à travers la barrière endothéliale et sont alors présents en nombre significatif dans de petits vaisseaux pulmonaires. Ils sont alors capturés par les capillaires pulmonaires, et libèrent des plaquettes par fragmentation [23].

Ces mécanismes sont finement régulés grâce au cytosquelette des MK ainsi qu'à différents facteurs solubles. En effet, la formation des pro-plaquettes est guidée par l'élongation de microtubules, la β 1-tubuline étant un composant majeur du cytosquelette des pro-plaquettes mais aussi des plaquettes matures. Cependant, la formation de pro-plaquettes nécessite aussi l'action de filaments d'actine et surtout du système membranaire de démarcation (DMS), réseau élaboré de canaux membranaires composés de tubuline. Ce système d'invagination membranaire est un système semblable à celui que l'on retrouve dans les plaquettes matures, le système canaliculaire ouvert (OCS) [24]. Avant la formation des pro-plaquettes, le DMS s'associe avec les microtubules et les filaments d'actines [25]. La polymérisation des molécules de tubuline est initialement nécessaire, et l'enchevêtrement des microtubules est un moteur primaire dans l'élongation des pro-plaquettes [26]. Pendant l'élongation des pro-plaquettes, cet enchevêtrement de microtubules permet d'aligner le réseau de pro-plaquettes en formation en formant une boucle aux extrémités libres de l'extension pour revenir dans le réseau [27]. Le rôle des filaments d'actine n'est pas encore complètement élucidé. Il semble acquis que ces filaments servent moins à l'élongation qu'à la ramification des pro-plaquettes, et donc participent à la régulation de la production plaquettaire [28].

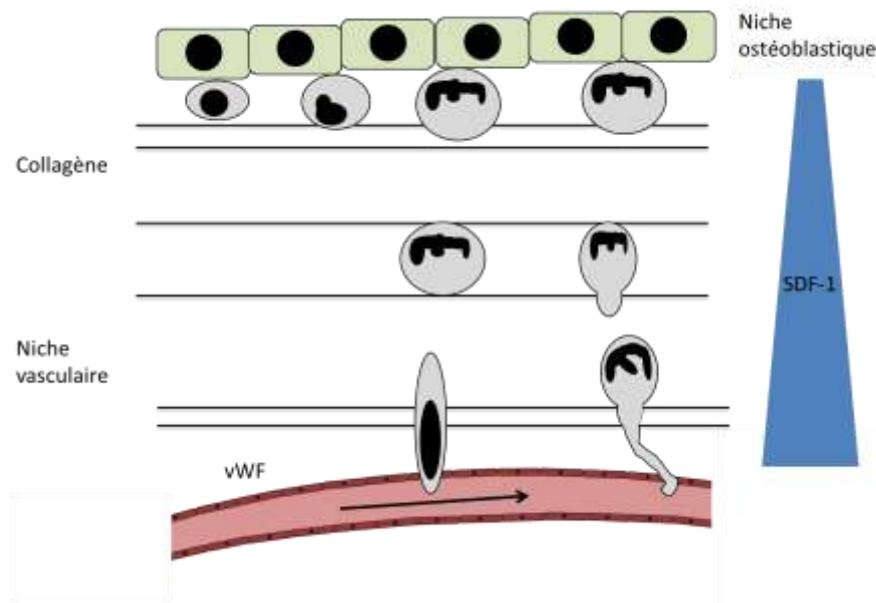


Figure 04 : Schéma de la migration des MK menant à la production des plaquettes sanguines

D'après Bluteau *et al.* [21]

Les MK migrent des niches ostéoblastiques jusqu'à la circulation où ils étendent des prolongements, les pro-plaquettes, qui vont libérer les plaquettes directement dans la circulation sanguine. Ces phénomènes sont régulés, notamment par un gradient de SDF-1.

Ce réseau cytosquelettique va être utilisé pour organiser les organelles dans les pro-plaquettes. En effet, les extensions des pro-plaquettes sont riches en microtubules qui vont transporter les organelles et ainsi les distribuer. Ce transport est très caractéristique car il s'effectue de manière bi-directionnelle et plus lentement que le transport « classique » microtubulaire. Ces caractéristiques rendent compte de la répartition la plus égale possible des organelles au sein des pro-plaquettes puis des plaquettes matures au repos [27].

Ces différentes étapes sont finement régulées, que ce soit au niveau extracellulaire comme moléculaire. La TPO, même si elle n'est pas indispensable, reste la principale « hormone » régulant la différenciation des MK [21]. D'autres facteurs entrent en jeu comme l'IL-3, l'IL-6, l'IL-11, le FGF (Fibroblast Growth Factor) et l'EPO (ErythroPOïétine), mais le rôle de chacune de ces molécules reste encore relativement imprécis [21]. Le SDF-1 est une chimiokine de type CXC dont le récepteur principal est le CXCR4 (un des co-récepteurs du VIH). Cette

chimiokine est synthétisée par les cellules stromales de la moelle osseuse, les cellules endothéliales, les cellules dendritiques mais aussi les MK et les plaquettes [29]. De nombreuses études montrent un rôle direct du couple SDF-1/CXCR4 dans la différenciation des MK, notamment en induisant la polyploïdisation et la formation des pro-plaquettes (figure 4) [30]. A *contrario*, certains facteurs ont un rôle d'inhibiteur sur la mégacaryocytopoïèse tels que le TGF- β 1, le PF4 (Platelet Factor 4) et l'IL-4 [12],[31]. L'interféron α a aussi un rôle inhibiteur principalement en agissant sur la synthèse de GATA1, facteur de transcription nucléaire primordial à la mégacaryocytopoïèse [14]. Enfin, le PF4 semble aussi être un régulateur négatif autocrine de la production plaquettaire [32]. De plus, l'impact de la matrice extracellulaire sur ces phénomènes est important : quand le MK commence à migrer à travers l'endothélium, il interagit avec les composants de la matrice extracellulaire, comme le fibrinogène ou le vWF, ce qui a pour conséquence d'accélérer la formation de pro-plaquettes [33]. La régulation de ces stades finaux est en grande partie réalisée par les intégrines GPIa/IIa, GPIIb/IIIa et GPIb, même si le mécanisme précis n'est pas encore connu [32].

Il est intéressant de noter que la formation des pro-plaquettes est la phase terminale du cycle de vie du MK, cette formation ayant des homologies avec la mort cellulaire programmée à plusieurs niveaux [34]. En effet, l'activation de la machinerie apoptotique (impliquant notamment les caspases) est nécessaire aux MK afin de former les pro-plaquettes. De plus, l'induction d'une apoptose des MK par le NO provoque une forte augmentation de la libération de plaquettes. Cependant, malgré le rôle important des caspases dans la thrombopoïèse, ce phénomène est différent de l'apoptose puisqu'il finit par la fragmentation des pro-plaquettes en plaquettes qui sont vivantes possédant des mitochondries, des protéines et des ARNm fonctionnels [35]. Après le relargage des plaquettes, le noyau du MK, son enveloppe, et le cytoplasme adjacent restent dans la moelle osseuse pour y être phagocytés par les macrophages.

Récemment, une étude de l'équipe de Zimmerman et Weyrich à Salt Lake City a montré que les plaquettes ne seraient peut-être pas le stade ultime de différenciation. En effet, lorsqu'elles sont mises en cultures elles peuvent produire de nouveaux corps cellulaires chargés en mitochondries et en granules. Cette observation est aussi possible avec des plaquettes cultivées en sang total. Après 6h de culture, ils observent qu'environ 5% des plaquettes, de

taille inférieure aux MK (<4µm) possèdent des projections qui ressemblent fortement aux projections des pro-plaquettes [36].

Contrairement aux cellules nucléées, les plaquettes ne se séparent pas en deux cellules filles mais elles produisent des structures étendues avec plusieurs corps cellulaires qui contiennent leurs propres organelles, un cytosquelette et d'autres composants cellulaires. Les plaquettes nouvellement formées sont capables d'adhérer aux surfaces, de s'étendre, de répliquer leur ADN mitochondrial et de répondre à une stimulation par un agoniste en exprimant des marqueurs d'activation à sa surface [36]. L'utilité de ces divisions reste encore indéterminée mais les plaquettes nouvellement formées semblent réagir de façon différente aux stimuli (observation reportée par A. Weyrich).

2. Les sous-populations de plaquettes

La durée de vie des plaquettes humaines est de 8 à 10 jours dans la circulation sanguine. L'élimination des plaquettes âgées s'effectue par phagocytose, grâce aux macrophages de la rate. On compte, à l'homéostasie, 130000 à 400000 plaquettes par microlitre de sang.

De nombreuses études mettent en évidence différentes populations de plaquettes, en observant notamment leurs réponses *in vitro* ou *ex vivo* face à des agonistes hétérogènes. C'est en 1965 que, pour la première fois, une équipe a émis cette hypothèse, en voyant des différences morphologiques entre 2 populations en réponse à un stress osmotique [37]. Behnke, au milieu des années 90 montre pour la première fois des différences biochimiques entre plusieurs sous-populations bien distinctes [38]. Il observe que la différence d'activité de phosphatase/phosphotyrosine au sein des plaquettes en rend certaines d'avantage réactives que d'autres à la stimulation. Par la suite, en 1998, la co-stimulation des plaquettes par la thrombine et le collagène a permis de différencier deux populations de plaquettes, observation faite grâce à la mesure de la quantité de phosphatidylsérine (PS) à la surface cellulaire [39]. En isolant les plaquettes exprimant de la PS, il a été montré, là encore, que certaines ont des niveaux plus faibles de phosphorylation (rapport d'1/2). En 2003, Patel *et al.* décrivent par vidéomicroscopie une population de plaquettes qu'ils nomment « vanguard », pour leur

capacité à se fixer les premières à la matrice de collagène, probablement grâce à une activation de la GPIIb/IIIa [40]. Ces plaquettes servent alors de point d'ancrage pour l'adhésion et l'accumulation des autres plaquettes.

La sous-population la plus étudiée a été observée par l'équipe de GL Dale à Oklahoma en 2000 en reprenant le principe de la double stimulation par la thrombine et le collagène [41]. Cette double stimulation a permis d'observer une sous-population de plaquettes sur-exprimant à leur surface le Facteur V (FV) des granules α , originellement nommée COAT-FV (COLLAGEN AND Thrombine activated platelets with FV), et représentant environ 30% de la population totale de plaquettes. Plusieurs études permettent de voir que les agonistes peuvent être autres que le collagène et la thrombine (Convulxin, Ionophore A23187) [41],[42].

Deux ans plus tard, l'équipe de GL Dale a montré que cette sous-population plaquettaire n'est pas seulement différente en termes de fixation du FV et en exposition de PS, mais qu'on observe une surexpression de plusieurs protéines des granules α , comme le fibrinogène, le vWF, la thrombospondine, l'antiplasmine α_2 et la fibronectine [42]. Cette même équipe propose alors de changer le nom en plaquettes COAT, montrant ainsi que cette sous-population n'est pas restreinte au FV. Ces plaquettes sont alors décrites pour retenir les protéines des granules α avec une affinité exceptionnelle. Ces conditions particulières stabilisent les complexes de fixations en surface et donc rendent ces plaquettes plus adhérentes.

Dans une revue de 2005, GL Dale propose une nomenclature plus universelle, en les nommant plaquettes « coated », faisant référence à leur grande capacité de fixation des protéines pro-coagulantes à la surface de ces plaquettes [43]. En parallèle, le groupe de Jackson en Australie a étudié une autre population de plaquettes, très adhérentes au collagène, qu'ils ont nommé « SCIP » (Sustained Calcium-Induced Platelet morphology) [44]. Ces plaquettes expriment des caractéristiques proches des plaquettes « coated ». En effet, elles ont une capacité de fixation au collagène fortement augmentée et sont plus réactives à la stimulation.

Aujourd'hui, le rôle physiologique *in vivo* des plaquettes « coated » n'est pas vraiment connu. Toutes ces plaquettes sont identiques au repos et c'est seulement lors d'une stimulation que l'on peut observer les différences caractéristiques de sous-populations. La raison pour laquelle une petite fraction de plaquettes seulement va évoluer en plaquettes « coated » n'est pas encore connue. Il semble qu'il y ait une préférence pour les plaquettes « jeunes » (moins de

4 jours), mais ce n'est pas la seule explication [41]. L'observation d'une baisse de phosphotyrosine est une autre hypothèse mais, là encore, non suffisante [39]. Il est intéressant de noter que le pourcentage de plaquettes « coated » varie énormément suivant les prélèvements, de 15 à 55% pour une moyenne de 33% +/- 9% (1 SD), mais reste stable pour un même sujet testé [43]. Les différences physiologiques membranaires peuvent suggérer un rôle important de ces plaquettes, notamment dans les premiers stades de l'hémostase.

La description de plusieurs sous-populations de plaquettes montre qu'il reste beaucoup à investiguer sur ce sujet. Ces diverses études sont effectuées avec un objectif d'étude du rôle hémostatique des plaquettes mais peu de travaux sont faits sur ces diverses populations pour l'étude de leurs effets immunologiques et inflammatoires. L'explication retenue par GL Dale est que ces plaquettes « coated » résultent de la nature « tout ou rien » des plaquettes. En effet, lors de co-stimulation thrombine/collagène, ils observent bien 2 populations très distinctes en termes d'expression de FV, et surtout sans population intermédiaire. Il semble important de comprendre quel mécanisme est impliqué dans ce « tout ou rien » et surtout si les plaquettes réagissent de cette manière en permanence ou si ce n'est que lors de certaines conditions, comme l'exemple de la co-stimulation (thrombine et collagène) observée précédemment.

3. Morphologie des plaquettes

a. La membrane plasmique

Les plaquettes ont une forme discoïde de 2 à 4 μm de diamètre pour un volume de 6 à 8 μm^3 . La bicouche lipidique constituant la membrane plasmique plaquettaire est riche en cholestérol libre et en lipides neutres augmentant la rigidité et la stabilité de la membrane. De plus, les membranes plasmiques plaquettaires ont une quantité très élevée de glycoprotéines, fortement impliquées dans les interactions cellule-cellule, la détection de molécules extracytoplasmique mais aussi la transduction du signal. La plasticité de la membrane plasmique est essentielle pour les mécanismes de transduction du signal mais aussi lors des différentes réponses physiologiques plaquettaires telles que le changement de conformation, l'étirement,

la sécrétion, l'agrégation et la formation du clou plaquettaire [45]. Comme pour les cellules eucaryotes, ces glycoprotéines sont regroupées dans des rafts lipidiques permettant une centralisation de ces molécules membranaires ou transmembranaires et une meilleure signalisation. De plus, les rafts sont caractérisés par une quantité élevée de glycosphingolipides, de phospholipides isolés ainsi qu'une concentration plus élevée en cholestérol comparé au reste de la membrane lipidique [45]. Plusieurs protéines de signalisation associées à la membrane, notamment les tyrosine-kinases de la famille Src, les sous-unités $G\alpha$ de protéines hétérotrimeriques des protéines G ainsi que la protéine adaptatrice LAT, ont été localisées dans les rafts lipidiques. Certaines de ces protéines ont une affinité faible pour les rafts mais cette affinité peut augmenter après activation (par « cross-link » des récepteurs membranaires) [46]. L'originalité plaquettaire vient de la quantité élevée de ces rafts par rapport à une cellule eucaryote, montrant ainsi l'importance des interactions des plaquettes avec le milieu extracellulaire. De récents travaux ont démontré que ces microdomaines membranaires orchestrent la signalisation à travers la glycoprotéine plaquettaire réceptrice du collagène (GPVI) qui est constitutivement associée à la chaîne γ du récepteur au fragment Fc (FcR γ). Le complexe GPVI-FcR γ est recruté au sein des rafts lipidiques après engagement de la GPVI par son ligand, entraînant la phosphorylation de la chaîne FcR γ . De plus, le GPVI ne semble pas présent dans les rafts isolés à partir de plaquettes au repos mais il est massivement recruté au sein de ces structures après stimulation par le collagène [47]. De la même manière, le récepteur majeur de l'adhésion plaquettaire, GPIb-IX-V (CD42, Récepteur au vWF), s'associe fortement avec les rafts lipidiques après stimulation plaquettaire par le vWF, protéine multimérique de haut poids moléculaire [48],[49]. Il a même été démontré que l'activation plaquettaire ainsi que l'agrégation induite par de faibles doses de thrombine sont dépendantes de l'intégrité des rafts lipidiques [50]. D'ailleurs, il semble acquis que les rafts se regroupent après stimulation, co-localisant alors les diverses molécules présentes au sein de ces structures [51]. De plus, ce regroupement des rafts peut aussi se faire lors de stimulations plaquettaires induites par une diminution de la température (en dessous de 15°C). Il est d'ailleurs intéressant de noter que cette variation membranaire est réversible si les plaquettes sont mises à température ambiante. Enfin, lors d'une stimulation plaquettaire à température ambiante par un agoniste (thrombine, ADP,...) les rafts se regroupent. Une simple augmentation de la température à 37°C

réorganise les rafts qui retrouvent alors leur taille initiale, montrant l'importance de la température dans ces réarrangements lipidiques [51].

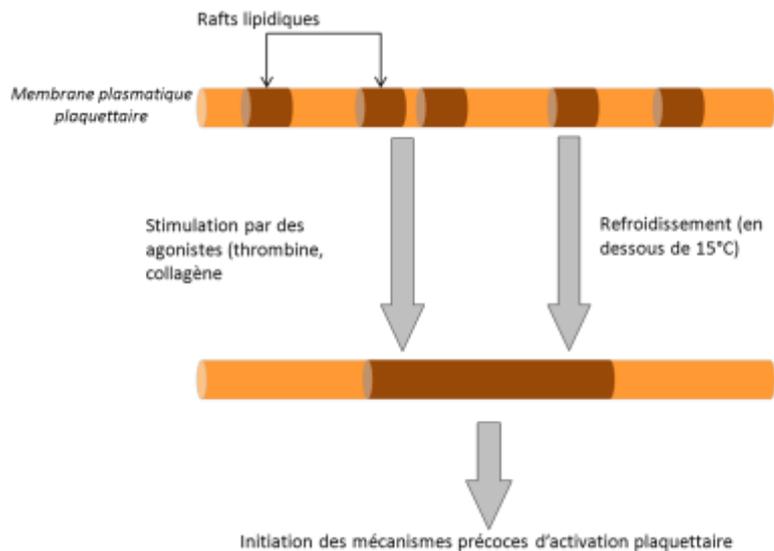


Figure 05 : Mouvement des rafts lipidiques après activation plaquettaire

D'après Bodin *et al.* [45]

Les rafts lipidiques des membranes plaquettares contiennent la majorité des récepteurs plaquettares. Après activation ou variation de la température, ils vont se regrouper afin de mettre en contact les molécules présentes au sein des rafts et ainsi initier les mécanismes intracellulaires.

b. Le cytosquelette

La structure plaquettaire est soutenue par un cytosquelette dense qui évolue grandement après activation [52]. La forme discoïde des plaquettes au repos est d'ailleurs seulement due à une boucle interne de microtubules située dans le cytoplasme, contre la membrane plasmique. Les microtubules sont composés d'un réseau de polymères de 13 couches de sous-unités de tubuline, hétérodimériques, les plaquettes en exprimant différents isoformes ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$). L'isoforme dominant dans les plaquettes et MK humains et murins est le $\beta 1$ [52]. Des expériences de « Knock-Out » (KO) ont révélé que les plaquettes de souris déficientes en tubuline $\beta 1$ peuvent toujours polymériser en microtubules mais les polymères ne sont pas capables de former la boucle interne soutenant la structure de la membrane plasmique [53]. Il n'est toujours pas déterminé si cette boucle est la seule fonction des

microtubules des plaquettes lorsqu'elles sont circulantes, ni même si cette forme discoïde engendre un avantage quelconque aux plaquettes, même si on peut logiquement penser que cette forme procure un avantage pour la rhéologie du flux sanguin. De récents travaux montrent un « cross-talk » entre les microtubules et les filaments d'actine, sans pour autant argumenter sur un rôle pour les plaquettes circulantes [54]. Le cytosquelette d'actine est quant à lui responsable du maintien de l'intégrité plaquettaire et semble plus impliqué dans la sécrétion granulaire (voir paragraphe I.B.3.b).

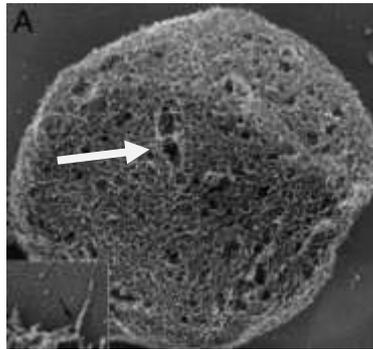


Figure 06 : Cytosquelette d'actine plaquettaire au repos observé en microscopie électronique à balayage

D'après Hartwig *et al.* [52]

Sur cette image d'une plaquette au repos, le cytosquelette d'actine est marqué et on distingue clairement les ouvertures de l'OCS sur l'extérieur de la cellule (flèche blanche).

Au repos, la surface plaquettaire est marquée de petites ouvertures formant l'OCS (figure 6). Un squelette membranaire dense recouvre la face cytoplasmique de la membrane plasmique ainsi que la surface cytoplasmique de l'OCS. Ce système, primordial lors de la dégranulation provoquée par l'activation, est donc soutenu par le cytosquelette d'actine.

c. Les organites

Les plaquettes contiennent de nombreux organites, dont certains sont spécifiques aux plaquettes. La dégranulation, dépendante de l'activation, concerne 3 des organites que contiennent les plaquettes, les granules α , les granules denses et les lysosomes [55].

i. Les granules α

Les granules α sont les organites plaquettaires les plus grands (200-500 nm) et aussi les plus abondants (environ 80 par plaquette). Ils contiennent notamment des facteurs de croissance (PDGF, EGF (Epidermal growth factor)), des protéines de coagulation (Fibrinogène, FV), des molécules d'adhésion (CD62P, GPIIb/IIIa, vWF), des chimiokines (PF4, CXCL4) et des cytokines (IL-1 β , TGF β) [56]. Parmi ces molécules, certaines sont spécifiques aux plaquettes (synthétisées seulement par les MK (ou les plaquettes), comme PF4 ou la β -thromboglobuline (β -TG)), d'autres sont dites plaquettes-sélectives (synthétisées majoritairement par les MK mais aussi par d'autres cellules, comme la thrombospondine ou le CD62P) et d'autres ne sont pas synthétisées par les MK (comme le fibrinogène). Cette dernière catégorie de molécules peut être présente dans les plaquettes suivant deux méthodes, soit par endocytose passive à partir du plasma circulant (albumine ou IgG), soit par intégration dépendante de récepteurs, principalement la GPIIb/IIIa [57].

Les granules α ont 4 zones morphologiques distinguables. En allant de l'extérieur vers l'intérieur des granules, il y a la membrane périphérique externe, la structure vésiculaire et tubulaire, une zone claire au microscope électronique et une zone foncée. La membrane contient des molécules d'adhésion telles que le CD62P et la GPIIb/IIIa tandis que la structure tubulaire contient des formes multimériques de vWF. L'intérieur des granules α contient de nombreuses molécules : la zone claire contenant du fibrinogène et de la thrombospondine, la zone foncée contenant du PF4, des protéoglycanes et de la β -thromboglobuline. Certains granules α contiennent des exosomes, petites vésicules de 40 à 100 nm, qui sont libérées après activation par la thrombine. Ces exosomes sont formés par la fusion de corps multivésiculaires ou d'endosomes/lysosomes avec la membrane plasmique. Ils sont distincts des microvésicules plaquettaires (MVP), dont la taille est comprise entre 100 nm et 1 μ m. Les MVP contiennent des protéines membranaires plaquettaires (CD62P et GPIIb/IIIa) et semblent provenir d'une vésiculation de la membrane plasmique après activation plaquettaire.

ii. Les granules denses

Plus petits que les granules α (100 à 200 nm), les granules denses sont aussi plus faiblement représentés dans les plaquettes (3 à 9 par cellules). Ils contiennent de grandes concentrations de petites molécules comme de l'ADP/ATP, du calcium, du magnésium ou de la sérotonine. Les granules denses apparaissent opaques aux électrons en microscopie électronique à transmission et sont faiblement acides (pH de 6,1). Beaucoup moins d'études sont faites sur les granules denses que sur les granules α mais l'importance de leur contenu les rend fondamentaux lors de l'activation plaquettaire, principalement pour le maintien de l'état activé, mais aussi pour activer les plaquettes adjacentes par sécrétion agoniste d'ADP.

iii. Les lysosomes

Les plaquettes contiennent seulement quelques lysosomes primaires et secondaires (les secondaires étant les lysosomes actifs, se formant après intégration du corps à dégrader) [58]. Les lysosomes sont formés rapidement lors de la maturation du MK, avant même le développement des granules α [59]. Ces organelles sont riches en hydrolases acides, protéases, cathepsines et en collagénases. Plusieurs équipes ont tenté de montrer une phagocytose plaquettaire, mais il semble que les substances absorbées restent retenues dans l'OCS. La digestion de matériel exogène par formation de phagolysosomes n'a jamais été démontrée et la fonction des enzymes lysosomales plaquettaires est toujours inconnue [60]. L'absence de digestion du matériel exogène est importante car les plaquettes sont connues pour intégrer des micro-organismes, tel que *S. aureus* et le VIH, pouvant alors favoriser l'échappement du système immunitaire et rester ainsi protégé dans les lysosomes plaquettaires [61].

iv. Les autres organites

Les plaquettes abritent d'autres organelles, parmi lesquels les peroxysomes et les mitochondries. Pour ces organites la fonction reste identique à celle des cellules eucaryotes « classiques », c'est-à-dire réduction des espèces réactives de l'oxygène et production d'ATP. Les plaquettes possèdent comme seul ADN, l'ADN mitochondrial.

4. Méthode d'obtention de plaquettes pour les études *in vitro*

Il existe différentes méthodes pour obtenir des plaquettes *in vitro*, le type d'expérimentation est donc important dans le choix de la méthode d'obtention.

a. Plasma Riche en Plaquette (PRP)

Les plaquettes dites "PRP" (Platelet-Rich Plasma) proviennent directement de prélèvements sanguins issus de donneurs volontaires. Pour obtenir les PRP, le sang total est déposé dans un tube contenant un anticoagulant, le citrate, et conservé à 37°C. Il est centrifugé à 300g peu de temps après le don (une heure au maximum). Cette méthode d'obtention permet d'avoir des plaquettes sanguines dans un environnement *ex vivo* car elles restent dans le plasma original donc en présence des nombreuses molécules plasmatiques. C'est donc pour cette raison que l'on a retenu cette méthode, en particulier pour notre étude concernant le rôle inflammatoire plaquettaire dans un contexte infectieux. Cette méthode est peu utilisée pour les études hémostatiques à cause de la présence en trop grande quantité de molécules pro- et anti-activatrices des plaquettes.

Pour toutes les études, l'anticoagulant utilisé pour le recueil des plaquettes est important. L'EDTA fixe de manière forte et irréversible le calcium, bloquant alors toute activation plaquettaire. Le citrate fixe également le calcium mais plus faiblement, permettant aux plaquettes de rester réactivables [62].

b. Plaquettes lavées

Pour les études des propriétés hémostatiques des plaquettes, elles sont utilisées *ex vivo* ou *in vitro* et peuvent éventuellement être lavées avant utilisation. Pour cela, il existe plusieurs protocoles de lavage. D'après les travaux de référence du groupe de JP Cazenave à Strasbourg, les plaquettes sont lavées deux fois dans des tampons tyrode-albumine supplémentés en PGI₂ (ProstaGlandine I₂) et/ou en héparine (héparane sulfate) puis resuspendues dans un tampon

tyrode-albumine contenant de l'apyrase [62]. La PGI_2 induit une augmentation de la concentration en AMPc cytoplasmique qui active des protéines kinases. Ces dernières favorisent la séquestration du calcium dans les plaquettes puis l'expulsion du calcium vers le milieu extracellulaire. Quant à l'héparine, elle inhibe la coagulation en se liant à l'antithrombine III qui elle-même se lie à plusieurs facteurs de la coagulation. En fait, l'héparine accélère l'inactivation de ces facteurs par l'antithrombine III. L'apyrase est une enzyme qui dégrade l'ATP et l'ADP libéré par les plaquettes. L'ajout de cette enzyme permet donc d'éviter l'activation des plaquettes et d'empêcher l'installation d'un état réfractaire des plaquettes à l'ADP.

c. Les plaquettes dédiées à la transfusion sanguine

Une prescription de concentrés plaquettaires par le clinicien s'effectue dans deux groupes de circonstances : thérapeutique et préventif. Dans les deux cas, l'objet de la transfusion est d'apporter au patient des cellules de la meilleure qualité hémostatique possible afin d'assurer l'hémostase et en particulier la première de ses étapes, l'hémostase primaire et le colmatage des microbrèches qui surviennent quotidiennement le long de l'axe circulatoire. Néanmoins, tel qu'obtenus auprès des dons de sang par des donneurs médicalement sélectionnés, les concentrés de plaquettes comprennent, en plus des plaquettes elles-mêmes, du plasma et d'infimes contaminants cellulaires autres que plaquettaires, des hématies et des leucocytes (principalement granulocytes). Les étapes de contrôle de la qualité des produits permettent de s'assurer du minimum admissible en cellules contaminantes, et les procédés de production permettent de limiter au minimum possible la quantité de plasma au bénéfice de solutés de suspension des plaquettes (SSP). Bien que les plaquettes soient optimalement fonctionnelles lorsqu'elles sont conservées dans leur plasma autologue, elles conservent une excellente qualité hémostatique lorsqu'elles sont resuspendues en SSP. La soustraction de plasma au bénéfice de l'addition de SSP obéit à une double logique : ne pas apporter d'une part un produit sanguin non nécessaire dans le cas d'une transfusion plaquettaire (le plasma), et récupérer d'autre part ce plasma pour la filière de fractionnement en médicaments dérivés du plasma.

Il existe trois types de concentrés plaquettaires, dont l'un n'est pas préparé pour un usage thérapeutique lié aux plaquettes en France et dans la plupart des pays européens, le

plasma riche en plaquettes, décrit dans le paragraphe précédent. Les deux autres produits plaquettaires sont ainsi des concentrés extraits de couches leuco-plaquettaires ou buffy-coats, isolées à partir d'un don de sang total par centrifugation. En pratique, cinq à six concentrés unitaires du même groupe ABO et RH1 sont mélangés en une unité thérapeutique appelée mélange de concentrés de plaquettes standard (MCPS). Les MCPS sont constitués manuellement ou automatiquement grâce à des automates. Du plasma peut être extrait des concentrés unitaires et il leur est systématiquement substitué par du SSP dans la majeure partie des plateaux de production des Produits Sanguins Labiles (PSL) en France (depuis 2003 à l'EFS Auvergne-Loire, pionnier de cette technologie en France).

Le dernier produit est obtenu par séparation directe au cours du don des plaquettes sur un automate d'aphérèse. En fonction des automates, ainsi que du procédé de récupération et de concentration de plaquettes, du SSP peut être injecté directement dans le circuit de récupération permettant alors la récupération à part du plasma pour une destination vers le fractionnement. Certains automates ne permettent cependant pas encore cette substitution du plasma par du SSP et les concentrés plaquettaires obtenus sont ainsi en 100% de plasma autologue.

Chaque mode d'obtention des plaquettes est ainsi différent et « agresse » de façon variable les plaquettes, ce qui a été assez bien étudié pour leurs aspects hémostatiques mais pas réellement pour les aspects inflammatoires et sécrétoires autres que les protéines de l'hémostase. Néanmoins, quelques études récentes abordent cet aspect et un travail est également en cours dans notre laboratoire sur le sujet [63],[64],[65]. Cela signifie implicitement que les études *ex vivo* réalisées sur les plaquettes sanguines imposent que la méthode d'obtention des plaquettes soit d'une part correctement décrite et surtout homogène au sein de l'étude ; idéalement il devrait en être de même pour des études d'effets *in vivo* mais ce point est extrêmement difficile à réaliser compte tenu de l'hétérogénéité des méthodes utilisées pour préparer des concentrés plaquettaires, y compris au sein d'un même plateau de production de produits sanguins labiles.

Les plaquettes sanguines sont conservées entre 20 et 24°C très précisément (cible à 22°C), sous agitation constante thermostatée. Une fois produites, elles vont être délivrées aux

patients après avoir été qualifiées sur le plan microbiologique dans un laps de temps allant de 1 à 5 jours ; au-delà de 5 jours, leur délivrance n'est plus autorisée pour des raisons de risque bactérien et de moindre fonctionnalité.

B. Activation plaquettaire

1. Les éléments activateurs des plaquettes

Qu'il soit mis en œuvre des phénomènes chimiques, biologiques ou physiques, les plaquettes sont très activables et les changements après activation sont drastiques et rapides (moins de 1 min pour certains agonistes). Les agonistes plaquettaires utilisent différents récepteurs, souvent couplés à des protéines G, et mettent donc en jeu des voies de signalisation en aval des récepteurs. Ces phénomènes peuvent être couplés, notamment dans des contextes hémostatiques où les plaquettes sont en présence de thrombine, de collagène et d'ADP. De plus, les plaquettes peuvent s'auto-activer par des boucles autocrines, notamment par l'implication de l'ADP sécrété par les plaquettes activées (figure 7). Enfin, l'activation plaquettaire peut-être provoquée par des agents infectieux [10]. Il est important de noter que la physiologie plaquettaire varie suivant l'agoniste.

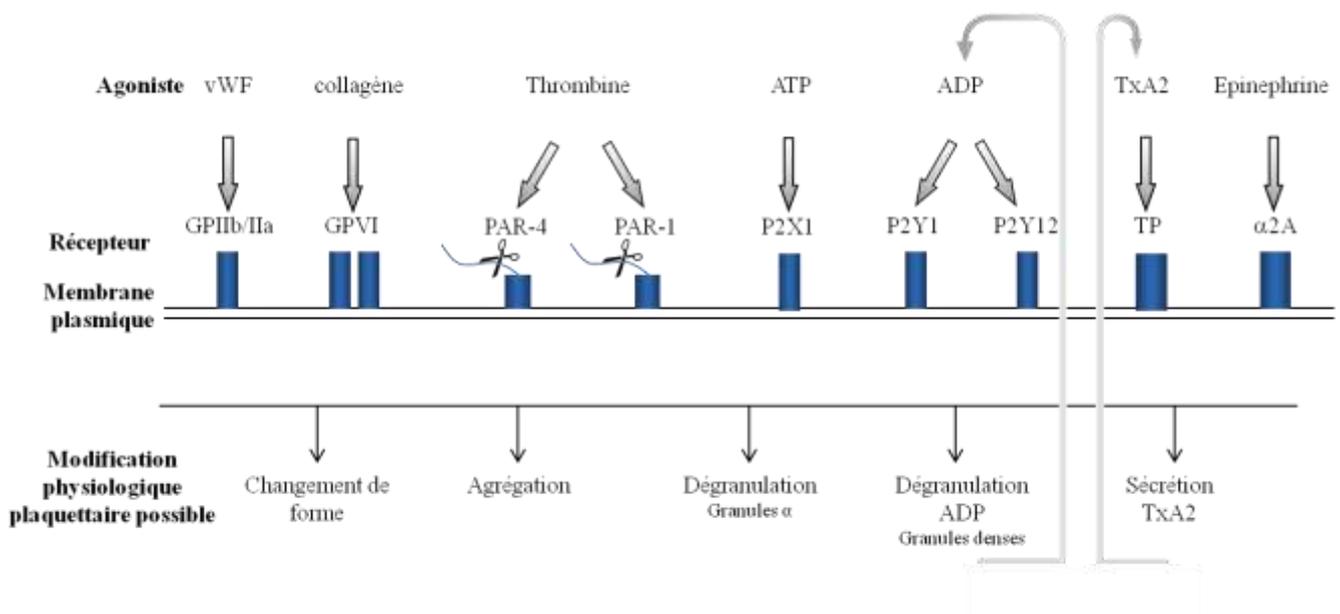


Figure 07 : Schéma global de l'activation plaquettaire

D'après la revue de Brass *et al.* [66]

Le mode d'action est différent suivant l'agoniste plaquettaire et peut entraîner des modifications morphologiques diverses allant du changement de forme à l'agrégation et la dégranulation. Certaines molécules sont produites en réponses à l'activation et peuvent engendrer une boucle d'activation.

Les plaquettes humaines circulent dans les vaisseaux sanguins dans un état quiescent. Cet état est maintenu par la présence d'inhibiteurs, comme la PGI_2 et le NO, sécrétés notamment par la monocouche de cellules endothéliales, ainsi que par la limitation d'accumulation d'agonistes plaquettaires, dont le CD39 limitant l'accumulation d'ATP et d'ADP dans la circulation. C'est seulement lorsque ces inhibitions disparaissent que les plaquettes deviennent activées. C'est le cas par exemple lors de traumatismes locaux ou en réponse à une rupture de la plaque athérosclérotique.

D'un point de vue physiologique, lors de l'hémostase, l'activation plaquettaire a pour but de stopper le saignement, le caillot formé ensuite est nécessaire pour cicatriser, il doit donc être stable dans le temps. L'hémostase, qui sera abordé dans le paragraphe I.B.2, implique une activation plaquettaire hautement régulée, faisant intervenir de nombreux agonistes, qu'ils soient solubles (thrombine, ADP, Thromboxane A_2 (TxA_2)) ou adhésifs (collagène, vWF) [66]. Parmi ces molécules, le vWF, la thrombine et le collagène sont impliqués dans l'initiation de

l'activation plaquettaire, l'ADP, la thrombine et le TxA2 sont impliqués dans la propagation de l'activation, enfin, l'ADP et le fibrinogène permettent la stabilisation de cette activation.

a. Les agonistes solubles

La thrombine, protéase clivant le fibrinogène en fibrine, joue alors un rôle primordial dans l'activation plaquettaire, notamment lors de la formation du clou plaquettaire [67]. Lorsque de la thrombine est ajoutée *in vitro*, elle entraîne une forte activation : les plaquettes vont changer de forme, adhérer les unes aux autres et sécréter le contenu de leurs granules. C'est en 1990 que des travaux identifient des protéines G couplées à des récepteurs pouvant être activées par protéolyse grâce à la thrombine [68],[69]. Lorsque le récepteur nommé par la suite PAR-1 (Protease-Activated Receptor) a été identifié, il n'y avait pas de paradigme clair sur l'initiation du processus intracellulaire déclenché par une protéolyse extracellulaire, montrant pour la première fois qu'une protéine G peut être activée par un récepteur à une protéase.

Il y a aujourd'hui 4 membres connus de la famille des PAR, PAR-1, -2, -3, -4, seuls PAR-1 et -4 sont exprimés sur les plaquettes sanguines humaines [66]. Hormis PAR-3, les PAR sont clivés par la thrombine, qui coupe la partie N-terminale extracellulaire du récepteur. Cette coupure, libérant un peptide, va découvrir une nouvelle partie N-terminale, possédant la séquence SFLLRN qui devient alors ligand du récepteur PAR (figure 8) [70]. Celui-ci va alors pouvoir se fixer sur une des boucles extracellulaire du récepteur PAR. Dans certaines conditions, d'autres protéases peuvent aussi cliver la partie N-terminale et donc activer le récepteur PAR, voire l'inactiver si le clivage ne se fait pas au bon endroit [66]. PAR-2 est exprimé sur de nombreux tissus, comme les cellules endothéliales, mais pas sur les plaquettes humaines. Il peut être clivé et activé par la trypsine et la tryptase mais pas par la thrombine. Il peut aussi être activé par les facteurs VIIa et Xa [71]. PAR-3 est le régulateur majeur des réponses à la thrombine chez les rongeurs, mais son rôle est différent, car il aurait comme seule fonction de faciliter le clivage de PAR-4 à de faibles concentrations de thrombine [72]. Chez l'homme, PAR-4 a une courbe de réponse similaire à celle de PAR-1 qui est le récepteur activé pour de faibles doses de thrombine. La dose nécessaire à l'activation de PAR-4 est de 10 à 100 fois plus élevée que celle requise pour activer PAR-1, ceci étant certainement dû à une différence dans la structure primaire de cette protéine [73]. Dans des conditions

physiologiques, lorsque de faibles quantités de thrombine sont libérées, PAR-1 est donc rapidement activé, ce qui entraîne l'activation des protéines G couplés à PAR-1, $G\alpha_{i/o}$ et $G\alpha_{12/13}$. La mise en jeu de ces protéines entraîne une première vague d'activation des plaquettes, qui provoque une agrégation forte et transitoire [74]. Au contraire, la signalisation provoquée par l'activation de PAR-4 a un effet prolongé dans le temps, donc plutôt lors des dernières phases de l'agrégation plaquettaire [75]. De plus, l'activation de PAR-4 provoque une agrégation irréversible des plaquettes, fondamentale pour le maintien du clou plaquettaire à la fin de l'hémostase [76]. La signalisation en aval de PAR-4 utilise les protéines $G\alpha_{12/13}$ et $G\alpha_q$, l'activité de cette dernière étant liée aux flux calciques [76].

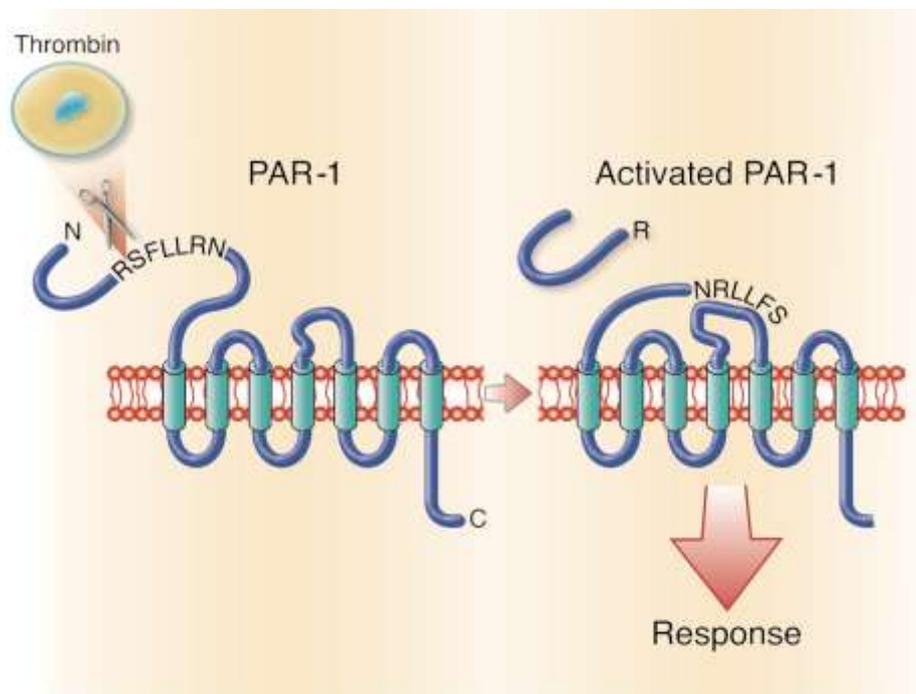


Figure 08 : Effet de la thrombine sur son récepteur PAR-1

De Coughlin et Camerer [70]

Lorsque la thrombine rencontre son récepteur (ici PAR-1) elle va cliver la partie N-terminale extracellulaire. Le nouveau fragment N-terminal libéré, de séquence SFLLRN, devient alors ligand pour une des boucles extra-cellulaire de PAR-1, entraînant alors l'activation du récepteur plaquettaire.

La thrombine active donc les plaquettes humaines par clivage et activation de PAR-1 ou PAR-4 selon la concentration. Ces récepteurs activent les protéines G associées menant à

l'activation de la PLC β , la PI 3-kinase (PI3k), des protéines G monomériques Rho, Rac et Rap1, et aussi à l'augmentation de la concentration en Ca²⁺ cytosolique en inhibant la formation d'AMPc. Ce processus est aidé par le relargage d'ADP et de TxA₂ qui se fixent sur leurs récepteurs respectifs sur la surface plaquettaire, et permettent alors l'auto-activation plaquettaire ainsi que le maintien de l'état activé. Il semble que le relargage d'ADP soit plus important si la stimulation est dépendante du PAR-4, entraînant alors un « feedback » positif important [76].

L'ADP et le TxA₂ sont des facteurs agissant tous les deux sur des récepteurs couplés à des protéines G. Ils permettent donc un « feedback » positif après activation, leur permettant d'être formés puis libérés, augmentant alors la réponse. Cette propagation de l'activation plaquettaire est d'une grande importance car elle renforce l'activation locale plaquettaire ainsi que celle des plaquettes adjacentes [77]. En effet, l'ADP, stockée en grande quantité dans les granules denses, est libérée après activation. L'activation plaquettaire par l'ADP est régulée par 2 récepteurs couplés à des protéines G, P2Y₁ et P2Y₁₂. Alors que le P2Y₁ est couplé à la protéine G_q, le P2Y₁₂ est couplé principalement à la protéine G_{i2} [78],[79]. Les plaquettes des souris KO pour le P2Y₁ ne peuvent pas changer de forme en réponse à une stimulation par l'ADP, l'agrégation est aussi sévèrement altérée [80]. De plus, les souris KO pour le P2Y₁ ont des temps de saignement supérieur et sont relativement résistantes aux embolies induites par l'ADP [81]. En parallèle, les souris KO pour le P2Y₁₂ ont des plaquettes normalement formées mais l'agrégation en réponse à une stimulation par l'ADP est aussi diminuée [82]. Ces animaux ont des temps de saignement supérieur et peuvent former des thrombi seulement petits et instables [83]. Ces 2 récepteurs sont donc tous les deux requis pour permettre une réponse complète de la plaquette (figure 7). Ils sont aussi impliqués dans les activités pro-coagulantes plaquettaires [77]. Le TxA₂ a une action forte et mais reste local de par sa faible durée de vie. Il est produit à partir de l'acide arachidonique à travers la conversion par la cyclooxygénase-1. Le récepteur au TxA₂ est nommé TP et son absence dans des souris KO va aussi entraîner des temps de saignement supérieurs ainsi que l'incapacité à former des thrombus stables [84].

D'autres agonistes solubles ont été identifiés, utilisant majoritairement des récepteurs couplés aux protéines G, mais ce sont de faibles activateurs et semblent servir principalement comme potentialisateurs de la réponse plaquettaire aux autres stimuli. Parmi eux on peut citer

l'épinephrine qui est incapable d'activer seule les plaquettes mais modifie l'effet d'autres activateurs en jouant sur le récepteur adrénergique α_{2A} [85]. La prostaglandine E2 protège de l'activation par son récepteur EP3 [86]. La sérotonine est stockée dans les granules denses et libérée après activation, et elle semble permettre le « feedback » positif [77]. De plus, certaines chimiokines comme RANTES pourraient aussi activer les plaquettes grâce à leurs récepteurs couplés à des protéines G et donc seraient aussi capables de potentialiser d'autres stimuli [87].

b. Les récepteurs d'adhésion

Les plaquettes expriment de nombreuses intégrines, dont la principale est la GPIIb/IIIa ayant un rôle primordial dans la physiologie plaquettaire et qui, dans son état activé, peut lier le fibrinogène et le vWF (et aussi d'autres molécules, comme la vitronectine) [88]. La GPIIb/IIIa est donc primordiale pour les interactions plaquettes/plaquettes lors de l'agrégation (voir paragraphe I.B.2.a). L'activation de la GPIIb/IIIa se fait par l'intermédiaire du signal « inside-out », résultant d'une première activation plaquettaire par la majorité des agonistes plaquettaires connus (figure 9) [89]. La fixation du fibrinogène ou du vWF sur la GPIIb/IIIa va alors entraîner une signalisation « outside-in » permettant une deuxième vague d'activation plaquettaire.

Deux autres glycoprotéines jouent des rôles importants dans la physiologie plaquettaire : la GPVI et la GPIb. La GPVI, récepteur au collagène, est associé au FcR γ , ce complexe contient alors 2 motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motifs) dont la phosphorylation induit une cascade de phosphorylation. Le complexe GPIb/V/IX, récepteur au vWF, est un autre récepteur couplé à des activités de type tyrosine kinase. Ces deux récepteurs lient de puissants agonistes plaquettaires dont les rôles dans l'hémostase seront traités dans le chapitre I.B.2 [90].

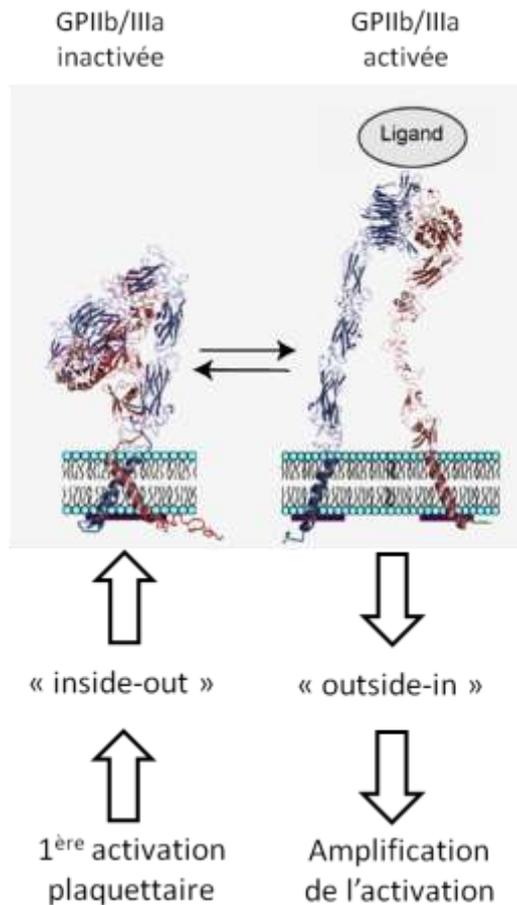


Figure 09 : Rôle de la GPIIb/IIIa dans l'activation plaquettaire

D'après Coller et Shattil [89]

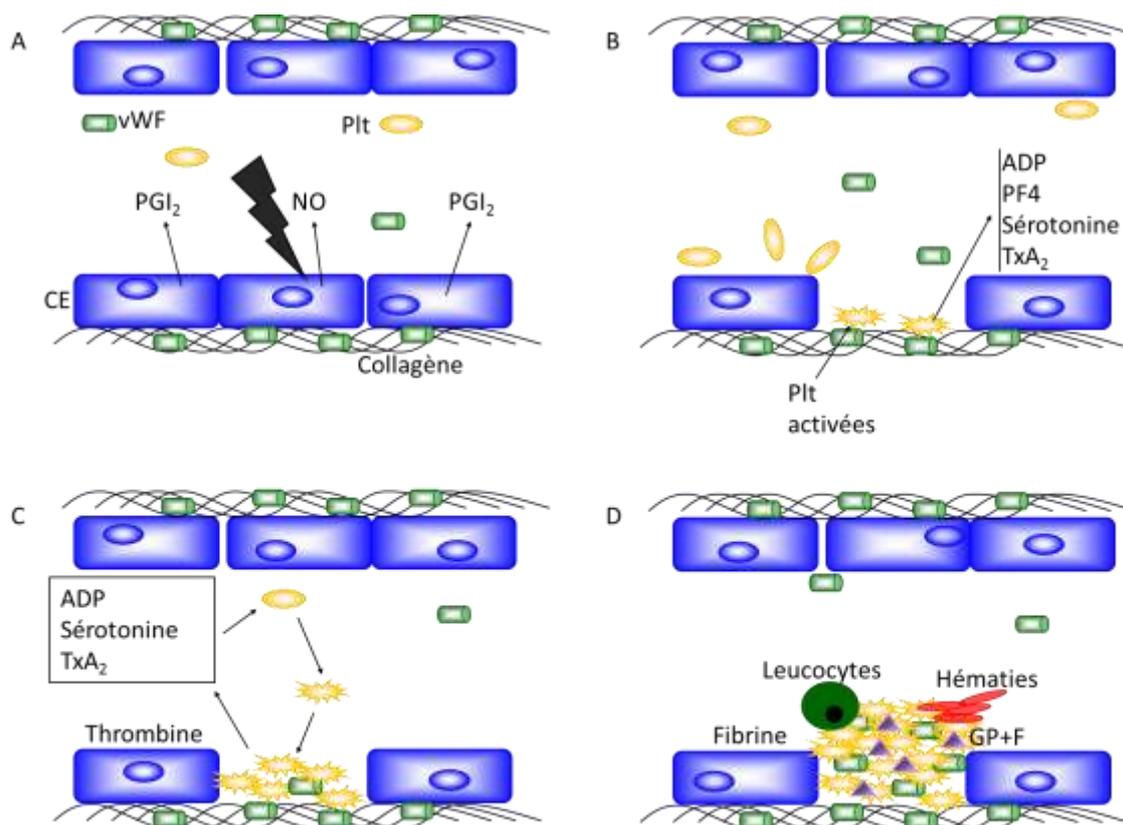
Après une première phase d'activation plaquettaire, le signal « inside-out » qui en découle permet l'activation de la GPIIb/IIIa. Cette activation rend possible la fixation des ligands (fibrinogène ou vWF) entraînant alors une deuxième phase d'activation plaquettaire grâce au signal « outside-in »

2. L'hémostase

a. Définition

L'hémostase se rapporte au processus physiologique au cours duquel le saignement est arrêté. C'est aussi le mécanisme permettant le maintien de la fluidité du flux sanguin. Lorsque l'endothélium vasculaire est altéré, diverses étapes se déroulent pour endiguer la perte sanguine [91] (figure 10):

- *La vasoconstriction* : elle a lieu immédiatement après la lésion d'un vaisseau. Elle correspond à la constriction du vaisseau sanguin par les cellules musculaires de la paroi du vaisseau, c'est à dire la diminution du diamètre du vaisseau via le spasme vasculaire, ce qui ralentit le saignement. La vasoconstriction dure de 15 à 60 secondes et ralentit la circulation sanguine ce qui permet aux réactions suivantes d'être pleinement efficaces.
- *L'hémostase primaire* (figure 10A et 10B) : elle implique les plaquettes qui se lient au vWF via la GPIb/V/IX et, par la GPVI, au collagène dans les parois vasculaires exposées pour former un amas visqueux nommé le "clou plaquettaire". Ce phénomène se produit dans les secondes suivant le traumatisme vasculaire.
- *L'hémostase secondaire* (figure 10C) : elle est aussi appelée coagulation. La coagulation implique une cascade complexe de facteurs de coagulation, ce qui débouche sur la transformation du fibrinogène plaquettaire en fibrine polymérisée, grâce à l'action de la thrombine, également stimulateur direct des plaquettes, permettant alors la création d'un caillot. Ce processus dure de 3 à 6 minutes après la rupture du vaisseau.
- *La formation et la dissolution du caillot* (figure 10D) : les facteurs de croissance libérés par les plaquettes organisées en caillot (PDGF, FGF (Fibroblast Growth Factor) et TGF- α et β) attirent du tissu conjonctif et stimulent la croissance des fibroblastes et des cellules de muscle lisse au sein de la paroi vasculaire. Ceci entame le phénomène de réparation qui résulte finalement en la dissolution du caillot par fibrinolyse.



Plt: Plaquettes ; CE : Cellules Endothéliales ; FvW : Facteur von Willebrand ;
 GP+F : GPIIb/IIIa et Fibrine

Figure 10 : représentation schématique de l'hémostase

D'après Marcus [92] et Brass [66]

Les plaquettes circulent à l'état inactivé, maintenue par la PGI₂ et le NO sécrété par les cellules endothéliales. Lors d'une lésion (A), le collagène et le vWF vont se retrouver exposés, activant alors les plaquettes qui vont adhérer sur le site de la lésion (B). Une fois activées, les plaquettes vont sécréter différentes molécules dont l'ADP, le TxA₂, la sérotonine ou le PF4, ce qui va attirer les plaquettes avoisinantes et ainsi les activer. Elles vont alors s'agréger entre elles et avec d'autres cellules de la circulation et la sécrétion de thrombine va permettre la formation du clou plaquettaire grâce à la fibrine.

b. Le rôle des plaquettes dans l'hémostase

Les plaquettes sont les actrices majeures de l'hémostase. Lors d'une lésion vasculaire, les plaquettes, par la GPVI, adhèrent immédiatement au collagène accessible (normalement sous l'endothélium vasculaire), au niveau de la brèche vasculaire [93]. Les plaquettes se fixent également aux microfibrilles et à la membrane basale par leur GPIb/IX/V en présence du vWF

[1]. Après fixation sur la GPVI, le collagène induit le relargage d'autres agonistes tels que l'ADP et la sérotonine provenant des granules denses mais aussi la TxA₂, le PF4 venant des granules α ainsi que des enzymes lysosomales. Ces substances ont un effet activateur des plaquettes proches, permettant le signal « inside-out » activant le GPIIb/IIIa, et active le recrutement d'autres plaquettes sur le site de la blessure. L'ADP, la sérotonine et le TxA₂ sont les composés les plus efficaces pour recruter les plaquettes, notamment car ils activent les plaquettes arrivant par la phase sanguine. Les nouvelles plaquettes recrutées s'agrègent contre les premières plaquettes par l'intermédiaire des molécules de fibrinogène qui se fixent sur la GPIIb/IIIa activé [94]. Les membranes plaquettaires de cet agrégat fusionnent et l'amas ainsi formé constitue le clou plaquettaire.

Le clou plaquettaire imperméable est consolidé notamment la seconde vague d'activation menée notamment par la thrombine, mettant fin à l'hémorragie : les plaquettes et la fibrine forment donc une structure résistante à la pression artérielle [66]. Des mécanismes de régulation (synthèse d'ADPase, de NO et de PGI₂) des cellules endothéliales se mettent en place afin de limiter la taille du caillot [92].

D'autres cellules participent, en tant qu'inhibiteurs ou stimulateurs, à la réactivité des plaquettes, notamment les globules rouges et les neutrophiles, en se fixant sur la structure plaquettes/fibrine [92]. En effet, les globules rouges sont pro-thrombotiques par leur relargage d'ADP et d'ATP, c'est à dire qu'ils augmentent la réactivité des plaquettes activées en induisant le relargage de sérotonine des plaquettes, renforçant l'activation plaquettaire [95]. Quant aux neutrophiles, ils arrivent sur le site de la blessure par chimiotactisme via l'acide 12-hydroxyeicosatétraénoïque relargué par les plaquettes [96]. Le contact entre les plaquettes et les neutrophiles se fait par le couple CD62P plaquettaire/CD162. Ainsi, par ce contact cellule/cellule, les neutrophiles peuvent interagir directement sur les plaquettes et inversement. Enfin, la formation du caillot induit la sécrétion de l'activateur tissulaire du plasminogène par les cellules endothéliales ce qui initie la fibrinolyse et donc la dissolution du caillot [3].

3. Physiologie de la plaquette activée

Lors de l'hémostase, l'immobilisation de la plaquette sur le lieu de la lésion vasculaire requiert l'adhésion des plaquettes à l'endothélium activé et/ou au sous-endothélium puis l'agrégation des plaquettes entre elles. En parallèle de ces deux phénomènes, les plaquettes s'activent, mobilisant alors les flux calciques, ce qui a pour conséquence d'augmenter la concentration de récepteurs membranaires (intégrines) ainsi que la libération de nombreux éléments sécrétables, activateurs plaquettaire mais aussi des autres cellules environnantes. L'agrégation des plaquettes est dépendante de la fixation du fibrinogène à son récepteur majoritaire, la GPIIb/IIIa sous sa forme activée, molécule essentielle pour la fixation des plaquettes entre elles.

a. Adhésion plaquettaire

L'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale est la première étape de l'hémostase primaire. Les plaquettes adhèrent aux protéines de la matrice extracellulaire grâce aux différentes GP et intégrines (figure 11) [90]. Parmi les composants majeurs de la matrice extracellulaire, le collagène joue un rôle clé dans l'adhésion plaquettaire par l'intermédiaire de nombreuses molécules [93]. En effet, le collagène peut se fixer de manière directe à la GPVI et à la GPIa/IIa et de manière indirecte à la GPIIb/IIIa et à la GPIb/V/IX via le vWF. Il semble acquis que la fixation à un de ces récepteurs est dépendante de l'état d'activation des plaquettes, de la structure du collagène mais aussi des conditions de flux sanguin. Par exemple, la fixation du collagène à la GPIa/IIa est possible lorsque le collagène est de type monomérique dans des conditions de forces de cisaillement peu élevées, alors que le collagène sous sa forme fibrillaire ne peut pas interagir directement avec cette glycoprotéine [97],[98]. La fixation du collagène par les plaquettes provoque alors une forte adhésion ainsi qu'une agrégation plaquettaire.

Le vWF est une protéine multimérique synthétisée majoritairement par les cellules endothéliales et jouant un rôle essentiel dans l'adhérence des plaquettes au collagène via la GPIIb/IIIa ou la GPIb/V/IX, entraînant une très forte activation plaquettaire ainsi qu'une rapide adhésion. Il est sécrété sous une forme de très haut poids moléculaire qui peut être clivée par

la métalloprotéase ADAMTS13 limitant alors l'aspect très thrombogène de vWF et donc permettant une régulation de l'adhésion plaquettaire [99]. L'activation vWF dépendante entraîne alors une sécrétion forte des granules denses et donc de l'ATP et de l'ADP qu'ils contiennent, permettant d'entretenir une boucle d'auto-activation [100]. La thrombospondine, glycoprotéine intégrée dans la matrice sous-endothéliale, a été identifiée comme un substrat alternatif au vWF pour la GPIb, notamment lors de forces de cisaillement élevées [101]. De plus, le complexe GPIb/V/IX peut permettre, comme le CD162, le roulement des plaquettes sur l'endothélium grâce à la P-selectine endothéliale (CD62P) [102],[103].

Constamment, les plaquettes sont soumises à des forces de cisaillement, dépendantes du flux laminaire sanguin. Ces forces peuvent activer les plaquettes de façon différentielle. En effet, lors d'une lésion artérielle les forces de cisaillement sont augmentées. L'activation plaquettaire et l'agrégation qui en dépend est nommée SIPA pour « Shear-Induced Platelet Aggregation » [104]. En cas de forces de cisaillement faibles, le vWF entre faiblement en contact avec son récepteur, le complexe GPIb/IX/V, entraînant alors qu'une simple adhésion réversible des plaquettes. Des forces de cisaillement élevées permettent une interaction forte entre le vWF et le complexe GPIb/IX/V. Cette activation entraîne alors une rapide agrégation GPIIb/IIIa-dépendante par le biais de variations en Ca^{2+} , mais aussi une libération du contenu des granules α et denses [105].

L'adhésion primaire des plaquettes va provoquer une première activation plaquettaire, principalement par engagement des flux calciques. Il s'en suit notamment une sécrétion d'ADP, de fibrinogène, de TxA_2 et de fibronectine [106], éléments qui vont permettre d'augmenter l'affinité des plaquettes sur l'endothélium, mais aussi d'activer les plaquettes circulantes proches (figure 11).

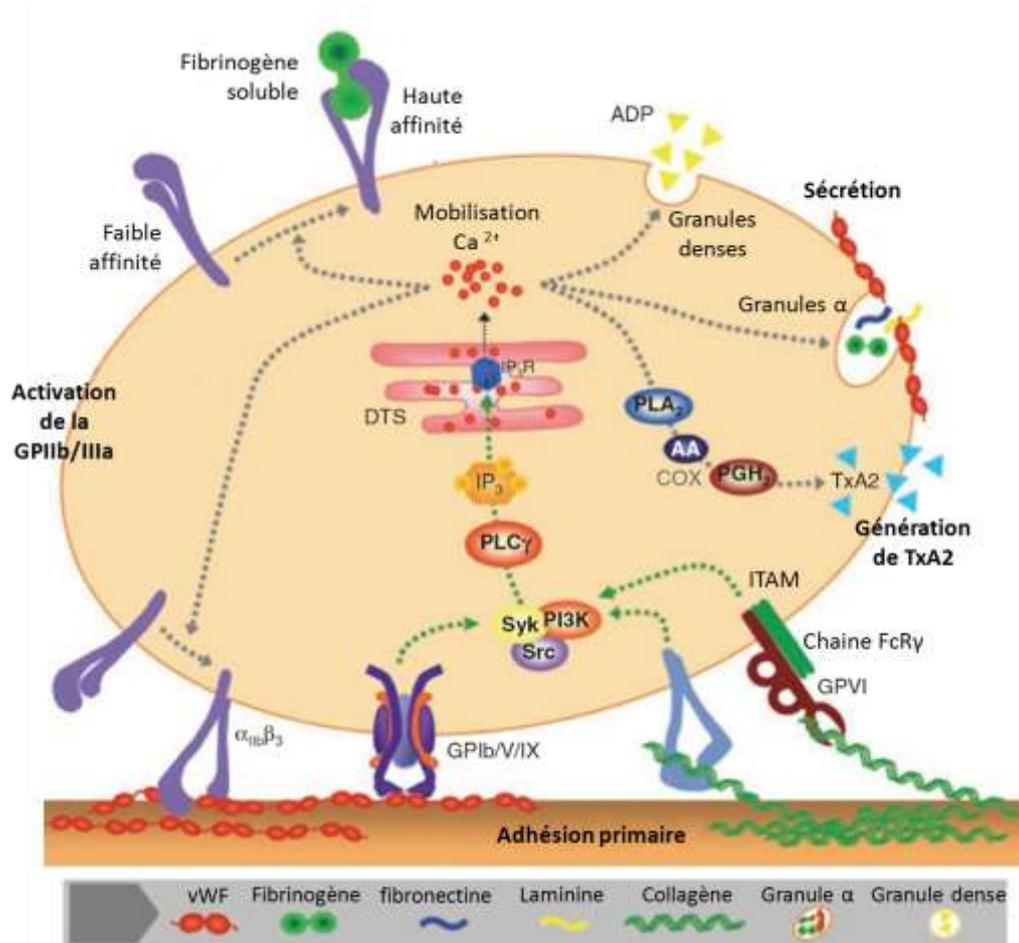


Figure 11 : Adhésion primaire plaquettaire

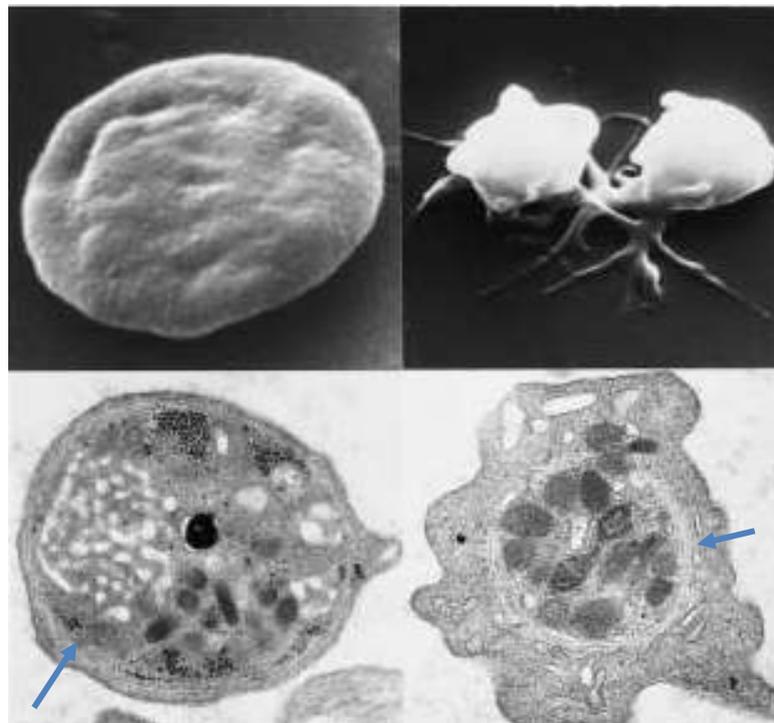
D'après Wei *et al.* [106]

L'adhésion primaire est médiée par des récepteurs d'adhésion : la GPIV (récepteur au collagène), la GPIIb/IIIa et la GPIb/V/IX (récepteurs au vWF). Elle est notamment provoquée par l'activation de la GPIIb/IIIa grâce à la mobilisation des flux calciques.

b. Modifications morphologiques

Après activation, les plaquettes subissent plusieurs modifications morphologiques et fonctionnelles. Très rapidement les plaquettes deviennent sphériques, se dilatent et s'étalent en émettant des pseudopodes et en formant des invaginations (figure 12). La membrane de la cellule se réorganise, les granules (α et denses) se centralisent et déversent leur contenu dans l'OCS. Les plaquettes vont alors s'étaler à la surface de l'endothélium (ou du sous-endothélium) ou alors s'agréger entre elles ou avec d'autres cellules (leucocytes, hématies). La libération des

facteurs solubles et l'augmentation de l'expression membranaire de certains récepteurs permet un maintien de l'état activé mais aussi une activation des plaquettes adjacentes.



Plaquettes au repos

Plaquettes activées

Figure 12 : Changement morphologique des plaquettes après activation, observé en microscopie électronique à balayage (A et B) ou à transmission (C et D)

D'après Georges [31]

Les plaquettes, après activation, passe d'une forme discoïde (A) à une forme sphérique et possédant de nombreux prolongements (B). Ce changement s'accompagne d'une dégranulation et d'une réorganisation du cytosquelette.

En effet, alors que les plaquettes au repos possèdent des granules réparties sur l'ensemble du cytosol, lui-même soutenu par un réseau de tubuline (flèche bleue) (C), les plaquettes activées ont leurs granules réarrangés au centre de la cellule, aidé par le réarrangement de la structure du réseau de tubuline (D).

Ce changement de forme est rapide. En effet, l'hélice de microtubules, qui maintient la plaquette au repos en forme discoïde, se réorganise pour former de multiples petits microtubules allant du centre vers les extrémités de la cellule formant les pseudopodes [52].

L'hélice de microtubules peut aussi se retrouver au centre des plaquettes très étirées, notamment lorsqu'elles sont étalées, maintenant alors les granules en position centrale. Comme on l'observe dans la figure 13, le réseau d'actine se réorganise drastiquement et, de manière similaire au réseau de microtubules, émet principalement des filaments du centre vers les extrémités de la cellule [52],[54].

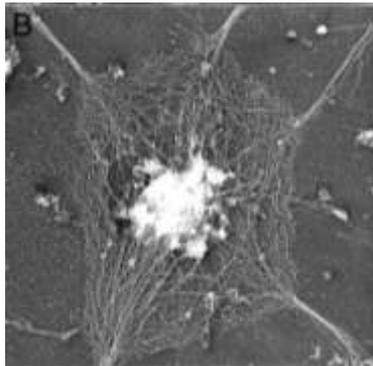


Figure 13 : Cytosquelette d'actine de plaquettes activées, observé au microscope électronique à transmission

De Hartwig *et al.* [52]

Le réarrangement du réseau d'actine des plaquettes activées se fait de manière similaire à celui observé pour le réseau de tubuline, aidant au réarrangement des granules au centre de la cellule et à l'extension des pseudopodes.

c. Agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est caractérisée par l'accumulation de plaquettes au sein du clou hémostatique. Le récepteur plaquettaire central dans ce processus est la GPIIb/IIIa, permettant la ligation des plaquettes entre elles par des ponts de fibrinogène. Une plaquette au repos possède entre 40000 et 50000 complexes GPIIb/IIIa à sa surface [49]. Dans son état non activé, cette intégrine ne peut pas fixer les ligands solubles tels que le fibrinogène plasmatique, le vWF, la thrombospondine, la fibronectine ou la vitronectine. C'est seulement lors de l'activation plaquettaire (signal « inside-out »), par l'intermédiaire de la sécrétion de granules α , que le nombre de GPIIb/IIIa membranaire va augmenter et changer de conformation afin de permettre la fixation de ces ligands solubles [49]. Le fibrinogène qui est alors fixé aux plaquettes stimulées devient un substrat adhésif pour les plaquettes au repos par

la GPIIb/IIIa menant à l'amplification de l'agrégation primaire [107]. Dans des situations de forces de cisaillement très élevées, l'activation et l'agrégation plaquettaire peuvent être uniquement provoquées par le cisaillement. Dans ce cas, les plaquettes sont d'abord couplées par le complexe GPIb/V/IX grâce à des ponts de vWF. Cette interaction provoque l'activation de la GPIIb/IIIa permettant ainsi de stabiliser l'agrégation plaquettaire vWF dépendante par le signal « inside-out » [108].

C. L'impact de l'activation plaquettaire

Lors de leur activation, les plaquettes vont subir diverses modifications du cytoplasme pouvant mener à la sécrétion du contenu de leurs granules menant alors à la surexpression membranaire d'un nombre important de molécules membranaires d'adhésion ou d'activation. Les plaquettes semblent aussi capables de synthèse protéique *de novo* par utilisation de leur « pool » d'ARNm non épissés, patrimoine provenant des MK. En parallèle, les plaquettes activées peuvent libérer deux types de vésicules membranaires : les exosomes et les microparticules (microvésicule plaquettaire) [109].

Ces phénomènes représentent le cycle « classique » de l'activation plaquettaire, mais plusieurs groupes ont montré que l'activation plaquettaire n'était pas aussi binaire. Les travaux de Voss *et al.* par exemple, montrent par microscopie électronique que des plaquettes humaines pouvaient s'agréger *in vivo*, donc s'activer, sans aucun changement de forme, ni aucune dégranulation [110]. Ils montrent de plus qu'aucune corrélation n'est visible entre l'agrégation plaquettaire et la quantité absolue de plaquettes CD62P-positive observée en cytométrie en flux. En effet, l'activation plaquettaire ne semble pas être toujours corrélée avec l'augmentation de CD62P membranaire [111],[112],[113],[114]. Ils montrent qu'il peut y avoir une forte augmentation de GPIIb/IIIa à la surface ainsi qu'une agrégation sans augmentation de CD62P. Les travaux de Michelson *et al.*, sur trois modèles plaquettaires différents, vont aussi dans le même sens [114]. En effet, que ce soit sur des plaquettes de babouins activées *in vitro*, des plaquettes humaines récupérées lors d'intervention coronaires ainsi que sur des plaquettes humaines prélevées lors d'infarctus sévère du myocarde, ils montrent aucune variation de CD62P membranaire à la surface de ces plaquettes.

1. Les facteurs solubles plaquettaires

a. Un panel diversifié de cytokines/chimiokines et facteurs de croissance

Les plaquettes sanguines sont un réservoir considérable de cytokines, chimiokines ou encore facteurs de croissance, contenus dans les différents granules [115]. En effet, les granules plaquettaires sont riches en molécules sécrétoires, en plus des facteurs solubles permettant la deuxième vague d'activation plaquettaire (ADP, Thrombine). Les granules contiennent également de nombreuses molécules membranaires, parmi lesquelles on retrouve la GPIIb/IIIa, le CD62P et le CD40L. Ces deux dernières molécules sont des cas particuliers car, après s'être retrouvées à la membrane plasmique après activation, elles sont rapidement clivées afin d'être sous une forme soluble et circulante : le sCD62p et le sCD40L. Ainsi, on retrouve 95% du sCD40L sanguin dont l'origine est plaquettaire [116]. En plus de ce réservoir, les plaquettes sont capables de réabsorber des quantités importantes de protéines plasmatiques [117]. Les plaquettes contiennent, notamment [8],[115],[118] :

- Des modulateurs inflammatoires et immuns :
 - histamine, sérotonine
- Des lipides inflammatoires et immunomodulateurs :
 - TxA₂, PAF (Platelet-Activating Factor)
- Des facteurs de croissance :
 - PDGF, TGF-β, FGF, VEGF, angiopoïétine
- Des chimiokines :
 - NAP2 (Neutrophil-Activating Protein-2), PF4, RANTES, MIP-1α (Macrophage inflammatory protein 1α)
- Des peptides antimicrobiens :
 - thrombocidine
- Des cytokines :

- IL-1 β , HMGB1 (High-mobility Group Protein B1), IL-7
- Des facteurs immunomodulateurs
 - sCD40L, sCD62P

Cette liste est loin d'être exhaustive et a pour seul but de montrer le rôle de potentialisateur immun des plaquettes. Lorsqu'elles sont activées, elles libèrent donc différentes classes de facteurs solubles qui peuvent être des signaux pour les cellules cibles, notamment les cellules de l'immunité innée mais aussi des cellules de l'immunité adaptative (voir paragraphe I.D) [119],[120]. Beaucoup de ces facteurs plaquettaires sont des protéines ou des polypeptides qui sont stockés dans une forme épissée ou sous forme de précurseurs afin d'être rapidement sécrétés. D'autres facteurs peuvent être produits par synthèse *de novo* après activation plaquettaire [121].

Les plaquettes libèrent de nombreuses chimiokines de type CXC et CC, synthétisées dans les MK et stockées dans les granules α . Il est intéressant de voir que les plaquettes expriment aussi les récepteurs de plusieurs chimiokines qu'elles sécrètent, pouvant potentiellement établir des boucles autocrines et paracrines bidirectionnelles. Parmi les chimiokines de type CXC, les premières identifiées sont le PF4 et la β -TG tandis que la chimiokine de type CC majoritaire est le RANTES [8].

b. ARNm et épissage alternatif : synthèse de novo dans une cellule anucléée

Dans les cellules nucléées, l'épissage est une partie importante de la régulation génique. En effet, les ARN pré-messager (pré-m) produits dans le noyau contiennent des séquences codantes (exons) et non-codantes (introns). L'épissage va ensuite permettre de ne garder que les séquences codantes voulues et permet avec un seul ARN pré-m de créer plusieurs protéines différentes. Cette étape a lieu dans le noyau, de manière co-transcriptionnel, par un complexe nommé le spliceosome. L'épissage consiste donc à exciser les séquences non-codantes du pré-ARNm et à lier les exons flanqués pour produire un ARNm mature et traduisible [122]. Le

spliceosome est un complexe qui est composé de 5 petites ribonucleoprotéines (snRNP), chacune contenant un petit noyau d'ARN (snRNA) et plusieurs protéines [123].

L'équipe de Weyrich a découvert la présence d'ARN pré-m dans les plaquettes [124]. Dans une cellule eucaryote, l'ARN pré-m est normalement transcrit dans le noyau puis immédiatement épissé. Il ne peut s'échapper du noyau à cause d'un système de régulation très performant, faisant intervenir un facteur d'exportation nucléaire (ALY) qui va interagir avec l'ARNm pendant la réaction d'épissage [122]. De plus, la stabilité des ARN messagers après épissage est normalement très faible [125]. Les ARN pré-m présents dans le cytoplasme plaquettaire proviennent donc des noyaux du mégacaryocyte et se retrouvent non-dégradés dans le cytoplasme des plaquettes grâce à un mécanisme encore inconnu. La même équipe a ensuite découvert la présence de composants du spliceosome dans les mégacaryocytes, les pro-plaquettes et dans les plaquettes matures, formulant alors l'hypothèse que les plaquettes sont capables d'épisser ces ARN pré-m. Ils ont également détecté des protéines associées au spliceosome (U2AF65 et SF2/ASF) dans ces trois stades de différenciation [126]. Ces résultats ont été confirmés par un groupe québécois qui est allé plus loin dans l'étude de la voie des ARN plaquettaire [127]. Ils montrent en effet que les plaquettes expriment les complexes Dicer et Argonaute 2, important dans la régulation de l'épissage. De plus, ils montrent que les plaquettes contiennent une quantité importante de microARN qui sont connus, dans les cellules eucaryotes, pour permettre la régulation de la transcription des ARNm.

Dans les plaquettes matures circulantes la traduction d'ARNm spécifiques, incluant celui de la cytokine interleukine IL-1 β , est réprimée jusqu'à une stimulation appropriée. Cette régulation doit se faire au niveau de l'épissage des ARN pré-m et des sites de contrôle de traduction. En effet, la majeure partie de l'ARNm de l'IL-1 β est sous forme non épissée, donc contenant des introns. Après ajout de thrombine, et donc activation plaquettaire, les séquences d'ARNm de l'IL-1 β sont majoritairement dépourvues d'introns, confirmant un phénomène d'épissage. La présence de séquences introniques dans les ARNm des plaquettes au repos, qui ne contiennent pas ou peu de la protéine IL-1 β , implique que les plaquettes activées doivent utiliser le spliceosome pour épisser le pré-ARNm en message traduisible, sans introns. Ceci est confirmé par la présence d'IL-1 β en grande quantité dans les plaquettes activées [126]. Ces observations prouvent qu'il y a un phénomène d'épissage dépendant du signal de l'ARN pré-m de l'IL-1 β conduisant à la traduction de ces ARNm matures, expliquant l'augmentation d'IL-1 β

observée depuis longtemps après stimulation plaquettaire par la thrombine (figure 14) [128],[129]. Landry *et al.* montrent que l'ARNm du récepteur à l'ADP (P2Y12) est retrouvé dans des précipitas d'Argonaute 2 [127]. La présence de ce récepteur dans un complexe d'épissage permet d'imaginer également une régulation de l'épissage en fonction de l'état d'activation (ADP-dépendant ici).

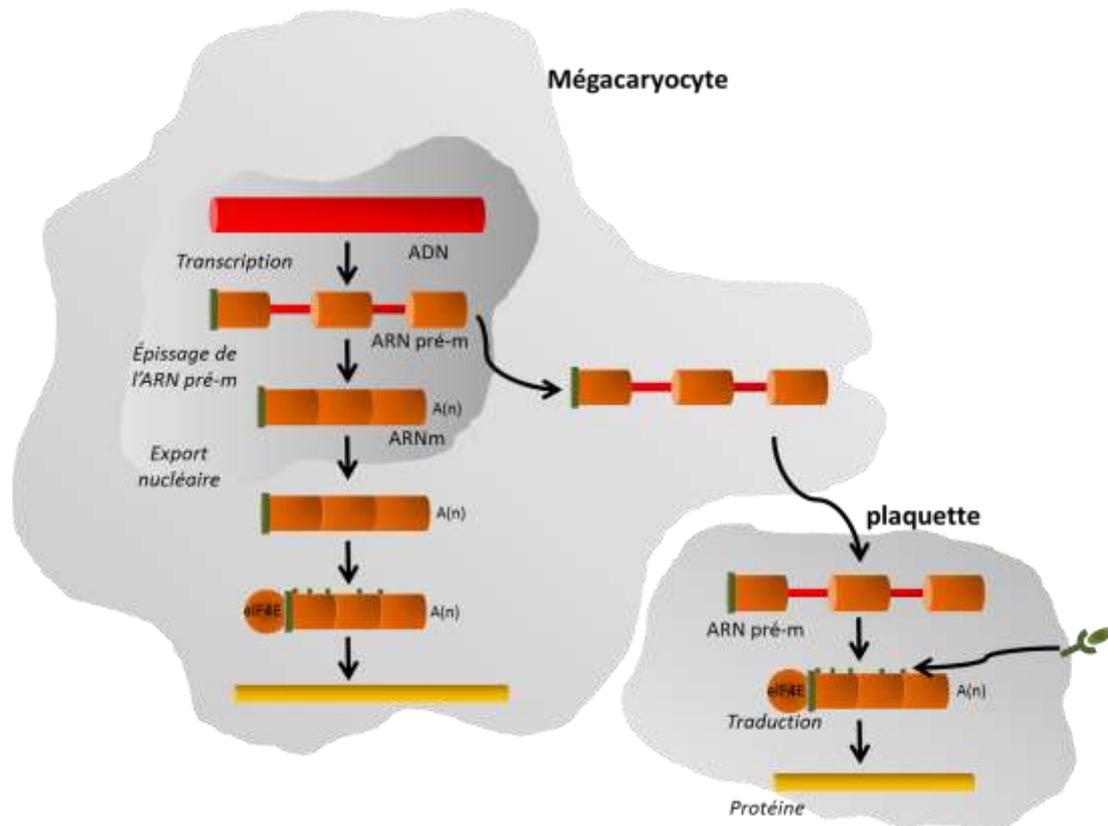


Figure 14 : Schéma de la traduction *de novo* plaquettaire

D'après Weyrich *et al.* [121]

Le MK, à gauche du schéma, va produire ses protéines de manière similaire à ce qu'il se passe dans les autres cellules eucaryotes : transcription de l'ADN en ARN pré-m, épissage de l'ARN pré-m en ARNm qui est exporté du noyau jusqu'au cytoplasme où il sera mûré puis traduit en protéine. Mais, le NK peut exporter ses ARN pré-m et ainsi les transmettre aux plaquettes qu'il produit. Au sein des plaquettes, l'ARN pré-m sera épissé puis mûré pour être traduit en protéine. L'épissage dans les plaquettes des ARN pré-m en ARN matures est provoqué et/ou renforcé par l'activation des plaquettes.

L'équipe de Weyrich et Zimmerman a remarqué que la localisation intracellulaire de protéines et d'autres facteurs d'épissage change en réponse à l'activation par la thrombine. Ils pensent que le spliceosome plaquettaire peut être partitionné en région spécifique à l'intérieur de la cellule. Enfin, l'isolation d'extrait compétent dans l'épissage plaquettaire confirme que ces cellules anucléées possèdent un spliceosome fonctionnel [126].

L'équipe de Weyrich a donc identifié un nouveau mode d'expression génique indépendant du noyau pour lesquelles les cellules eucaryotes peuvent rapidement modifier leur « pattern » d'expression en réponse à des stimulations endogènes. En effet, ils montrent dans des études non publiées que le profil d'expression de certaines protéines (dont Bcl-3) peut varier en seulement 5 min. Ils montrent aussi que, pour les mégacaryocytes, l'épissage peut être non couplé à la transcription.

Dans les plaquettes quiescentes la traduction d'ARNm mature, comme l'IL-1 β , est réprimée jusqu'à ce que les cellules soient activées. L'épissage de l'ARN pré-m est signal-dépendant et les effecteurs intracellulaires du spliceosome pourraient reconnaître les signaux « outside-in » [130].

En plus d'être transcrit mais non épissé, l'ARNm pré-m de l'IL-1 β est distribué dans le cytoplasme des mégacaryocytes matures pour être embarqué dans les plaquettes. Ceci est très surprenant étant donné la faible durée de vie, dans les cellules nucléées, des ARNm non matures [131]. Les plaquettes et les mégacaryocytes semblent avoir développé un système permettant d'éviter cette dégradation et de stocker les ARNm pré-m dans le cytoplasme en attendant une activation cellulaire suivit d'un épissage et d'une traduction de ces ARNm. Divers auteurs ont démontré la présence en grande quantité dans les plaquettes d'ARNm dérivés des mégacaryocytes qui sont stablement exprimés et, dans certains cas, traduisibles [124],[132],[133].

Enfin, le phénomène permettant au spliceosome de se retrouver dans le cytoplasme n'est pas encore déterminé. Le groupe de Weyrich a constaté que l'enveloppe nucléaire des mégacaryocytes contenant des proplaquettes est ultrastructurellement intact, diminuant l'hypothèse d'une lyse nucléaire au moment de la différenciation plaquettaire. De plus les composants du spliceosome sont présents dans le noyau des mégacaryocytes malgré la

formation de proplaquettes, prouvant que ces éléments ne se retrouvent pas plus tard dans le cytoplasme de manière non régulée. Les 2 hypothèses les plus probables expliquant la présence du spliceosome dans le cytoplasme seraient une translocation du spliceosome par un export nucléaire régulé ou une localisation différentielle dans le cytoplasme par inhibition de l'import nucléaire post-traduction [126].

Récemment, Schubert et Devine ont confirmé la présence de synthèse plaquettaire *de novo*. Ils montrent que de nombreuses protéines sont synthétisées par les plaquettes après activation (thrombine ou collagène, en général), parmi lesquelles on retrouve : l'actine, l'albumine, le Bcl-3, le fibrinogène, la GPIIb/IIIa, le facteur tissulaire ou encore le vWF [134].

c. Le relargage des facteurs solubles

Les plaquettes sécrètent le contenu des granules, sans lyse cellulaire, par un processus d'extrusion des granules. Ce processus est nommé réaction de relargage [135]. En 1968, des études morphologiques effectuées par JG White, montrent que le relargage des granules par les plaquettes n'est pas usuel. En effet, il commence par une centralisation des granules après l'activation plaquettaire, contrairement à une exocytose classique qui commencerait par une fusion des granules à la membrane plasmique [136]. Cette observation tend à prouver un rôle direct du cytosquelette dans la centralisation des granules pour permettre une force contractile qui faciliterait le relargage du contenu granulaire dans l'OCS. Plusieurs études prouvent cependant que la sécrétion de ces granules ne serait pas dépendante d'un changement de forme des plaquettes [137],[138],[139].

La fusion membranaire est régulée à plusieurs niveaux. Au niveau de la membrane, des lipides spécifiques contribuent aux événements de fusion membranaire nécessaires pour la sécrétion. Au niveau des protéines membranaires, la fusion des membranes est orchestrée par une superfamille de protéines nommée SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor) qui forme une machinerie de fusion membranaire universelle [140]. Enfin, un troisième niveau de régulation est fourni par une série de protéines chaperonnes qui se fixent aux SNARE et modulent leurs activités pour faciliter la fusion membranaire. Ces trois niveaux sont à leur tour régulés par une variété de voies de signalisations. Ces signaux mènent à des modifications post-

traductionnelles de la machinerie de fusion membranaire et à des interactions protéines-protéines qui facilitent la sécrétion des granules [141].

Il existe 2 catégories de SNARE, les v-SNARE, localisés sur la membrane des vésicules ou des granules, interagissant avec les t-SNARE, localisés sur la membrane cible (même s'il est maintenant montré que la localisation des SNARE n'est pas aussi restreinte) ; les 2 types de SNARE ayant des interactions de type « coiled-coil », [142]. Une famille de SNARE, nommée VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein) ou synaptobrevine a d'abord été décrite comme v-SNARE. Les familles de syntaxines et de SNAP-23 étaient quant à elles décrites comme t-SNARE. La formation du Complexe Cœur Exocytique (ECC) par les SNAREs de membranes opposées est une étape importante de la fusion membranaire (figure 15) [143].

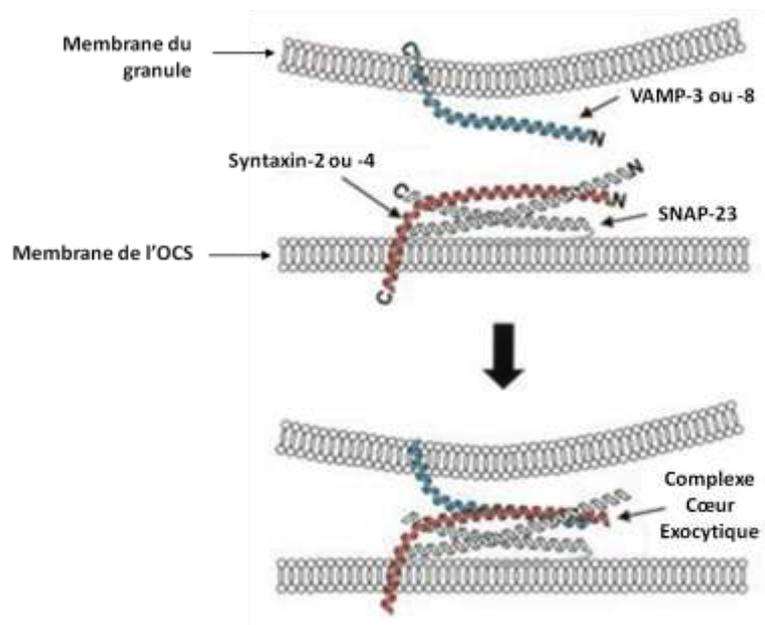


Figure 15 : Schéma de mécanisme de fusion des granules à la membrane, implication des protéines SNARE.

D'après Flaumenhaft [141]

La fusion des granules plaquettaires à la membrane de l'OCS se fait par l'intermédiaire de liaison de type coiled-coil entre les protéines SNARE. On voit ici l'interaction entre les v-SNARE VAMP3 ou 8 et les t-SNARE SNAP-23 et Syntaxine 2 ou 4.

Les protéines SNARE et l'ECC ont été décrits dans les plaquettes [144]. Les plaquettes contiennent les t-SNARE syntaxin-2, -4, -7 et SNAP-23 et comme v-SNARE, VAMP-3 et VAMP-8. VAMP-3, SNAP-23 et Syntaxin-4 forment un ECC trimérique qui semble essentiel à la médiation de la sécrétion des granules [141]. Les protéines SNARE permettent une base moléculaire de fusion de la membrane des granules avec, soit la membrane plasmique, soit la membrane de l'OCS, soit la membrane d'autres granules [141].

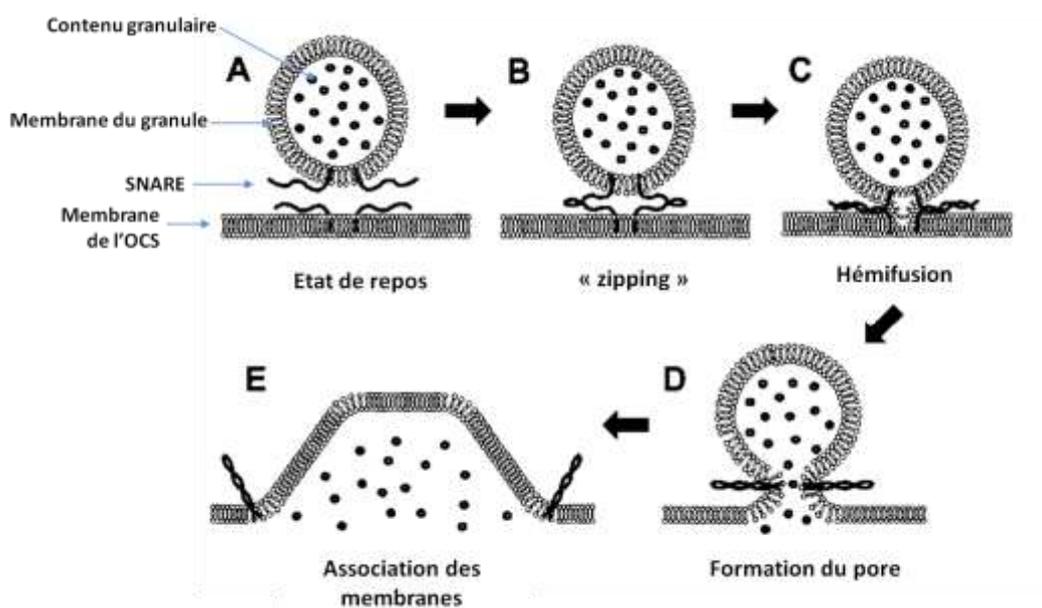


Figure 16 : La fusion de membranes lors de la sécrétion du contenu des granules

D'après Flaumenhaft [141]

(A): A l'état de repos, 2 bicouches lipidiques intactes peuvent être adjacentes l'une à l'autre sans fusionner à cause de répulsions électrostatiques. (B): Les protéines SNARE situées sur les bicouches opposées vont initialement interagir par les domaines « coiled-coil » N-terminus et progressivement se zipper ensemble. (C): L'interaction des protéines SNARE permet l'hémifusion entre les 2 bicouches opposées. (D): Les membranes hémifusées sont instables ce qui provoque la formation d'un pore de fusion. (E): Quand le pore de fusion est formé, le contenu des granules est libéré et les membranes sont mélangées.

La fusion membranaire implique la formation d'un pore de fusion qui représente le site initial de contact entre les membranes externes et celles des granules (figure 16). Le pore de fusion s'agrandit rapidement jusqu'à ce que, dans de nombreux cas, la membrane du granule

soit complètement incorporée à la membrane plasmique, au niveau de l'OCS. Plusieurs granules peuvent aussi fusionner entre eux pour former une large vacuole [141].

La formation du pore pour la sécrétion des granules plaquettaires nécessite la fusion de 2 membranes lipidiques. La fusion des 2 bicouches dans un environnement aqueux nécessite une énergie suffisante pour contrecarrer la répulsion électrostatique et les forces d'hydratation entre les 2 membranes [145]. Les 2 composants lipidiques qui semblent impliqués dans cette fusion membranaire sont le PA (Phosphatidic Acid) et le PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). Cependant, le rôle potentiel du PA dans la fusion membranaire n'a pas encore été déterminé. Une hypothèse est que le PA servirait à courber les membranes altérées permettant de créer le site d'attachement et d'initier la signalisation [146]. Le PIP₂ est synthétisé dans la plaquette de manière dépendante de l'activation grâce aux PIP-Kinases. Le rôle du PIP₂ dans la sécrétion de granules plaquettaires a été mis en évidence par différentes études [147],[148]. De plus, de nombreuses protéines impliquées dans le trafic membranaire et dans la réorganisation du cytosquelette contiennent des domaines de fixation au PIP₂ [149]. Ces protéines pourraient interagir avec le PIP₂ par des séquences cationiques linéaires ou des domaines d'interactions protéiques spécifiques. Le PIP₂ inhibe aussi la diffusion latérale des protéines SNARE dans les membranes lipidiques, ce qui pourrait faciliter le recrutement des protéines SNARE au niveau des rafts [150],[151]. De plus, le rôle central de PIP₂ dans le remodelage de l'actine pourrait aussi contribuer à son influence sur la sécrétion de granules [141]. Ces 2 molécules doivent donc interagir de manière coordonnée pour faciliter la fusion membranaire.

Beaucoup de protéines chaperonnes ont été décrites pour se fixer directement ou non aux protéines SNARE ; une faible fraction de ces protéines mais importante sur le plan fonctionnel ont été trouvées dans les plaquettes, et une majorité de celles-ci ont un rôle dans la sécrétion de granules [141]. La protéine chaperonne majeure de la sécrétion plaquettaire est la NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor). C'est une ATPase hexamérique qui est essentielle pour de nombreuses formes de trafic membranaire, ce qui inclut la sécrétion régulée de granules. Des travaux *in vitro* utilisant le blocage de NSF (par anticorps bloquant) ont prouvé

qu'il y avait des défauts de relargage des granules denses, α et des lysosomes [152],[153]. L'inhibition de NSF va entraîner la séquestration des protéines SNARE qui seront donc incapables d'interagir avec les protéines SNARE de la membrane opposée [154]. D'autres chaperonnes, notamment de la famille des protéines Rab, sont importantes dans cette régulation [155].

Des études d'ultrastructures ont montré que la sécrétion des plaquettes est fondamentalement différente de ce qui est observé dans les cellules nucléées [156]. Dans les plaquettes au repos, les granules α et denses sont distribués de façon apparemment aléatoire dans le cytoplasme. Lors de l'activation, les plaquettes vont subir une forte réorganisation de leur forme. Les granules s'unissent dans le centre de la plaquette et fusionnent avec l'OCS. Ils fusionnent ensemble et aussi avec la membrane plasmique. Le contenu des granules est alors libéré dans l'OCS et diffusé dans l'environnement extracellulaire (figure 17) [157]. Enfin, plusieurs travaux, dont les nôtres, montrent que le relargage du contenu granulaire par les plaquettes activées est modulé par le stimulus [158],[159]. Cependant, le phénomène permettant cette régulation n'est pas encore connu.

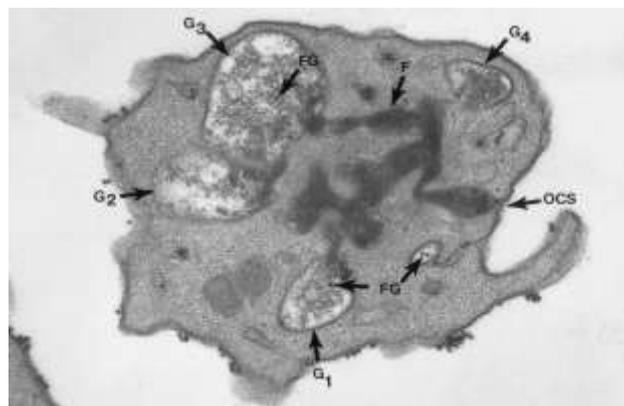


Figure 17 : Observation de l'OCS

De White et Krumwiede [4].

Lors de l'activation plaquettaire, les granules (G1 à G4) vont alors fusionner et libérer leur contenu dans l'OCS qui est relié au milieu extracellulaire.

Le calcium a un rôle important dans la sécrétion par les granules. En effet, une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire accompagne la sécrétion de granules [147]. La sécrétion peut être provoquée dans des plaquettes perméabilisées en augmentant la concentration en Ca^{2+} intracellulaire [160]. Enfin, la PKC (Protein Kinase C) est impliquée dans la sécrétion dépendante et indépendante du Ca^{2+} [160]. Elle phosphoryle de nombreuses protéines importantes pour les plaquettes, pouvant notamment provoquer la sécrétion par des granules [161],[162].

d. Les microvésicules plaquettaires (MVP)

Lors de l'activation, les plaquettes peuvent aussi relarguer des microparticules, dérivant de la membrane plasmique. Ces MVP mesurent environ 0,1 à 1 μm de diamètre et expriment notamment le CD62P et la GPIIb/IIIa [163]. Les MVP adhèrent à une grande variété de cellules, peuvent activer les cellules endothéliales, les leucocytes ainsi que les plaquettes elles-mêmes, et les MVP sont capables de délivrer des signaux via des cytokines qu'elles contiennent, notamment le RANTES [164],[165]. De plus les MVP semblent être chargées en CD40L qui serait présent sous une forme plus active que la forme soluble habituellement libérée par les plaquettes (voir paragraphe I.D.1.a) [166]. Enfin, les MVP, comme les autres microvésicules, peuvent fusionner avec les membranes de la cellule cible et déverser leur contenu au sein de cette cellule cible.

Les MVP peuvent donc stimuler directement des plaquettes, des cellules hématopoïétiques, des lymphocytes ainsi que des cellules endothéliales. Elles peuvent aussi transférer, par fusion avec la cellule cible, des récepteurs plaquettaires (GPIIb/IIIa, CXCR4), des ARNm plaquettaires, des protéines, voire même des particules et agents infectieux [167],[168].

2. Effets indésirables liés aux produits plaquettaires délivrés lors d'une transfusion sanguine

Au cours de leur conservation, quelques plaquettes en fin de vie physiologique et quelques plaquettes agressées ou stressées par le processus de récupération vont être lysées, libérant leur contenu en produits membranaires et intra-cytoplasmiques mais aussi sur-exprimant à la membrane plasmique de nombreux récepteurs. Des équipes dont la nôtre ont clairement mis en évidence que le sCD40L plaquettaire était associé de façon notable à des accidents aigus transfusionnels [169],[170].

Préalablement, un certain nombre d'équipes dont la nôtre ont aussi mis en évidence que les plaquettes conservées sous forme de concentrés plaquettaires en vue d'être transfusées à des patients libéraient, au cours de leur conservation, un grand nombre de produits assimilables aux cytokines et chimiokines, à activité soit inflammatoire soit immunomodulatrice, et bioactifs. Ces produits sont libérés chacun selon une dynamique particulière, mais en majorité proportionnelle à la durée de la conservation des produits, avec fréquemment un pic à 3 jours après prélèvement [63], [115].

Au total, en dehors du principal principe actif d'un concentré plaquettaire, c'est-à-dire les plaquettes elles-mêmes, le patient reçoit, dans des proportions différentes en fonction du mode de préparation des concentrés plaquettaires et de la présence ou non de SSP, différents produits « non nécessaires » pouvant avoir des effets indésirables. On peut par exemple trouver :

- Quelques hématies résiduelles, pouvant être le cas échéant immunisantes via des antigènes non homologues avec le patrimoine génétique du receveur même si on cherche dans la mesure du possible à respecter la compatibilité cellulaire et plasmatique ABO, et cellulaire RH1.
- Quelques leucocytes résiduels ($<10^6$ pour un produit conforme), pouvant eux aussi sécréter et libérer des produits inflammatoires, et pouvant allo-immuniser le patient dans les groupes HLA de classe I et HNA [171].

- Des produits inflammatoires comme déjà décrits, dont le chef de file est le sCD40L mais, comme nous sommes en cours d'en finaliser l'étude, de nombreuses autres cytokines et chimiokines. Cela peut rendre compte de certains effets secondaires mineurs, mais possiblement aussi majeurs, rencontrés pendant ou au décours de transfusions de concentrés plaquettaires, même si ceux-là sont relativement rares par rapport à ce qu'ils étaient avant la leucoréduction systématique des PSL. Une hypothèse posée par notre laboratoire pour rendre compte de l'aspect exceptionnellement aigu de l'accident inflammatoire post-transfusionnel (après transfusion de concentrés plaquettaires) serait que certains donneurs seraient hyper-producteurs, et/ou que certains receveurs seraient hyper-répondeurs à ces produits inflammatoires. Cependant, nous n'excluons pas la possibilité de polymorphismes soit des produits, soit des récepteurs aux produits sécrétés.

Enfin, d'après les dernières observations du groupe de Weyrich, les plaquettes seraient capables de se « multiplier » lorsqu'elles sont mises en culture ou dans certaines solutions de conservation [36]. Il n'existe pas de numération avant la transfusion mais il semblerait intéressant de vérifier si, dans les solutions de conservation utilisées, les plaquettes sont capables de se diviser, augmentant alors leur nombre et ainsi la quantité de facteurs solubles sécrétables (notamment le sCD40L).

D. Le rôle des plaquettes dans l'immunité et l'inflammation

Le répertoire moléculaire spécialisé ainsi que les diverses fonctions d'intégrité du Soi, de défense mais aussi et surtout de réparation font des plaquettes des éléments sanguins uniques. Elles sont rapidement déployées sur le site de la lésion et de l'inflammation en étant localement activées (figure 18) [172]. De ce fait, elles peuvent être considérées comme des cellules sentinelles comme le sont, dans une autre mesure, les mastocytes, les macrophages et les cellules dendritiques.

En plus de leur rôle dans l'hémostase, décrit précédemment dans ce manuscrit, des études prouvent que les plaquettes peuvent s'agréger sur le lieu de l'invasion bactérienne, s'accumuler dans les zones inflammatoires et cibler les tissus susceptibles aux réponses inflammatoires médiées par présentation antigéniques. Cette agrégation plaquettaire ciblée sur les pathogènes infectant va aider la clairance de l'organisme par le système immunitaire [8]. La réponse plaquettaire, que l'on croyait seulement simple, mais efficace, dans l'hémostase, est en fait extrêmement complexe et ciblée lors de réponses inflammatoires.

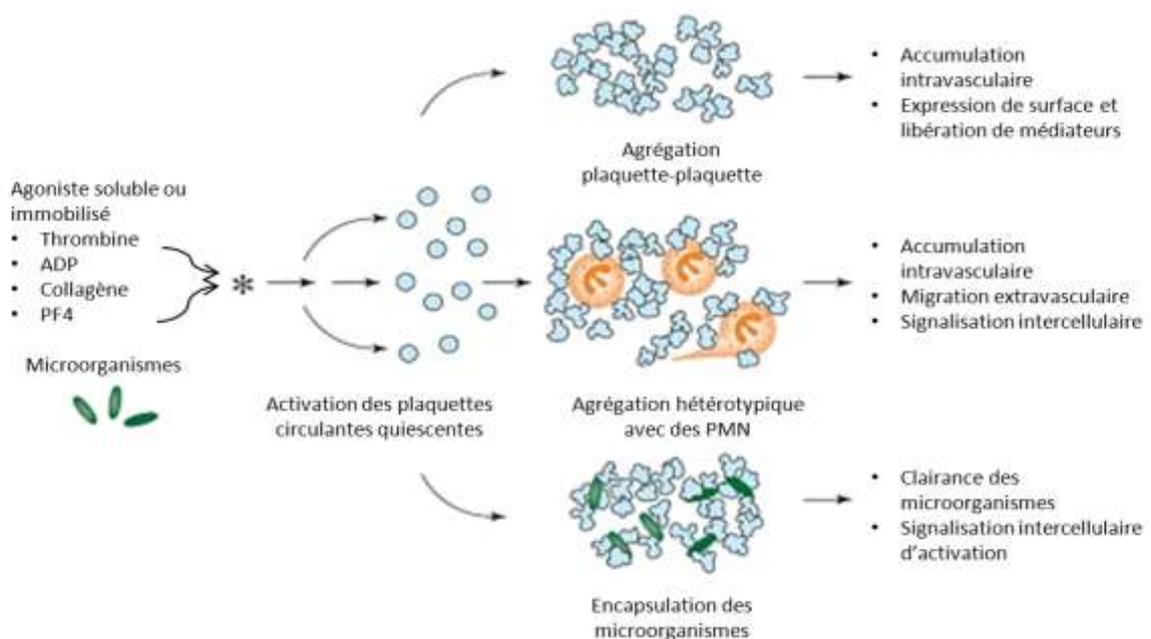


Figure 18 : Les plaquettes sont au centre de l'immunité

D'après Weyrich *et al.* [8]

Après un contact avec un agoniste ou des microorganismes, les plaquettes peuvent s'activer ce qui va leur permettre de s'agréger entre elles ou de s'agréger hétérotypiquement avec d'autres cellules environnantes ou enfin de lier les microorganismes directement voire même de les encapsuler.

Les plaquettes peuvent interagir avec les cellules de l'immunité soit par diffusion de facteurs solubles, soit par contact direct cellule-cellule, soit par ces deux mécanismes simultanément. Les plaquettes peuvent produire des molécules impliquées dans la réponse adaptative comme FasL, TRAIL, IL-7 et le CD40L. Le rôle de FasL et de TRAIL au sein des

plaquettes n'a été que faiblement étudié, cependant ils sont connus pour être des inducteurs potentiels de l'apoptose des cellules cancérigènes ou infectées [173]. Leur production locale par les plaquettes activées pourrait donc être importante dans la réponse anti-tumorale ou anti-infectieuse [174]. L'acteur majeur des interactions entre les plaquettes et les autres cellules de l'immunité est le couple CD40/CD40L, reconnu depuis longtemps pour induire de multiples réponses inflammatoires et immunitaires [175].

1. Les interactions entre les plaquettes et les cellules de l'immunité

a. Les plaquettes et le couple CD40/CD40L, lien entre l'immunité innée et adaptative

Dans la grande majorité des cas l'immunité innée est suffisante pour la clairance des pathogènes. Cependant, l'immunité adaptative doit fréquemment être initiée pour contrôler et résoudre une agression menaçant l'intégrité cellulaire et tissulaire de l'individu. La réponse initiale à l'infection de pathogènes est l'inflammation. Celle-ci se caractérise par le recrutement et l'activation de neutrophiles, de monocytes et de macrophages qui vont relarguer ou provoquer le relargage par les cellules endo/épithéliales de cytokines, chimiokines mais aussi de substances vasoactives qui va augmenter l'inflammation et la production leucocytaire [176]. Cette réponse initiale innée peut entraîner la stimulation de la présentation d'antigènes principalement par les cellules dendritiques. L'activation des cellules T en réponse à cette présentation antigénique est effective seulement en présence d'un deuxième signal nommé co-stimulation. En l'absence d'un de ces 2 signaux le lymphocyte T CD4+ ne sera pas activé [177].

Le signal de co-stimulation nécessite souvent l'interaction de molécules de la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor) et notamment du couple CD40/CD40L [178]. Le CD40L est connu pour être à l'origine de la commutation isotypique des Immunoglobulines produites par le lymphocyte B activé T-dépendant [179]. L'expression du CD40L sur les cellules T CD4+ activées va augmenter le processus de maturation des cellules dendritiques, évènement central pour le développement de l'immunité adaptative.

Les études effectuées par l'équipe de Ratliff au Canada montrent que le CD40L plaquettaire possède un rôle majeur dans le lien entre immunité innée et adaptative [118]. En effet le CD40L plaquettaire fournit le second signal nécessaire à l'induction de la commutation isotypique, bien avant l'expansion des Ly.T Helpers. Cette commutation est primordiale pour passer d'une réponse immunitaire peu spécifique, principalement IgM, à une réponse très spécifique, majoritairement IgG. De plus, par des études sur des souris « Knock-Out » pour le CD40L, l'équipe de Ratliff montre que le CD40L plaquettaire est capable d'augmenter l'activité cytolytique de Ly.T CD8+ en réponse à une stimulation par un adénovirus [180]. Cette réponse n'est pourtant pas capable de remplacer les Ly.T helpers, producteurs de CD40L. En effet la réponse due au signal CD40L plaquette-dépendant est brève et ne pourrait donc pas être effective à long terme. Cependant, les plaquettes sont très rapidement activées et sont les pourvoyeurs principaux de sCD40L dans la circulation sanguine. Elles pourraient donc être un outil du système immunitaire pour rapidement renforcer une réponse adaptative et donc la maturation des cellules B [174],[181].

Il est intéressant de constater que le CD40L plaquettaire sécrété l'est majoritairement sous la forme de MVP. D'autres travaux du groupe de Ratliff ont démontré que le CD40L plaquettaire sous forme MVP est capable d'induire une production d'ARNm (codant pour MCP-1) par les Ly.B alors que l'ajout de CD40L soluble « classique » ne l'est pas, concluant ainsi que le CD40L contenu dans les MVP l'était sous une forme très active [174]. Cette observation a été ensuite confirmée par une étude de prolifération de Ly.B *in vitro* après ajout de CD40L. Lorsque les MVP sont l'unique source de CD40L, la production d'IgG est augmentée et la formation de centre germinatif est rétablie *in vivo* [174].

b. Les autres interactions entre les plaquettes et les cellules de l'immunité

i. Plaquettes et lymphocytes

La première observation de l'interaction entre plaquettes et lymphocytes a été faite il y a plus de 100 ans, même si la majorité des connaissances est très récente [182]. Constamment,

les lymphocytes migrent entre la circulation et le réseau lymphatique. Comme pour les autres leucocytes, la migration lymphocytaire sur l'endothélium vasculaire est effectuée par la fixation et le roulement, grâce aux interactions entre le CD62P plaquettaire et le CD162 lymphocytaire, puis par l'adhésion forte des lymphocytes grâce à leurs intégrines permettant alors la transmigration [183]. Comme le montre la figure 19, l'influence des plaquettes sur toutes les sous-populations lymphocytaires est multiple.

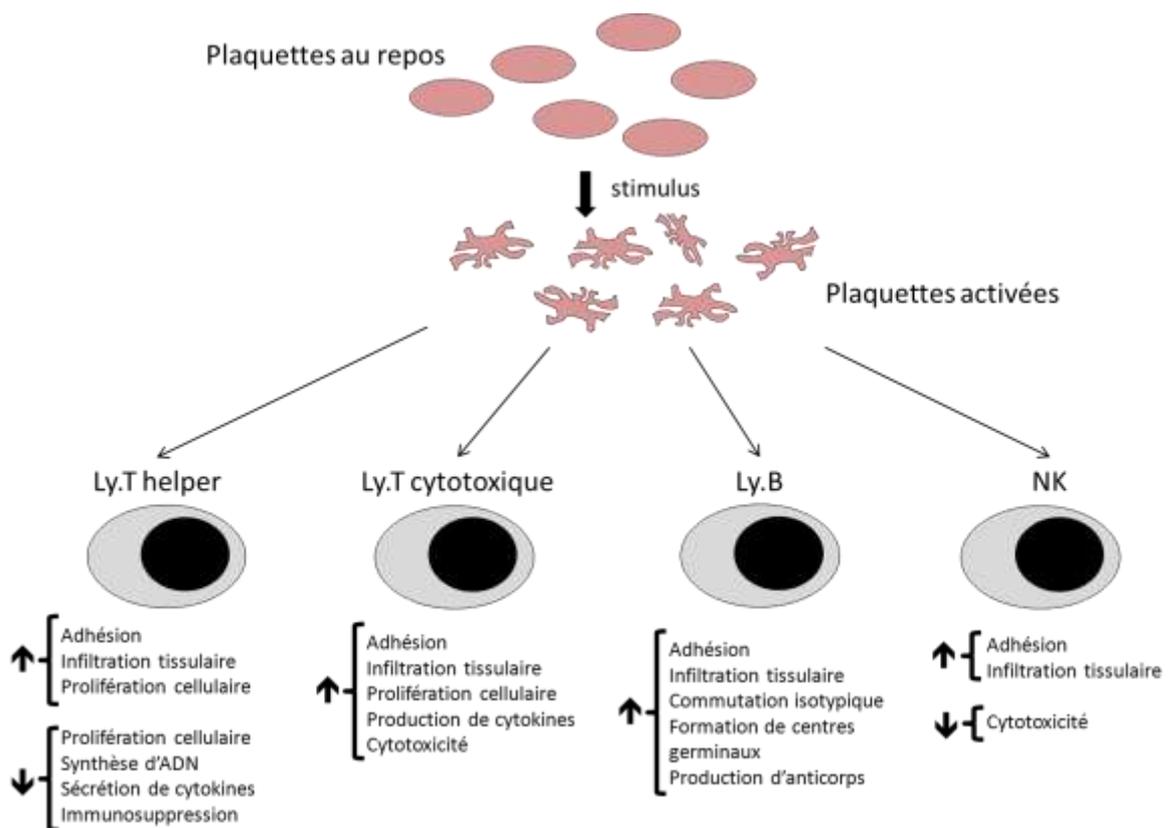


Figure 19 : Impact des plaquettes sur la physiologie lymphocytaire

D'après Li *et al.* [183]

Après activation, les plaquettes peuvent agir de manière directe ou indirecte sur les différentes classes de lymphocytes.

D'une manière générale, les Ly.T ont de meilleures capacités d'adhérence aux autres cellules que les Ly.B [184]. Cette observation est d'autant plus vraie pour les Ly.T γ/δ et les Ly.T helpers via le CD62P mais aussi le CD40L ou la GPIIb/IIIa, molécules fortement exprimées par

les plaquettes [185]. L'influence des plaquettes sur la migration lymphocytaire semble ne pas s'arrêter là. En effet, dans des modèles animaux, les plaquettes activées, accrochées aux veinules endothéliales des ganglions lymphatiques, peuvent stopper les lymphocytes circulants. Les plaquettes activées peuvent aussi se fixer sur les lymphocytes circulants et permettre le « homing » de ces lymphocytes aux niveaux des ganglions lymphatiques [186]. D'autres études ont confirmé un impact des plaquettes sur le « homing » lymphocytaire [187],[188],[189].

Les plaquettes peuvent moduler plusieurs activités des Ly.T par le PF4 qui peut se fixer à leur surface, même si les récepteurs impliqués ne sont pas encore déterminés [190]. L'influence du PF4 est même différente suivant la population de Ly.T. Alors que le PF4 inhibe la prolifération des cellules CD4+CD25⁻ (Ly.T, non-T reg), il augmente la prolifération des CD4+CD25⁺ (Ly.T reg), mais en faisant perdre aux Ly.T reg leur capacité d'inhibition de la prolifération lymphocytaire [191]. Les plaquettes exposent de nombreux récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines, notamment des IgE, IgA et IgG, qu'elles fixent très facilement. Lorsque les plaquettes sont recouvertes d'IgE, elles peuvent fixer des allergènes ce qui entraîne une sécrétion forte de sérotonine par les plaquettes permettant une réaction T-dépendante [192]. Les plaquettes semblent aussi avoir une influence sur les Ly.T cytotoxiques (Ly.Tc) en augmentant la production d'IFN- γ ainsi que les capacités cytotoxiques des Ly.Tc, notamment via le CD40L [180].

Parallèlement aux études sur les Ly.T, plusieurs équipes travaillent sur l'influence des plaquettes sanguines sur les Ly.B. Là encore, le couple CD40L/CD40 est fortement étudié, notamment pour sa capacité d'activation des Ly.B mais aussi et surtout sa capacité à provoquer le switch isotypique d'IgM à IgG, primordial dans l'augmentation de la spécificité des réponses immunitaires. Cette observation a été confirmée par le fait que les souris KO pour le CD40L ou le CD40 sont incapables de produire des anticorps dont l'isotype varie selon le signal du Ly.T, ni d'avoir des Ly.B mémoire alors que le taux d'IgM reste constant. Cette déficience peut alors être corrigée par le transfert adoptif de plaquettes provenant de souris « wild-type », prouvant ainsi que le CD40L plaquettaire peut-être un moyen d'activer les réponses des Ly.B mais n'est pas nécessaire dans le cas où le CD40L des Ly.T est abondant [180].

Ceci montre l'importance du « cross-talk » entre les plaquettes et les Ly.B pour deux raisons. Tout d'abord, la signalisation dépendante du CD40L plaquettaire, lorsqu'il est sécrété sous forme de MVP, peut permettre la maturation de la réponse anticorps bien avant l'action des Ly.T helpers, producteurs de CD40L. De plus, les Ly.T spécifiques d'un antigène donné sont très rares dans des conditions physiologiques, les plaquettes pourraient alors augmenter le signal requis pour le développement de l'immunité B [183].

Cependant, il semble probable que les interactions entre les lymphocytes (T et B) se fassent à distance, via les éléments sécrétables plaquettaire. Le groupe de Ratliff postule que les MVP relarguées par les plaquettes, chargées notamment en sCD40L, pourraient rejoindre les ganglions lymphatiques via la transmigration de cellules de Langerhans [174]. D'autres molécules pourraient avoir un rôle notamment le RANTES ou l'IL-7 plaquettaire, pouvant aussi activer les lymphocytes T [193].

Enfin, les Natural Killers (NK), population de lymphocytes spécialisés dans l'immunité anti-tumorale, sembleraient être influencés de différentes manières par les plaquettes sanguines [194]. Certaines tumeurs peuvent provoquer une agrégation plaquettaire, souvent corrélée avec une croissance de la tumeur [195]. Aussi, le blocage de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire va alors atténuer la croissance et la migration de la tumeur [196]. Cette action négative des plaquettes sur la croissance tumorale a été confirmée par Palumbo *et al.* en 2005 [197]. Ces auteurs montrent que les plaquettes, notamment par le fibrinogène, peuvent augmenter le potentiel métastatique de cellules tumorales emboliques en empêchant la clairance tumorale par les cellules NK. Les plaquettes activées peuvent aussi adhérer aux NK [183]. Enfin, les plaquettes adhérentes à l'endothélium peuvent fixer et permettre le roulement des NK, ce qui entraîne alors leur transmigration [198].

Parallèlement à l'influence des plaquettes sur les lymphocytes, beaucoup d'équipes étudient l'influence des lymphocytes sur les plaquettes et l'activation de ces 2 types cellulaire semble réciproque.

Les plaquettes sont riches en récepteurs au fragment Fc des IgE. Ainsi, les plaquettes possèdent des fonctions effectrices antiparasitaires dépendantes des IgE. La fixation des IgE induit la libération plaquettaire de médiateurs cytotoxiques non tous définis, ayant une action forte sur des parasites comme en particulier les schistosomes [199],[200]. Il a été montré que cette fonction effectrice des plaquettes est différenciellement régulée par des cytokines provenant de diverses sous-populations de Ly.T. Par exemple, les Ly.T helpers sécrètent de l'IFN- γ , du TNF- α et du TNF- β , provoquant l'induction ou l'augmentation de la cytotoxicité plaquettaire IgE-dépendante, à l'inverse des Ly.Tc qui sécrètent des substances inhibitrices comme l'ubiquitine [201],[202],[203].

L'IFN- γ peut également augmenter la sécrétion de granules denses plaquettaires (sérotonine), ainsi que l'adhésion des plaquettes avec les leucocytes [204]. De plus, l'IL-2, sécrétée par les Ly.T, semble atténuer l'agrégation plaquettaire tout en augmentant la sécrétion des granules α (PF4), preuve que la libération du contenu granulaire plaquettaire n'est pas strictement dépendante de l'agrégation [205].

ii. Plaquettes et monocytes

Les plaquettes activées peuvent se fixer aux monocytes et aux polynucléaires neutrophiles (PMN) et alors libérer du RANTES qui peut induire la production de cytokines (MCP-1 et IL-8) par les leucocytes cibles [193],[206]. Cette fixation s'effectue via une interaction entre le CD62P plaquettaire et le CD162. Cette interaction délivre en parallèle le signal « outside-in » déjà décrit [206].

D'une manière parallèle aux interactions plaquettes-PMN, les interactions plaquettes-monocytes jouent un rôle dans le ciblage de ces leucocytes au site de la lésion, mais résultent aussi en une agrégation hétérotypique et en une signalisation intercellulaire menant à l'induction de nombreux gènes codant pour des cytokines, des chimiokines mais aussi des molécules d'adhésion, observée par analyse transcriptomique (MIP-1 α , MCP-1, IL-8, IL-1 β et UPAR (Urokinase Plasminogen Activator Receptor) par exemple) [207].

Weissmuller *et al.* montrent que lors d'une pathologie des muqueuses (inflammatory bowel disease), un infiltrat important de monocytes et de PMN est souvent présent. Ils ont constaté que la concentration plaquettaire locale était aussi fortement augmentée. Or, les

plaquettes seules ne semblent pas capables de migrer à travers les cellules endothéliales. Par contre, ils montrent que les plaquettes se déplaceraient au sein des muqueuses en se fixant sur d'autres cellules, notamment les monocytes et les PMN [208]. Plusieurs équipes, dont la nôtre, essaient aujourd'hui de comprendre si cette transmigration plaquettaire est un phénomène actif ou passif, et ainsi comprendre l'intérêt de la présence de plaquettes au sein de muqueuses, qu'elles soient respiratoires ou digestives.

iii. Plaquettes et cellules dendritiques

Les DC permettent le lien entre immunité innée et adaptative. Le CD40L et l'IL-1 β plaquettaires semblent être des signaux de danger endogènes importants pour les DC [180]. Dans des conditions inflammatoires, des tests *in vitro* ont montré que le CD62P de plaquettes activées pourrait influencer la maturation de DC [209].

Cependant, l'influence des plaquettes sur les DC semble être dépendante de la nature des interactions. En effet, nous avons montré que, en co-culture *in vitro*, les plaquettes et les DC interagissent par l'intermédiaire du couple CD62P plaquettaire, CD162 des DC. Cette interaction ne semble pourtant pas entraîner d'activation des DC. Mais, en culture *in vitro* de plaquettes et de DC séparés par un filtre de 0,4 μ m, les plaquettes favorisent alors la maturation des DC [210].

iv. Plaquettes et polynucléaires neutrophiles

L'équipe de Jackson en 1983 observait, dans un modèle d'injection intradermique d'endotoxine sur des lapins, que les PMN pouvaient charrier des plaquettes, et notamment les transporter jusqu'au site de l'inflammation [211]. Lorsque les PMN adhèrent aux plaquettes immobilisées au site de la lésion, certaines chimiokines de type CXC vont permettre l'adhésion et l'activation des leucocytes [206]. Les chimiokines plaquettaires de type CXC peuvent aussi déclencher des réponses des PMN lorsqu'elles s'agrègent, notamment des modifications de phagocytose bactérienne ou de dégradation intracellulaire [212]. Parmi ces chimiokines, on peut citer le PF4 et la β -TG, deux molécules ayant des structures proches. Ils sont reconnus par les récepteurs (PF4-R et CXCR-1 ou -2) sur les PMN et entraînent soit une activation, soit une

inhibition, suivant le peptide qui se fixe ainsi que sa concentration [213]. En effet, le PF4, à une concentration inférieure à 4 μ mol/L, va avoir un effet chimiotactique qu'il perd si la concentration est supérieure. Dans le cas de la β -TG, son activité semble être régulée par protéolyse et sa composition peptidique va entraîner soit une activation soit une inhibition, même si ce mécanisme n'est pas encore totalement compris [213].

Dans le cas du sepsis, infection sanguine bactérienne, les interactions entre les plaquettes et les neutrophiles ont beaucoup été étudiées. Les plaquettes semblent notamment responsables de la production de Neutrophil Extracellular Traps (NET), réseau d'ADN et d'histones que les neutrophiles libèrent afin de capturer les bactéries responsables de sepsis [214].

2. Les interactions entre les plaquettes et les agents pathogènes

Comme elles sont rapidement présentes au site de la lésion, et donc d'une potentielle infection, les plaquettes sont aujourd'hui bien décrites comme les premières cellules immunitaires au contact avec le pathogène au cours d'une infection systémique. D'une manière générale, une infection est souvent liée à une thrombocytopénie, qui peut être signe d'une sévérité accrue. De plus, les nombreuses molécules contenues dans leurs granules font des plaquettes des cellules clés. Comme expliqué précédemment, les plaquettes peuvent activer les autres cellules de l'immunité innée mais aussi adaptative. Pour cela, elles doivent pouvoir : 1) détecter le pathogène, 2) le cibler (et l'éliminer si possible) et 3) prévenir les autres cellules de l'infection mais surtout du type d'infection [215].

Les plaquettes sont aujourd'hui connues pour interagir avec tous les types de pathogènes, que ce soit virus, champignons, parasites ou bactéries. Mais ils n'interagissent pas tous de la même façon et les plaquettes peuvent s'activer ou non.

a. Plaquettes et bactéries

De manière générale, les effets des bactéries sur les plaquettes peuvent impliquer 3 mécanismes différents [216]. Dans le premier cas, la réponse inflammatoire dirigée contre le pathogène provoque la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les leucocytes menant à l'activation plaquettaire. Deuxièmement, les bactéries peuvent sécréter des molécules activatrices des plaquettes. Enfin, les bactéries peuvent se retrouver fixées aux plaquettes de manière directe (contact entre une protéine de surface bactérienne et un récepteur plaquettaire) ou indirecte (une protéine ou un complexe protéique plasmatique se fixant aux bactéries ainsi qu'aux plaquettes) [217].

Les réponses immunitaires leucocytaires contre les infections bactériennes sont accompagnées de la libération, par les PMN, de cytokines pro-inflammatoires dans le sang circulant. Les plaquettes expriment de nombreux récepteurs à ces cytokines, notamment les récepteurs à l'IFN γ , à l'IL-1 ou encore à l'IL-8 [115]. De plus, comme il a été montré lors de paragraphes précédents, les plaquettes et les leucocytes sont capables de s'activer mutuellement, pouvant mener à l'adhésion plaquettaire à l'endothélium, à l'agrégation homo ou hétérotypiques, et à la dégranulation plaquettaire (paragraphe I.D.1) [10], [218].

Les bactéries peuvent aussi activer directement les plaquettes par l'intermédiaire de toxines bactériennes. Dans le cas d'infection par *S. aureus*, la virulence est souvent liée à la concentration d' α -toxine libérée par ces bactéries. Bayer *et al.* ont montré que l' α -toxine provoque, *in vitro*, une sécrétion de MVP par les plaquettes [219]. De plus, ils montrent que l'augmentation de la concentration en α -toxine provoque un relargage supérieur de MVP. Cependant les travaux effectués sur l'impact direct des bactéries sur les plaquettes sont principalement des études de contacts directs, de type ligand-récepteur.

De nombreux travaux montrent qu'un contact direct entre plaquettes et bactéries conduit à une agrégation et une activation plaquettaire, c'est le cas pour *S. aureus*, *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis* et *E. coli* (tableau 1) [10],[215],[216]. Pourtant, il est intéressant de constater qu'en présence de *S. epidermidis* ou de *Streptococcus pneumoniae*, les plaquettes ne vont que faiblement s'activer et s'agréger de manière non irréversible, montrant une influence de la souche bactérienne sur la réponse plaquettaire [218]. Des travaux des années 70 réalisés

par JG White montraient déjà que les plaquettes fixaient les bactéries, changeaient de forme, s'agrégeaient faiblement puis s'agrégeaient irréversiblement [220]. Étant donné la vitesse de changement de forme des plaquettes après le contact bactérien, il semblerait qu'il y ait une interaction directe qui sera explicitée ultérieurement (voir chapitre III).

Plus récemment, Youssefian *et al.* ont montré que les plaquettes pouvaient internaliser des bactéries et des virus (*S. aureus* et VIH) de manière active [61]. Cette internalisation est liée à une activation plaquettaire car seules les plaquettes activées semblent pouvoir internaliser ces pathogènes. Cependant, le devenir de ces pathogènes internalisés n'est pas encore connu. Comparé aux phagocytes, il n'est pas certain que les plaquettes puissent dégrader les pathogènes, ne serait-ce qu'en partie. La question aujourd'hui est de savoir si cette internalisation est un phénomène actif des plaquettes afin d'amener les pathogènes à d'autres cellules immunitaires ou pour aider à la dégradation de ces pathogènes, ou plutôt un phénomène actif du pathogène lui permettant de se réfugier au sein d'une cellule du Soi afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte [61].

Après ces contacts, les plaquettes peuvent donc s'activer et libérer leur contenu granulaire. Les plaquettes contiennent un arsenal de peptides antibactériens. Les plaquettes peuvent libérer leur contenu dans le milieu sanguin extracellulaire et probablement au sein des tissus, comme le font habituellement les granulocytes. De ce fait, elles contiennent peu de molécules ayant un effet local voir même interne. Ces peptides sont regroupés sous le terme de Protéines Microbicides Plaquettaires (PMP) et de kinocidines plaquettaires (PK). Les PK ont cette désignation pour leur double fonction de chimiotactisme et de microbicides. Parmi les PK on retrouve notamment le PF4, le PBP (Platelet basic protein), l'IL-8 et le RANTES. Il est intéressant de constater que ces PK, en se retrouvant dans la circulation sanguine et en contexte infectieux, peuvent être clivés pour former d'autres PK. Par exemple, la thrombine est connue pour cliver le PF4 et ainsi libérer l'hélice- α active en enlevant la partie servant au chimiotactisme [221]. On constate aussi que, comme l'agrégation, la dégranulation plaquettaire semble être aussi dépendante de la souche bactérienne ou de l'agoniste utilisé [215]. En effet, l'équipe de Yeaman aux États-Unis a démontré que des staphylocoques ou des toxines α

purifiées provenant de staphylocoques entraînent *in vitro* une libération d'un profil de peptides PMP spécifique, identifié à ce moment par HPLC [219]. Cependant, alors que des études ont été faites sur la modulation de l'agrégation plaquettaire en fonction du stimulus, il n'y a, à ce jour, pas de travaux prouvant une modulation de la sécrétion plaquettaire en fonction de l'agoniste.

Pathogène bactérien	Maladie vasculaire associée	agrégation ou adhérence plaquettaire	facteurs bactérien	facteurs de l'hôte
<i>Staphylococcus aureus</i>	IE	Augmente	CifA, CifB	Fibrinogène
				GPIIb/IIIa
				FcyRIIa
			FnbA, FnbB	IgG
				Fibrinogène
				fibronectine
				GPIIb/IIIa
				FcyRIIa
				IgG
	SpA	vWF		
SdrE	complément			
SraP, Efb	IgG			
Toxine-α	Non connu			
cicatrisation retardée	diminue	Efb	?	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	IE	Augmente	SdrG	Fibrinogène
<i>Staphylococcus capitis</i>	IE	Augmente	?	GPIIb/IIIa
				FcyRIIa
				IgG
<i>Streptococcus sanguis</i>	IE	Augmente	SrpA	GPIb
			PAAP	FcyRIIa
<i>Streptococcus agalactiae</i>	IE	Augmente	FbsA	Fibrinogène
<i>Streptococcus pyogenes</i>	IE	Augmente	Protéine M	IgG
				FcyRIIa
<i>Streptococcus gordonii</i>	IE	Augmente	GspB	GPIb
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	IE	Augmente	HsA	
			?	?
<i>Streptococcus mitis</i>	IE	Augmente	PbIA et PbIB	?
<i>Enterococcus spp</i>	IE	Augmente	Sm-hPAF	?
			?	?
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	IE	?	?	?
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IE	Augmente	PLC	?
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	IE	Augmente	Gingipains	FcyRIIa
			Hgp44	GPIbα
<i>Helicobacter pylori</i>	infarctus du myocarde	Augmente	?	vWF
				GPIb
				IgG
<i>Borrelia burgdorferi</i>	maladie de Lyme	Augmente	p66	GPIIb/IIIa
<i>Borrelia hermsii</i>	thrombocytopénie	Augmente	?	GPIIb/IIIa
<i>Haemophilus influenzae</i>	Infarctus du myocarde	?	?	?
<i>Actinobacillus</i>	IE	Augmente	?	?
<i>Candida spp.</i>	IE	Augmente	?	?
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	athérosclérose	Augmente	?	?
<i>Listeria monocytogenes</i>	IE	Augmente	?	?
<i>Bacillus anthracis</i>	hémorragie	diminue	toxine œdème facteur léthal	PKA voie de la MAPK

Tableau 01: Interactions connues entre agents bactériens et plaquettes sanguines

D'après Fitzgerald *et al.* [217]

Tableau résumant les interactions connues entre les agents bactériens et les plaquettes sanguines. Il montre les liens entre la souche bactérienne, la ou les maladies qui en découle(nt) et les facteurs impliqués. (IE : endocardite infectieuse)

b. Plaquettes et virus

En 1959, Danon *et al.* montraient par microscopie électronique que les plaquettes internalisaient des virus de la grippe [222]. L'interaction MK-plaquette/VIH a par la suite été grandement documentée. En effet, les MK expriment le CD4 ainsi que les co-recépteurs du VIH (CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR3, CCR5) [223]. Les plaquettes quant à elles expriment seulement certains co-recépteurs (CXCR4 fortement, CCR1 et CCR3) et les travaux de Youssefian *et al.* amènent à penser à un rôle actif des plaquettes [61],[87]. Cependant, l'équipe de White aux États-Unis a montré en 2005 que cette internalisation n'était pas dépendante du pathogène mais que, spontanément, les plaquettes pouvaient internaliser des particules [224]. Il note cependant que les particules se retrouvent alors en contact direct avec l'OCS. Sachant que le contenu granulaire est déversé dans l'OCS lors de l'activation plaquettaire, il est possible que cette internalisation, lorsqu'elle est liée à une activation, pourrait être un moyen pour les plaquettes de faire agir leurs molécules microbicides directement sur la cible.

Comme expliqué précédemment, le devenir de cette internalisation n'est pas connu. Cependant, les infections sont liées à des migrations plaquettaires jusqu'à la rate. Les plaquettes activées, riches en particules virales, se retrouveraient alors en dehors de la circulation et pourraient être éliminées par les macrophages résidants. Mais le rôle plaquettaire est versatile dans le cas de virus. En effet, les plaquettes activées vont relarguer du RANTES, une molécule anti-VIH mais aussi une chimiokine, et vont donc attirer d'autres cellules cibles du VIH sur le lieu de la lésion [225].

Les plaquettes expriment une grande quantité de récepteurs pouvant fixer des virus (figure 20). En effet, les plaquettes expriment le récepteur au complément de type II (CR2), aussi récepteur au virus Epstein Barr [226]. Le récepteur au collagène, GPVI, peut fixer le virus de l'hépatite C [227]. Les plaquettes possèdent aussi d'autres récepteurs antiviraux comme le CAR (Coxsackie-Adenovirus Receptor), CLEC-2 (C-type lectin-like protein-2) ou encore DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) dont l'implication dans l'infection VIH est encore débattue [225].

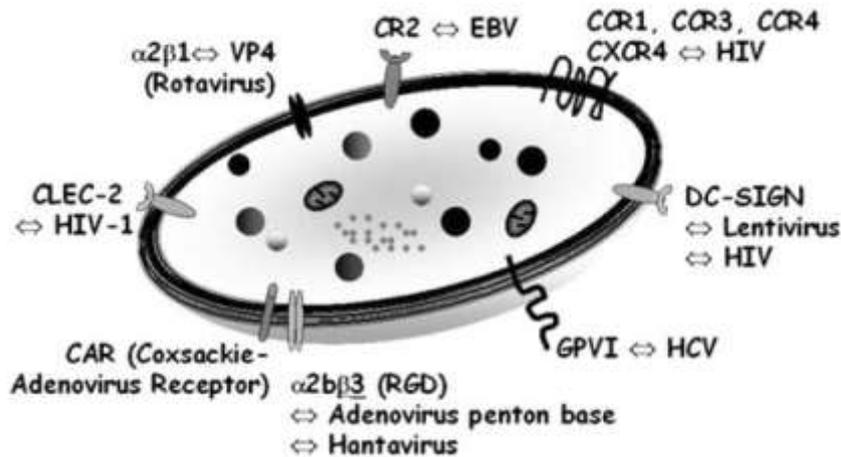


Figure 20: Vue d'ensemble de récepteurs plaquettaires impliqués dans les interactions plaquettes-virus

De Flaujac *et al.* [225]

Ce schéma représente les différents récepteurs, et leurs ligands associés, impliqués dans les interactions entre les plaquettes et les virus.

c. Plaquettes et parasites

Les interactions entre plaquettes et parasites ont principalement été étudiées par l'étude du paludisme, causée par le parasite *P. falciparum*. Comme lors de la plupart des processus infectieux, le paludisme entraîne une thrombocytopénie. Ce phénomène est d'ailleurs considéré comme un argument d'orientation pour les patients avec un état fébrile suspect [228]. Cette diminution de la numération sanguine est aussi liée à des états asymptomatiques de la malaria, ou à d'autres infections comme *P. vivax* ou *P. berghei* [229]. Récemment, il a été montré que des plaquettes purifiées pouvaient éliminer des parasites *P. falciparum* cultivés *in vitro* dans des globules rouges [230]. En effet, les auteurs observent une forte diminution de la charge parasitaire lors de co-culture de plaquettes et de globules rouges infectés par *P. falciparum*. De plus, la croissance du parasite est inhibée par les plaquettes de manière dépendant de l'ADP, principalement par une activation du récepteur plaquettaire P2Y1 [230].

Le rôle des plaquettes est différent, et multiple, suivant le parasite. En effet, dans le cas de la maladie de Lyme causé par *Borrelia burgdorferi*, la numération plaquettaire augmente

fortement contrastant avant la thrombocytopénie observée dans la majorité des infections. La GPIIb/IIIa est le récepteur majoritaire des spirochètes. Les plaquettes peuvent aussi tuer des trypanosomes, de manière plus faible que les macrophages/neutrophiles. Les plaquettes semblent aussi avoir un rôle protecteur en cas de schistosomiasis, mais aussi lors d'infection par *Echinococcus granulosus*. Le récepteur à l'IgE plaquettaire semble lui aussi jouer un rôle important, notamment car les réponses IgE antiparasitaires semblent impliquer une activation plaquettaire par les IgE [231].

Toutes ces observations demandent, là encore, de nombreux travaux complémentaires pour comprendre vraiment comment se comportent les plaquettes lors d'infections. Mais, il est important de constater le rôle central des plaquettes au cours du processus immunitaire. Non seulement elles peuvent interagir de différentes façons avec un nombre très important de pathogènes mais, en plus, toutes ces infections sont corrélées avec une variation de la numération plaquettaire. Cette variation de la quantité de plaquettes n'est pas totalement comprise, principalement parce qu'elle est pathogène-dépendante. Cependant, elle doit certainement avoir une signification, que ce soit en modifiant le ratio entre plaquettes et pathogènes, ou en déplaçant le pathogène hors de la circulation sanguine, dans un endroit où il sera en contact avec d'autres cellules de l'immunité. De plus, l'hétérogénéité des réponses plaquettaire est importante. Alors que certains pathogènes provoquent l'agrégation et ainsi que la dégranulation plaquettaire (*S. aureus* par exemple), d'autres peuvent être internalisés par les plaquettes (VIH), d'autres peuvent encore provoquer la libération de molécules inhibant la croissance du pathogène (*P. falciparum*). Ces travaux montrent ainsi que la réponse plaquettaire est sensiblement liée au pathogène ou à un ou plusieurs de ses composants, prouvant ainsi que le rôle plaquettaire dans l'immunité n'est pas restreint mais complexe et orienté sur le pathogène.

II) Toll-like receptors

A. Introduction

Les premiers concepts d'immunité innée décrivaient un phénomène non spécialisé de reconnaissance des microbes. C'est après la découverte des Toll-like receptors (TLR) par R. Medzhitov, que Janeway va démontrer pour la première fois que l'immunité innée possède finalement récepteurs spécifiques [232],[233],[234]. Ces molécules, proches des récepteurs de type « Toll » décrits précédemment chez la drosophile, sont intégrées dans la catégorie des PRR (Pattern-Recognition Receptor), dont la fonction est de détecter des motifs répétés et fonctionnels des pathogènes, nommés PAMP pour « Pathogen-Associated Molecular Patterns » [233],[235].

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I possédant : des ectodomains, en forme de fer à cheval, riches en Leucine (Leucine-Rich Repeat, LRR) permettant l'interaction avec les PAMP ; un domaine transmembranaire ; un domaine TIR (Toll-Interleukin-1 Receptor) intracellulaire fondamental dans la transduction du signal. À ce jour, 10 TLR sont décrits chez l'homme, contre 12 chez la souris [236]. De plus, le TLR11 humain a la particularité que le gène est présent mais non détecté chez l'homme [237]. Cependant il n'est pas exclu qu'il existerait sous une forme tronquée, et des travaux montrent que son ligand, la profiline, est reconnu chez l'homme par un récepteur aujourd'hui encore non défini [238]. Des analyses cristallographiques des ectodomains des TLR ont permis de comprendre de manière structurelle les interactions entre les TLR et les PAMP [239]. Ces derniers peuvent être des lipides, des lipoprotéines, des protéines ou des acides nucléiques provenant aussi bien de bactéries, virus, champignons ou parasites [240]. De plus, la reconnaissance des PAMP par les TLR peut se faire dans différents compartiments cellulaires, dont la membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes et les endolysosomes [240].

Alors que les TLR sont essentiels pour l'immunité, des réponses inappropriées peuvent provoquer des inflammations chroniques et aiguës, mais aussi des maladies auto-immunes.

Enfin, des molécules endogènes, provenant notamment de cellules en apoptose, semblent également pouvoir stimuler les TLR, provoquant ou accélérant alors une inflammation [236].

B. Description des différents TLR

Dans certaines classifications, les TLR sont répertoriés en 2 groupes suivant leur localisation cellulaire et leur ligand (tableau 2). Ces classifications sont soumises à controverse de par le statut un peu spécial de la localisation cellulaire des TLR, statut qui sera discuté par la suite. Néanmoins, c'est sous le terme de TLR membranaire ou intracellulaire que seront décrits les TLR dans ce manuscrit.

Composants microbiens	Espèces	TLR concerné
Bactéries		
Lipopolysaccharide	bactéries gram -	TLR4
lipopeptides diacyl	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
lipopeptides triacyl	bactéries et mycobactéries	TLR1/TLR2
LTA	<i>Streptococcus</i> de type B	TLR6/TLR2
Peptidoglycane	bactéries gram +	TLR2
Porins	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannane	mycobactéries	TLR2
Flagelline	bactéries flagellées	TLR5
Motifs CpG	bactéries et mycobactéries	TLR9
?	bactéries uropathogéniques	TLR11
Levures		
Zyosan	<i>Saccharomyces cerevesiae</i>	TLR6/TLR2
Phospholipomannane	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannane	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Glucoronoxylomannane	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 et TLR4
Parasites		
tGPI	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycoinositolphospholipides	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoine	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Profiline	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
Virus		
ADN	virus	TLR9
dsARN	virus	TLR3
ssARN	virus à ARN	TLR7 et TLR8
Protéines d'enveloppe	Virus Respiratoire Syncitial	TLR4
Hémagglutinines	virus de la Rougeole	TLR2
?	Cytomegalovirus, virus de l'Herpes	TLR2
Hôte		
Hsp 60, 70		TLR4
Fibrinogène		TLR4

Tableau 02 : panel des ligands des TLR humain

D'après Akira *et al.* [240].

Classification des ligands connus des TLR humains, suivants les espèces et les souches microbiennes.

Les TLR sont exprimés par dans de nombreuses cellules immunitaires, comme les macrophages, les DC, les Ly.B, certaines classes de Ly.T et les plaquettes. Ils peuvent aussi être exprimés dans des cellules considérées comme des cellules non immunitaires mais participant à l'immunité, notamment les fibroblastes ou les cellules épithéliales [240]. D'une manière

générale, et notamment par leur rôle de cellules présentatrices d'antigène, les modèles cellulaires les plus utilisés sont les cellules dendritiques et les macrophages.

1. Structure et ligands des TLR membranaires

Le premier groupe de TLR comporte les TLR 1, 2, 4, 5 et 6. Ils sont exprimés à la surface cellulaire et reconnaissent principalement des composants des membranes bactériennes (figure 21). Ils sont principalement présents à la surface des macrophages et des DC myéloïdes.

a. TLR4

Le TLR4 a été le premier TLR humain identifié. C'est un récepteur au LPS, composant majeur de la membrane des bactéries gram-négatif, fortement impliqué dans les chocs septiques [240]. Le TLR4 forme un complexe avec la molécule MD-2 à la surface cellulaire, permettant alors la fixation du LPS (figure 21). D'autres protéines peuvent aider à la fixation du LPS, comme la LPB (LPS-Binding Protein) et le CD14. D'autres ligands du TLR4 ont été décrits, notamment la protéine de fusion du virus syncytial respiratoire [241], le taxol (molécule anti-tumorale) [242] ou encore la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae* [240], sans compter les nombreux agonistes endogènes (tableau 2). L'importance et la situation particulière du TLR4 sera discuté ultérieurement.

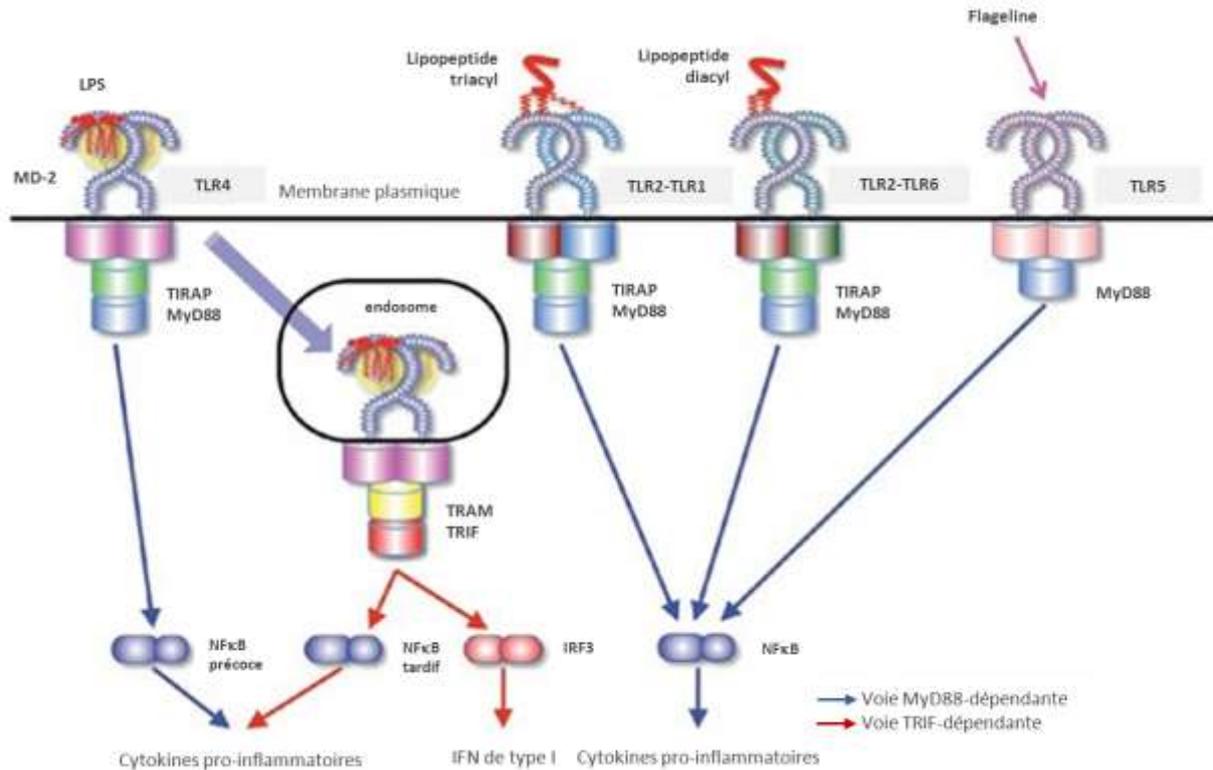


Figure 21 : Les TLR membranaires, leurs ligands et les voies de signalisation

D'après Kawai et Akira [236]

Représentation simplifiée des TLR membranaires humains dans une cellule eucaryote. Après fixation des ligands, les TLR recrutent différentes protéines adaptatrices qui vont alors permettre le déclenchement d'une voie de signalisation menant à l'activation de facteurs de transcription nucléaire. Seul le TLR4 peut utiliser 2 voies de signalisation.

b. TLR1, TLR2 et TLR6

Le TLR2 est impliqué dans la reconnaissance d'une très grande quantité de PAMP. Parmi ces ligands se trouvent les lipopeptides bactériens, le peptidoglycane (PGN) et l'acide lipoteichoïque (LTA) des bactéries gram-positif, le lipoarabinomannane des mycobactéries, le zymosan des champignons, le tGPI-mucine du parasite *Trypanosoma cruzi* ou encore l'hémagglutinine virale (tableau 2) [236]. Le TLR2 forme généralement des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6, le complexe TLR2-TLR1 permettant de reconnaître les lipopeptides triacétylés (bactérie gram-négatif et mycoplasme) alors que le complexe TLR2-TLR6 permet

plutôt la reconnaissance de lipopeptides diacétylés (bactérie gram-positif, mycoplasme) (figure 21). Des études structurales ont permis de comprendre le mécanisme de cette discrimination, qui se fait principalement via le canal hydrophobe présent sur le TLR1 et absent du TLR6 [243], [244].

Le TLR2 peut aussi interagir avec d'autres composants de la membrane plasmique comme la GPIV, dont l'absence, dans des souris « Knock-out », diminue la détection de certains agonistes du complexe TLR2-TLR6 (LTA par exemple) [245].

c. TLR5

Le TLR5 est exprimé faiblement sur les cellules épithéliales intestinales (CEI) et fortement sur les DC de la lamina propria, mais pas sur les autres DC. Son ligand est la flagelline, protéine majeure des flagelles bactériens (figure 21). L'interaction entre la flagelline et le TLR5 semble être directe [246]. Les études concernant le TLR5 sont assez controversées. Récemment, Shizuo Akira, à Osaka, a montré que les CEI ne produisent aucune cytokine pro-inflammatoire en réponse à une stimulation à la flagelline. De plus, il montre que les DC de la lamina propria stimulés par la flagelline produisent de l'IL-6 et de l'IL-12 mais pas d'IL-10 et du TNF- α comme cela avait été précédemment montré [247].

2. Les TLR intracytoplasmiques, spécifiques des acides nucléiques

Les TLR 3, 7, 8 et 9 sont exprimés dans des vésicules intracellulaires comme le réticulum endoplasmique, les endosomes, les lysosomes et les endolysosomes. Ils reconnaissent principalement des acides nucléiques microbiens (figure 22).

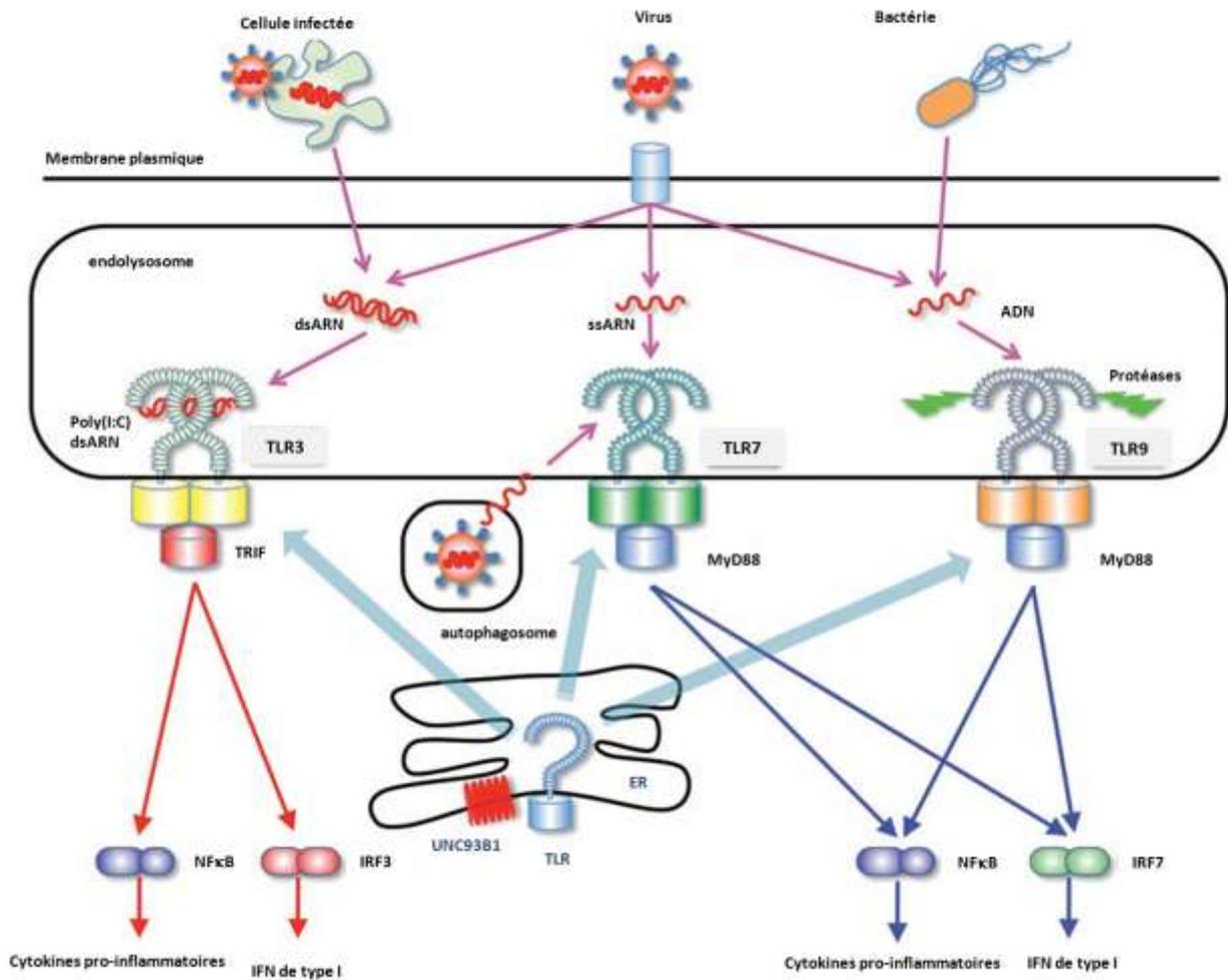


Figure 22 : Les TLR intracellulaires, leurs ligands et les voies de signalisation

D'après Kawai et Akira [236]

Représentation simplifiée des TLR intracellulaires humains dans une cellule eucaryote. Après fixation des ligands intracellulaires (généralement des acides nucléiques), les TLR recrutent différentes protéines adaptatrices, semblables à celles utilisées par les TLR membranaires, et vont alors permettre le déclenchement d'une voie de signalisation menant à l'activation de facteurs de transcription nucléaire.

a. Structure et ligands

i. TLR3

Le TLR3 a été originalement décrit comme reconnaissant un analogue synthétique d'ARN double brin (dsRNA), le polynosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)), servant à mimer les infections virales de virus à dsRNA (tableau 2) [248]. La structure du TLR3 a été cristallisée, ce

qui a permis de comprendre que le dsRNA se fixe grâce à une structure en fer à cheval de l'ectodomaine (figure 22) [248],[249]. En plus du poly(I:C), le TLR3 reconnaît l'ARN génomique des rétrovirus, le dsRNA produit pendant la réplication d'un virus à ARN simple-brin (ssRNA), certains virus (virus syncytial respiratoire, West Nile Virus) et certains petits ARN interférents [240]. La stimulation du TLR3 provoque la sécrétion d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires par les DC [250],[251].

ii. TLR7

Le TLR7, originalement identifié comme reconnaissant des dérivés d'imidazoquinoline comme l'imiquimode et le resiquimode (molécules utilisées dans le traitement d'infections cutanées à papillomavirus ou herpès), mais aussi des analogues de guanine comme le loxoribine, reconnaît des ssRNA provenant d'ARN viral (Influenza A, VIH) (tableau 2) [252],[253]. Le TLR7 peut aussi reconnaître des petits ARN interférents et des ARN poly(U) synthétiques [254]. Le TLR7 est fortement exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). La présence d'ARN viral va donc induire une production cytokinique (IFN- α) des pDC via le TLR7, ainsi qu'une forte production d'interféron de type I [240].

iii. TLR8

Le TLR8 est phylogéniquement très similaire au TLR7 et permet la reconnaissance des ssRNA viraux. Il est exprimé dans de nombreux tissus, encore plus fortement dans les monocytes [252].

iv. TLR9

Le TLR9 reconnaît les motifs ADN 2'-deoxyribo(cytidine-phosphate-guanosine) non méthylés, couramment nommés motifs CpG (tableau 2). Ces motifs sont fréquents dans les bactéries, les parasites et les virus mais très rares au sein des cellules eucaryotes. Les pDC expriment fortement le TLR9 qui sert alors de senseur à l'infection de virus à ADN, provoquant une réponse similaire à l'activation du TLR7 (IFN- α et interféron de type I) (figure 22) [252]. Les

Ly.B expriment aussi le TLR9, et son activation par des motifs CpG mène à la prolifération des Ly.B [255].

b. Localisation cellulaire

Les TLR senseurs des acides nucléiques sont localisés dans différents compartiments cellulaires. Des études ont montré que les TLR7 et 9 sont exclusivement séquestrés dans le réticulum endoplasmique dans les cellules non stimulées et vont rapidement migrer jusqu'aux endolysosomes après stimulation par des agonistes [239], [240],[256],[257]. Le TLR3 semble suivre la même migration même si le mécanisme de cette migration est encore inconnu [258]. De plus, le TLR9 a besoin d'être clivé par des endoprotéases intracellulaires au sein des endosomes afin de générer un récepteur fonctionnel [259].

Il est aussi important de noter que, et cela sera rediscuté plus loin, le TLR4 peut être membranaire et intracellulaire. Cette capacité d'être endocyté semble, pour l'instant, restreinte au TLR4, permettant la ségrégation entre les deux voies de signalisation du TLR4 (voir paragraphe III.I) [236].

C. Les mécanismes moléculaires de la transduction du signal

Comme pour les autres récepteurs tyrosine kinase, le mécanisme de transduction du signal par les TLR commence par la dimérisation ou l'oligomérisation induite par la fixation du ligand. Cette dimérisation provoque des changements conformationnels de l'ectodomaine et permet une interaction stable protéine-protéine entre les récepteurs [260],[261]. Il s'ensuit alors un nouvel arrangement des domaines TIR formant alors une structure qui peut fixer les différentes protéines adaptatrices. L'environnement électrostatique est très important dans cette configuration et c'est souvent une opposition de charge qui attire la protéine adaptatrice sur les domaines TIR nouvellement dimérisés [262].

L'analyse cristallographique de l'ectodomaine du TLR3 par Choe *et al.* a permis de mieux comprendre comment se passe ces interactions [248]. Ils ont notamment montré que le

domaine LRR se replie en solénoïde étendu. L'ectodomaine se comporte en monomère en solution mais deux molécules s'arrangent en dimère dans les cristaux utilisés pour déterminer la structure. Bell *et al.* ont montré que seulement deux résidus positionnés en C-terminal sont requis pour la fixation des dsRNA sur l'ectodomaine [249]. Ils suggèrent que le dsRNA pourrait être capable de « cross-linker » deux ectodomains TLR3 afin de former un complexe symétrique. Les interactions entre TLR2 et TLR1 ou 6 ont aussi été largement étudiées. Il semblerait que l'hétérodimérisation du TLR2 soit dirigé par la fixation du ligand, par exemple que la présence du lipopeptide triacétylé provoquerait une dimérisation entre TLR2 et TLR1 de manière asymétrique [263].

Chaque TLR mène à une réponse biologique spécifique qui peut varier suivant la cellule. Par exemple, dans les DC, les TLR2 et 4 peuvent générer des interférons de type I (IFN- α) ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , ou IL-1 β), contrairement aux TLR2 et 5 qui induisent uniquement des cytokines pro-inflammatoires [240]. Ces spécificités ont été expliquées par la découverte des protéines adaptatrices possédant un domaine TIR. Les TLR en possèdent 4, MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM, recrutées par différents TLR et activant différentes voies de signalisation :

- Le MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene (88)) a d'abord été décrit comme un gène responsable de réponse primaire de différenciation myéloïde [264]. Il a ensuite été décrit comme un adaptateur critique de la voie de signalisation du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) [265]. Comme les familles des IL-1R et des TLR possèdent des domaines TIR, les études concernant le MyD88 ont montré qu'il était aussi impliqué dans la voie de signalisation des TLR. Les souris déficientes en MyD88 sont résistantes aux chocs septiques induits par le LPS, et les macrophages déficients en MyD88 n'arrivent pas à produire des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) après induction au LPS, malgré leur capacité à activer le NF κ B (Nuclear Factor- κ B) [266]. De plus l'expression d'interférons de type I et les gènes induits par l'interféron ne sont pas modifiés dans les macrophages déficients en MyD88 [267]. Le MyD88 va aussi activer les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et alors induire la production de cytokines pro-inflammatoires [236].

- TIRAP (TIR domain containing Adaptor Protein) a été découvert grâce à une recherche informatisée pour des protéines contenant le domaine TIR [268]. Les études des souris KO en TIRAP ont montré un phénotype similaire aux souris KO pour le MyD88. TIRAP contient un domaine PIP₂, permettant son recrutement à la surface plasmique. TIRAP va alors faciliter l'association entre MyD88 et le domaine cytoplasmique du TLR4 pour initier la signalisation en aval du TLR4 [269].
- TRAM (TRIF-related adaptor molecule) a été découvert de la même façon, alors que TRIF a nécessité des approches multiples de clonage [270],[271]. Les études sur des souris KO pour TRAM et/ou TRIF démontrent un signal indépendant du MyD88. Par la suite, Rowe *et al.* ont montré que TRAM s'associe à la membrane plasmique et qu'il est essentiel pour la transduction du signal du TLR4 [269],[272].
- TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) est mis en jeu après engagement du TLR3 et du TLR4. Il induit donc une voie alternative menant à l'activation des facteurs de transcription IRF3 (Interferon regulatory factor 3) et NF- κ B et donc à l'induction d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires. TRAM et TIRAP sont des protéines adaptatrices qui vont recruter TRIF pour le TLR4 ou MyD88 pour les TLR2 et 4, orientant alors la réponse et permettant alors de différencier une voie MyD88-dépendante (cytokines pro-inflammatoires) et une voie TRIF-dépendante (Interférons de type I et cytokines pro-inflammatoires) [236].

D. Les voies de signalisation des TLR

Deux voies de signalisation peuvent être activées différemment suivant le TLR stimulé, dépendant de la (ou des) protéine(s) adaptatrice(s) recrutée(s). Seul le TLR4 peut transduire dans ces 2 voies de signalisation.

1. La voie MyD88-dépendante (figure 23)

En plus de contenir un domaine TIR, MyD88 contient aussi un domaine de mort (Death Domain, DD), celui-ci pouvant recruter d'autres protéines possédant un DD. Lors de la stimulation, le MyD88 est recruté par le TLR grâce à un changement de conformation des domaines TIR du dimère de TLR. Le MyD88 recrute et active une kinase possédant le DD, IRAK4 (IL-1 Receptor-Associated Kinase 4) [273]. IRAK4 est responsable du recrutement, de l'activation et de la dégradation d'IRAK1 [274]. Curieusement, le KO d'IRAK1 sur les macrophages ne va que partiellement diminuer l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β) après stimulation LPS, suggérant que d'autres molécules sont impliquées dans la médiation du signal en aval d'IRAK4. Des études récentes montrent qu'IRAK2 pourrait jouer un rôle dans la signalisation LPS/TLR4. En effet, IRAK1 et IRAK2 sont activés séquentiellement et l'activation simultanée des 2 est requise pour une activation forte de NF κ B et de MAPK [275].

TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6) est ensuite recruté au niveau du complexe membranaire et activé par IRAK1 ou 2 qui se fixent au domaine TRAF de TRAF6. Alors qu'IRAK1 va rester à la membrane pour ensuite être dégradé, TRAF6 va former un complexe avec TAB2 (TAK1 Binding protein 2) et TAB3 et alors activer TAK1 (Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1) [276]. TAK1 va ensuite activer les voies IKK (I κ B Kinase) et MAPK. Parmi les MAPK activées on peut retrouver Erk1, Erk2, p38 ou JNK [236]. IKK α , β , γ forment un complexe et phosphorylent la protéine I κ B (Inhibitor of κ light chain gene enhancer in B cells). Cette phosphorylation va mener à la dégradation d'I κ B et par conséquent permettre la translocation de NF κ B qui contrôle l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, en plus d'autres fonctions liées à des gènes de l'immunité (par exemple : transcription de l'IL-1, de l'IL-8, inhibition de l'apoptose) [269]. L'activation de la voie MAPK mène à l'induction d'autres facteurs de transcription, comme Erk ou JNK (figure 23) [236]. Cependant, NF κ B et MAPK sont toujours activés dans les macrophages déficients en MyD88, malgré un délai dans leur cinétique d'activation. Ceci suggère que ces 2 facteurs peuvent aussi être activés par une voie MyD88-indépendante, de manière retardée par rapport à la voie MyD88-dépendante [269]. En plus de NF κ B et MAPK, I κ B ζ et IRF5 (Interferon Regulatory Factor 5) sont 2 facteurs importants en aval de MyD88. En effet, I κ B ζ est un coactivateur inductible du NF κ B qui facilite l'induction

de l'IL-6 et de l'IL-12p40 dans les macrophages [277]. Il a été montré dans un modèle murin que IRF5 s'associe avec TRAF6 et pourrait être activé par des mécanismes encore inconnus [278].

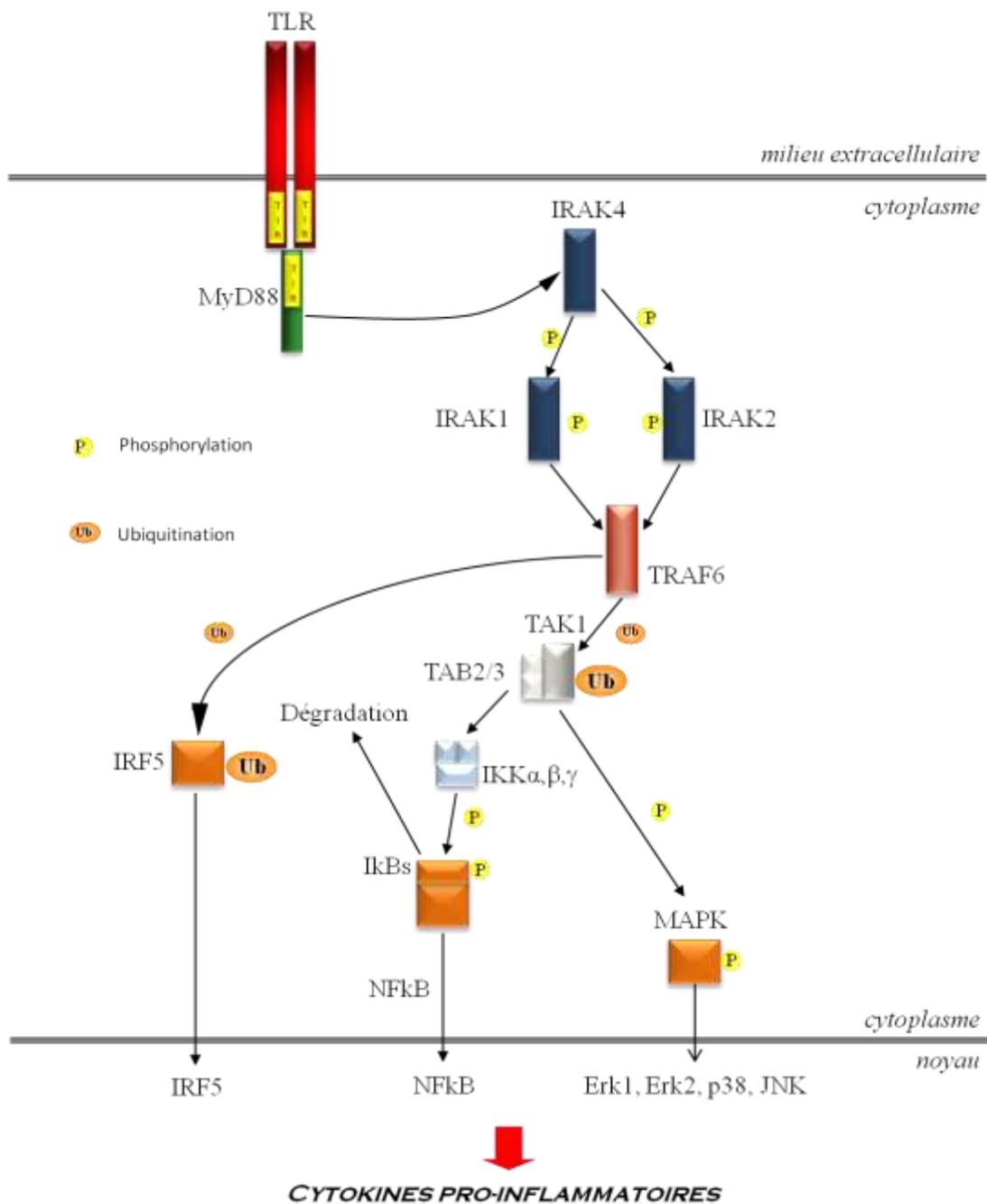


Figure 23 : Engagement des TLR et voie de signalisation MyD88-dépendante

La voie de signalisation MyD88-dépendante d'une cellule eucaryote fait intervenir la protéine kinase IRAK4 qui phosphoryle IRAK1 et 2 qui pourront ensuite activer TRAF6 et ainsi les voies de signalisation menant à l'induction des facteurs de transcription nucléaire IRF5, NFκB et la voie des MAPK. Ces facteurs, une fois activés, sont transloqués dans le noyau et ils sont impliqués dans la production de cytokines pro-inflammatoires.

2. La voie TRIF-dépendante (figure 24)

La voie TRIF dépendante a été découverte en 2002 par le groupe de Shizuo Akira [279]. Les souris KO pour MyD88 ne produisent pas de cytokines inflammatoires en réponse à une stimulation par du LPS, pourtant une activation de NFκB et de JNK est quand même observée dans ces conditions, avec un léger retard par rapport aux souris sauvages [271]. Le couple TRAM/TRIF est responsable de cette voie de signalisation. La délétion de MyD88 et de TRIF va provoquer des défauts très sévères d'activation de NFκB et de MAPK [269]. TRIF va, après stimulation, recruter TRAF6 et ainsi activer TAK1, de manière similaire à ce qu'il se passe pour la voie MyD88-dépendante, entraînant alors une activation du NFκB. TRIF recrute aussi RIP1 (Receptor-Interacting Protein 1) qui va alors changer de conformation et lui permettre d'être fixé par TRADD (TNK Receptor type I-Associated Death Domain protein) [280]. Enfin, Pellino-1 semble aussi avoir un rôle au sein de ce complexe [281]. C'est donc un complexe multiprotéique composé de TRAF6, TRADD, Pellino-1 et RIP1 qui va permettre l'activation de TAK1, induisant l'activation du NFκB et des MAPK.

En parallèle, TRIF peut aussi recruter TRAF3 afin d'activer IRF3. TRAF3 peut s'associer avec TANK (TRAF family member-Associated NFκB activator), TBK1 (TANK Binding Kinase 1) et IKKi pour induire la suite de cette voie de signalisation. TBK1 et IKKi sont important pour la dimérisation d'IRF3 [282]. Ceci va donc entraîner l'activation d'IRF3 et la transcription de l'interféron-β.

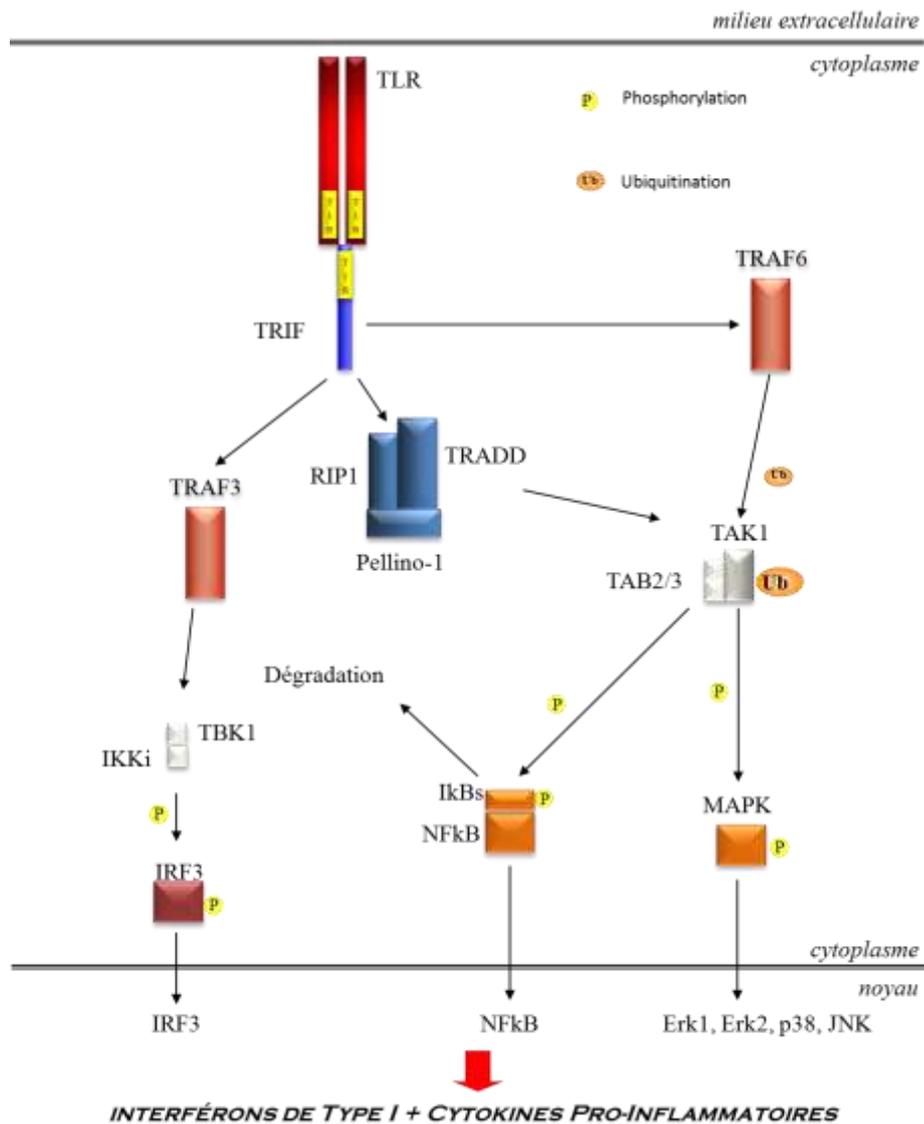


Figure 24 : Engagement des TLR et voie de signalisation de la voie TRIF-dépendante

La voie de signalisation TRIF-dépendante d'une cellule eucaryote fait intervenir TRAF3 et 6 mais aussi le complexe RIP1, TRADD et Pellino-1 qui vont mener à l'induction des facteurs de transcription nucléaire IRF3, NFκB et la voie des MAPK, impliqués dans la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron de type I.

E. Régulation négative de la signalisation TLR

La régulation négative des réponses induites par les TLR est importante pour stopper l'inflammation et donc limiter un effet délétère de la réponse immune comme lors du sepsis [269]. Plusieurs régulateurs négatifs ont été identifiés, agissant à des niveaux multiples des

voies de signalisation. Ceci inclue des variants raccourcis de protéines adaptatrices, des ubiquitines ligases, des déubiquitinases, des régulateurs transcriptionnels et des microARN [236].

Parmi les exemples que l'on pourrait citer, on retiendra la protéine TANK, qui se fixe au TBK1 et à l'IKKi, activateur présumé des voies NFκB et IRF3, et qui a finalement été décrite comme un régulateur négatif de l'ubiquitination par le TRAF6 [283]. Le RP105 (RadioProtective 105), ST2L (IL1R1) et SIGIRR (Single ImmunoGlobulin IL-1R-Related molecule) sont exprimés à la surface cellulaire et leurs fonctions inhibitrices agissent au niveau de l'initiation de la signalisation TLR4. Identifié à l'origine sur les cellules B, RP105 est un homologue de TLR4 et s'associe avec l'homologue de MD-2, MD-1. En interagissant directement avec TLR4/MD-2, RP105/MD-1 peut inhiber l'association entre le LPS et TLR4/MD-2. ST2L, la forme transmembranaire de ST2, est un homologue du IL-1 récepteur. ST2L peut interagir avec MyD88 et TIRAP et inhiber leurs fonctions par séquestration. SIGIRR, un autre homologue de l'IL-1R inhibe les interactions TLR4 avec MyD88 grâce à son domaine TIR [269]. Enfin, le complexe TLR4/TRIF/TRAM migre, après activation, dans les endosomes tardifs où il va être en présence avec TAG, un variant épissé de TRAM, dont l'affinité forte avec le TLR4 va provoquer le décrochage de TRIF et TRAM et ainsi la dégradation du complexe de signalisation du TLR4 [284].

IRAKM appartient à la famille IRAK mais ne possède pas d'activité kinase. Il inhibe la signalisation MyD88-dépendante en empêchant la dissociation des protéines IRAK de MyD88. IRAK2c et MyD88s sont des variants raccourcis d'IRAK2 et MyD88, respectivement, et sont aussi impliqués dans l'inhibition de la signalisation, notamment grâce à l'absence des domaines fonctionnels [269].

Ces quelques exemples représentent une partie de ce qui est connu. De plus, des groupes pharmaceutiques étudient fortement ce type de régulation négative, notamment à des fins anti-inflammatoire (par exemple : le Dynavax de Dynavax technologies associé à GSK), même si l'industrie pharmaceutique mondiale utilise majoritairement les TLR à des fins d'adjuvants (afin de renforcer l'efficacité d'un vaccin par exemple, pour Sanofi-Pasteur).

F. Les ligands endogènes

En plus de reconnaître le non-Soi, les TLR peuvent répondre à des ligands endogènes et provoquer des réponses anti-inflammatoires. Ses molécules sont principalement produites suite à une mort cellulaire, une lésion ou par des cellules tumorales. Ce sont donc, par exemple, des produits de dégradation de la matrice extracellulaire, des protéines de type Hsp (Heat-Shock Protein) ou des protéines de type HMGB1. De plus, les complexes chromatine-ADN et ribonucléotidiques, libérés lors de la mort cellulaire ou de formation de complexes immuns contenant des antigènes du Soi, peuvent aussi stimuler les TLR 7 et 9 intracellulaires, et mener au développement de maladies auto-immunes [236],[285].

Après une inflammation ou une blessure, les composants de la matrice extracellulaire peuvent être clivés par des protéases cellulaires et sont libérés à l'extérieur des cellules. Certains composants, comme le biglycan, l'acide hyaluronique, le versican ou certains domaines de la fibronectine, peuvent activer le TLR2, le TLR4 ou les deux et mener à la production de cytokines pro-inflammatoires ou de chimiokines dans des modèles de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) *in vitro* [236].

HMGB1, protéine nucléaire non-histone, relargué par les cellules nécrotiques ou pendant l'inflammation, est un médiateur pro-inflammatoire dans les chocs septiques. Il est bien décrit pour être reconnu par les TLR2, 4 et 9 [286]. Les protéines cytoplasmiques HMGB1, HMGB2 et HMGB3 sont des « sentinelles à acides nucléiques » et permettent alors l'activation de TLR ou de RLR (Rig-I-Like Receptor) [287].

Les Hsp, notamment Hsp60, Hsp70, Hsp22 et gp96 ont aussi été liées à l'activation des macrophages et des cellules dendritiques afin d'induire des médiateurs pro-inflammatoires après engagement des TLR2 et TLR4. Ces effets observés peuvent tout de même être liés à une contamination des préparations de protéines recombinantes des produits d'*E. coli*, comme il a souvent été rapporté par le passé [288]. Aucune étude ne peut aujourd'hui affirmer un rôle activateur des TLR, spécifique des Hsp.

G. Les autres PRR

Les TLR reconnaissent les pathogènes soit à la surface membranaire, soit à l'intérieur des lysosomes ou des endosomes. Le système TLR ne peut donc pas être utilisé pour la détection des pathogènes intracytosoliques [240]. Le système immunitaire possède, à ce jour, trois systèmes détectant les PAMP cytoplasmiques, les NLR (Nod-like Receptor), les RLR ainsi qu'un senseur d'ADN double brin non encore identifié. La famille des NLR comporte plus de 20 membres, répondant aux PAMP, à des particules non PAMP ainsi qu'aux signaux de stress cellulaire, ce qui provoque des réponses pro-inflammatoires par les macrophages (IL-1 β) [289]. La famille des RLR est constituée de 3 membres qui sont connus pour détecter des ARN viraux [290]. Enfin, des cellules expriment un PRR non identifié qui reconnaît de l'ADN double brin et induit la production d'interféron de type I [291]. Takaoka *et al.* ont identifié dans ce sens DAI (ou DLM-1), un senseur cytosolique à ADN dans des fibroblastes de souris permettant d'activer la production d'IFN de type I de manière indépendante aux TLR [292].

Ces PRR sont exprimés dans de nombreuses cellules, notamment dans des cellules non-immunes (fibroblastes, cellules endothéliales), et peuvent, dans quelques cas, reconnaître des PAMP partagés avec les TLR et engendrer des réponses similaires (libération de cytokines ou chimiokines).

H. TLR et apoptose

La signalisation des TLR peut mener à l'apoptose, indiquant la possibilité d'un « cross-talk » avec cette voie de signalisation. En particulier, il y a une analogie avec la voie TNF qui peut activer le NF κ B mais aussi induire la mort cellulaire [293]. Différents travaux ont montré le lien étroit entre les 2 voies de signalisation. Par exemple, l'activation *in vitro* du TLR2 peut induire l'apoptose par l'interaction des DD de MyD88 et d'un composant de la voie TNF, FADD, menant à l'activation de la caspase 8 [294]. De plus, la voie de signalisation porte des similarités avec les voies TLR (TRAF6, TAK, IKK) [293]. Les TLR3 et 4 peuvent également provoquer la mort cellulaire *in vitro* et *in vivo*. En effet, le LPS peut induire aussi bien l'activation des DC que leur

apoptose. Ce serait en fait une façon de limiter l'infection ou de diminuer les réponses immunes dépendantes des DC lors de sepsis et donc d'éviter de trop fortes inflammations [293]. Contrairement à ce qu'il se passe pour le TLR2, ce serait plutôt la molécule adaptatrice TRIF qui serait impliquée dans l'apoptose provoquée par les TLR3 et 4 [295]. Récemment, les TLR ont été montrés comme inducteurs d'autophagie, mort cellulaire sans inflammation, en réponse à des agents infectieux (par exemple : Pam3CSK4 (TLR2), LPS (TLR4), flagelline (TLR5), MALP-2 (TLR6), ssRNA (TLR7) ou CpG oligodeoxy-nucleotides (TLR9)) [296].

I. Les spécificités du TLR4

1. Les deux voies de signalisation

Pour de nombreuses raisons, le TLR4 est unique parmi les autres TLR (figure 25). Tout d'abord, c'est le seul TLR connu à pouvoir activer les voies MyD88-dépendante et TRIF-dépendante menant respectivement à l'induction de molécules pro-inflammatoires et d'interféron de type I. De plus, à part le TLR4, tous les récepteurs connus induisant la production d'interféron de type I sont des détecteurs d'acides nucléiques et induisent l'activation d'IRF3 ou d'IRF7 depuis des compartiments intracellulaires. Enfin, le TLR4 est le seul TLR qui peut engager les 4 protéines adaptatrices (TIRAP, MyD88, TRAM, TRIF) possédant le domaine TIR. Cependant, le TLR4 ne va pas engager les deux voies de signalisation en simultanée depuis la membrane plasmique. En fait, TIRAP fonctionne comme un adaptateur trieur qui recrute le MyD88 au TLR4 par sa capacité à interagir avec le PIP₂. TIRAP recrute aussi le MyD88 pour le TLR2. Pour la voie TRIF, c'est l'adaptateur TRAM qui est recruté à la membrane [272].

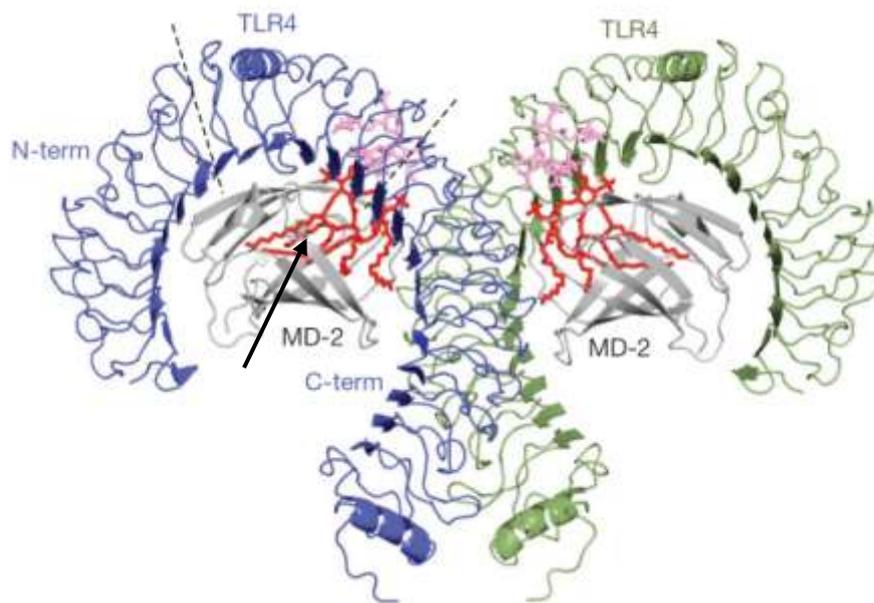


Figure 25 : Structure d'un dimère de TLR4

D'après Park *et al.*[297]

Sur cette représentation de la structure d'un dimère de TLR4 (en bleu et vert), associé à la protéine MD-2 (en gris), le LPS est représenté en rouge. Dans la zone de fixation du LPS montre que les chaînes O-polysaccharidiques (flèche) sont importantes dans l'interaction entre le LPS et le TLR4

Des travaux en collaboration des groupes de S. Akira et R. Medzhitov montrent que, même si le TLR4 et TRAM peuvent être observés à la surface cellulaire avec TIRAP, la signalisation TRAM-TRIF ne peut être initiée qu'après internalisation du complexe TLR4 [298]. Ils décrivent que le LPS induit l'assemblage du complexe fixant le ligand, complexe membranaire formé de CD14, MD-2 et du TLR4. Ceci est le signal qui va entraîner la fixation du complexe TIRAP-MyD88, qui a une affinité plus forte que le complexe TRAM-TRIF avec le domaine TIR du TLR4. Cette fixation semble localement régulée par une concentration de PIP₂, les zones de fixation de ce complexe à la membrane plasmique en étant riches. À ce moment, le signal de transduction est initié et le récepteur va alors être endocyté par un processus dépendant de la dynamine. Pendant cette endocytose, la forte présence de PIP₂ dans la membrane invaginée, devenant un endosome précoce, va provoquer une augmentation importante de PIP₂ local, provoquant alors le relâchement du complexe TIRAP-MyD88 de la membrane invaginée [299]. Cette perte du complexe TIRAP-MyD88 permet la fixation du

complexe TRAM-TRIF sur le domaine TIR du TLR4 ce qui va alors induire une seconde phase de signalisation, à partir de cette situation intracellulaire, codant pour l'induction de gènes encodant la protéine IFN β . Ce modèle permet par la même occasion de comprendre pourquoi les paires de protéines adaptatrices pouvaient se fixer sur le même domaine TIR du TLR4, étant donné que cette fixation est séquentielle et non simultanée (figures 23 et 24) [300].

L'internalisation du TLR4, et la mise en jeu de la voie TRIF-dépendante, permet alors une deuxième vague d'activation du NF κ B et des MAPK en plus de l'activation d'IRF3. Le TLR4, contrairement aux autres TLR, va donc avoir 2 temps d'activation. Il n'est pas encore déterminé si la production de cytokines pro-inflammatoires est dépendante des 2 vagues d'activation de NF κ B et de MAPK ou si une seule vague suffit [236].

2. Le LPS, un ligand, deux signalisations

L'agoniste principal du TLR4 est le LPS des bactéries gram-négatif. Ce composant de la paroi bactérienne possède une structure bien particulière : un lipide A, un cœur polysaccharidique et une chaîne O-polysaccharidique de longueur variable [301]. La morphologie d'une colonie lisse (smooth) ou rugueuse (rough) est indicative de l'état de O-glycosylation du LPS. Avec de longues chaînes O-polysaccharidique les colonies seront lisses, contrairement aux courtes qui seront rugueuses. Le LPS est donc couramment nommé lisse ou rugueux suivant son état de O-glycosylation (figure 26).

En absence des sucres composant le LPS (cœur polysaccharidique et chaîne polysaccharidique), le lipide A est la structure bioactive. Il a longtemps été supposé que les chaînes glycosydiques n'avaient aucune fonction [302]. De plus, toutes les molécules de LPS semblaient être engagées par la LBP et transférées au CD14. Le CD14, initialement identifié comme le premier PRR, possède une structure en fer à cheval, semblable à la structure du TLR4, mais n'est rattaché à la membrane seulement pas une ancre GPI [303],[304]. Ceci implique que, contrairement au TLR4, le CD14 ne peut pas induire seul une signalisation intracellulaire et de plus le CD14 peut se retrouver sous forme soluble [303],[305],. La présence de CD14 soluble

(sCD14) peut être une conséquence de la sécrétion de la protéine avant qu'elle soit couplée à son ancre GPI ou d'une libération après clivage du CD14 membranaire. De plus, la quantité de sCD14 plasmatique augmente durant une infection et une inflammation, permettant d'augmenter la réactivité des TLR4 des cellules circulantes [305].

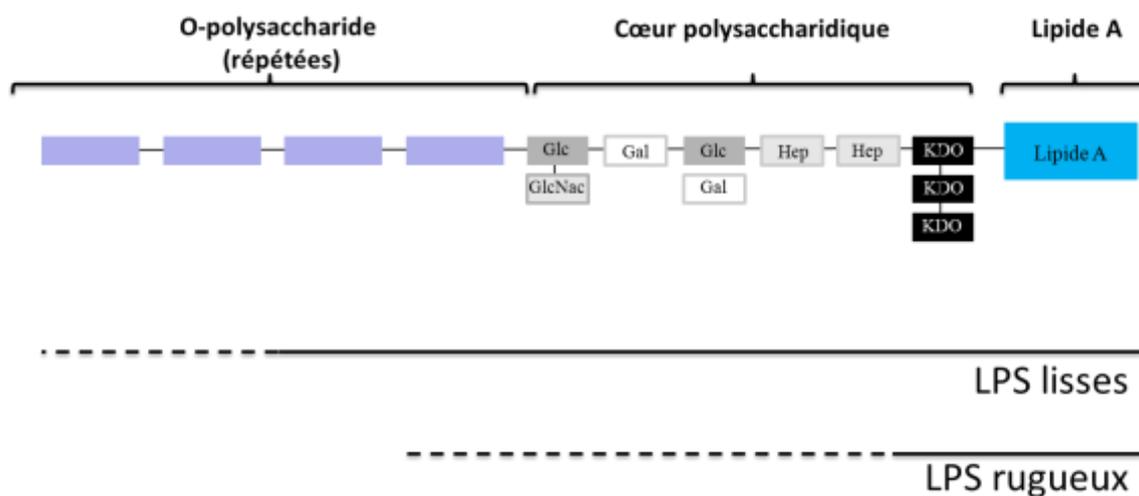


Figure 26 : les différents types de LPS lisses et rugueux

La base morphologique des LPS est le lipide A, les LPS dit « rugueux » vont avoir seulement une partie du cœur polysaccharidique, notamment composé par les motifs KDO et des séquences glucidiques. Les LPS « lisses », plus long, vont posséder des chaînes répétées de O-polysaccharide, diminuant alors leur affinité pour leur récepteur.

En fait, le CD14 semble être optionnel pour l'induction de la voie MyD88-dépendante, mais il est absolument requis pour l'induction de la voie TRIF-dépendante car il va permettre de stabiliser l'interaction entre le LPS et le TLR4. Cette stabilisation, en plus du désassemblage du complexe TIRAP-MyD88 du TLR4 à cause du PIP₂, va permettre la fixation du complexe TRAM-TRIF au TLR4 internalisé et donc l'induction de la voie TRIF-dépendante. Cependant, le LPS « lisse », de par sa grande chaîne saccharidique, n'aura pas une fixation suffisamment forte au complexe TLR4 pour rester accroché au récepteur et donc permettre l'induction de la voie TRIF-dépendante. Le LPS « rugueux » pourra quant à lui activer séquentiellement la voie MyD88-dépendante puis, grâce à la stabilisation du LPS au TLR4 par le CD14, l'internalisation du complexe, la dissociation de TIRAP-MyD88 et la fixation du complexe TRAM-TRIF, permet d'activer la voie TRIF-dépendante (figure 27). La voie MyD88-dépendante peut aussi être

nommée « voie lisse », la voie TRIF-dépendante est alors nommée « voie rugueuse » [301]. Ceci permet ainsi de comprendre pourquoi certains LPS vont provoquer d'avantage d'inflammations que d'autres.

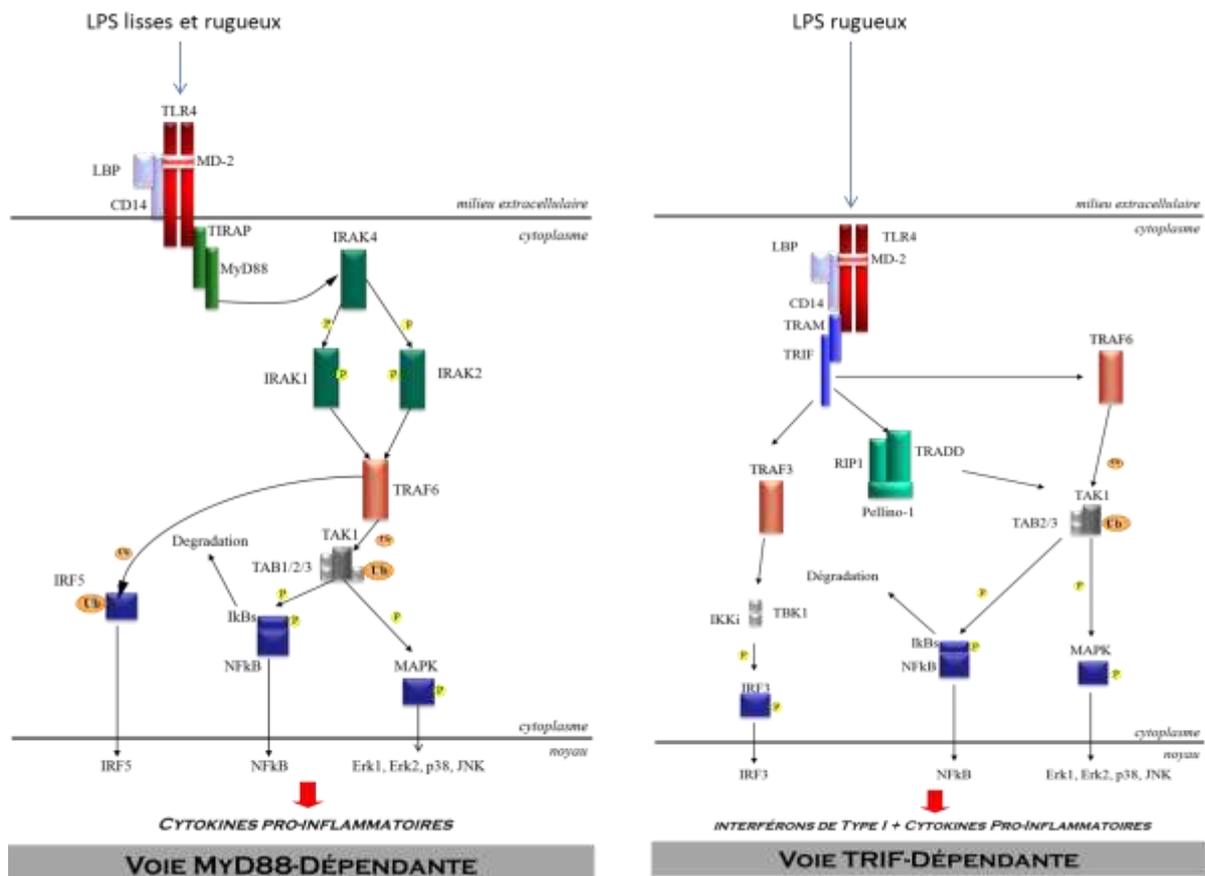


Figure 27 : les voies de signalisation du TLR4

Les voies de signalisation du TLR4 eucaryote sont composées des voies MyD88-dépendante et TRIF-dépendante menant toutes les deux à l'induction de facteurs de transcription nucléaire. Suivant l'affinité du LPS engagé, ainsi que du rôle du sCD14, l'activation du TLR4 va pouvoir entrainer la production de cytokines pro-inflammatoires et/ou d'interféron de type I.

III) Les TLR plaquettaires

En 2004, Shiraki *et al.* montrent que les plaquettes sanguines humaines expriment les TLR1 et 6 [306]. Ils pensent alors que les plaquettes auraient un rôle dans les athéroscléroses et que l'expression de ces TLR permettrait aux plaquettes de reconnaître les ligands correspondants. En 2005, notre équipe montre que les plaquettes humaines expriment les TLR2, 4 et 9 à leur surface mais aussi de manière intracellulaire [307]. L'expression de ces TLR serait modulée en fonction de l'état d'activation des plaquettes.

Ces travaux, en plus des récentes implications des plaquettes comme cellules de l'immunité innée exerçant une action sur l'immunité adaptative, notamment en signalant via le couple CD40/CD40L, permettent vraiment de positionner les plaquettes comme cellules sentinelles, une « théorie » que notre groupe de recherche essaye de prouver, comme d'autres à l'étranger [172],[180].

A. Fonctions des TLR plaquettaires

Comme on l'a vu précédemment, l'équipe de Yokoyama, au Japon, a montré que les plaquettes sanguines humaines ainsi qu'une lignée de MK (Meg-01) exprimaient les TLR1 et 6, que ce soit au niveau de l'expression protéique ainsi que de l'expression des ARNm (dans les MK mais aussi dans les plaquettes) [306]. Les plaquettes seraient impliquées dans les processus immunitaires anti-infectieux et dans l'immunopathologie vasculaire athérosclérotique, via les TLR1 et 6. Le rôle fonctionnel des TLR1 et 6 n'a pas été confirmé à ce jour.

Les TLR2, 4 et 9 ont ensuite été mis en évidence chez l'homme par des travaux de notre équipe, ils sont exprimés à la membrane et au niveau du cytoplasme plaquettaire [307]. Plusieurs travaux sont venus non seulement confirmer leur présence mais aussi leur fonctionnalité. Les équipes Canadiennes de Kubes et de Semple ont notamment confirmé la fonctionnalité du TLR4 plaquettaire, respectivement murin et humain [308],[309]. L'activation

plaquettaire résultant de la stimulation du TLR4 semble différente d'une activation de type hémostatique (comme une stimulation par la thrombine ou l'ADP), principalement car il n'y a pas d'augmentation de CD62P membranaire constatée [308]. Cette observation a conduit Ward *et al.* à estimer que les TLR2 et 4 plaquettaires n'avaient aucune fonctionnalité et étaient seulement résiduels de la fragmentation des MK [310]. Cette observation était appuyée par les absences d'agrégation, de surexpression du CD62P membranaire et d'augmentation de Ca²⁺ intra-plaquettaire après stimulation par des agonistes du TLR2 (lipoprotéines) ou du TLR4 (LPS). En fait, le LPS semble plutôt provoquer une adhésion plaquettaire, notamment au fibrinogène par l'implication du complexe GPIIb/IIIa, indépendamment du CD62P. De plus, le LPS provoquerait une thrombocytopénie assez forte (diminution de la numération plaquettaire de 60% après 4h de traitement au LPS, contre 20% dans des souris KO pour le TLR4) [308].

Aujourd'hui, l'implication des TLR sur la physiologie plaquettaire est de plus en plus détaillée. L'équipe de Semple a montré que des agonistes bactériens comme le LPS peuvent modifier la phagocytose de plaquettes opsonisées par une lignée de monocytes (THP-1), résultats confirmés par les travaux de Tremblay *et al.* en 2007 [311],[312]. Ceci expliquerait pourquoi les infections à bactéries gram-négatif augmentent la thrombocytopénie de patients atteints de pathologies auto-immunes thrombocytopéniques avec purpura. Sur un modèle murin, Jayachandran *et al.* montrent que l'injection de LPS sur des souris KO pour le TLR4 diminue la numération plaquettaire, la quantité totale d'ARNm plaquettaire ainsi que la quantité de CD62P membranaire après stimulation à la thrombine. Les plaquettes restent tout de même excitables (augmentation de CD62P après stimulation par la thrombine) et s'agrègent après stimulation par le collagène [313]. Les auteurs montrent qu'une semaine après l'injection de LPS, le temps du « turn-over » plaquettaire, les plaquettes ont une numération supérieure, et l'expression de CD62P membranaire en réponse à une stimulation est revenue à la normale. Ils concluent que l'effet du LPS serait plus localisé aux MK et non aux plaquettes. Des travaux de l'équipe de Karpman en Suède ont montré que le LPS pourrait aussi se fixer au CD62P plaquettaire, activant aussi les plaquettes [314].

Par la suite, la majorité des travaux sur les TLR plaquettaires, notamment les nôtres, ont été centrés sur les TLR2 et 4. Les travaux sur le TLR4 seront discutés dans le paragraphe suivant de ce manuscrit. En 2006, une équipe Norvégienne, en collaboration avec l'équipe de Raoult à Marseille, a montré que l'ATBF (African Tick Bite Fever), causée par les Rickettsies, active les

plaquettes via le TLR2. Ils ont constaté un taux élevé de sCD40L dans le sang circulant des patients atteints d'ATBF, la concentration de sCD40L étant grandement diminuée par la présence d'anticorps bloquant anti-TLR2. Cette sécrétion plaquettaire de sCD40L entraîne une activation des cellules endothéliales (augmentation de sécrétion du facteur tissulaire) par l'implication de leur TLR4 [315]. Plus récemment, l'équipe de Freedman à Boston a étudié, de manière approfondie, le TLR2 plaquettaire. Ils ont montré qu'en stimulant les plaquettes avec du Pam₃CSK4, agoniste du couple TLR1-TLR2, elles s'agrègent et adhèrent au collagène. De plus, ils ont constaté une augmentation de l'expression de CD62P membranaire, une activation de la GPIIb/IIIa, une génération d'espèces réactives de l'oxygène et, sur du sang total, une formation d'agrégats hétérotypiques plaquette-neutrophile en cytométrie en flux. En étudiant les voies de signalisation, ils ont observé une activation de la voie PI3-kinase/Akt, connue pour augmenter de nombreuses fonctions plaquettaires, comme l'adhésion, les modifications du cytosquelette et l'agrégation [316]. Des tests *in vivo* par l'injection de *Porphyromonas gingivalis*, bactérie connue pour activer les macrophages et de cellules endothéliales de manière dépendante du TLR2, induit de nombreux agrégats plaquettes-neutrophiles, sauf dans le cas de souris KO pour le TLR2 [317].

Au sein de notre équipe, nous avons montré que la stimulation du TLR2 plaquettaire par le Pam₃CSK4 augmente significativement la libération de facteurs solubles, tels que le sCD62P, le sCD40L et le RANTES. De plus, nous avons montré que la voie TLR2 plaquettaire impliquait le MyD88 ainsi que le NFκB, ce dernier étant présent sous sa forme active, libre d'IκB. L'inhibition du NFκB diminue l'activité plaquettaire. Ce manuscrit, auquel j'ai contribué, (dont l'abstract est ajouté à la fin de ce manuscrit, dans la rubrique annexe), est actuellement soumis.

Aucune étude n'a pour l'instant étudié l'impact des ligands endogènes sur les TLR plaquettaires. À ce jour, seule l'influence des HSP est connue. En effet, il est montré que les HSP27 et 20 peuvent inhiber fortement l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine [318].

B. Spécificité du TLR4 plaquettaire

Depuis 2005 et les premiers travaux de notre équipe sur le TLR4 plaquettaire, nous avons montré que le LPS pouvait induire la libération de sCD40L par les plaquettes, indépendamment des TLR2 et 9 [319]. En 2007, l'équipe montrait que la stimulation par le LPS entraînait en fait une modulation de la sécrétion plaquettaire et non une sécrétion complète comme on peut l'observer lors de stimulation par la thrombine ou l'ADP [159]. En effet, après stimulation par du LPS d'*E. coli*, la libération de cytokines est, soit augmentée (sCD40L et PF4), soit diminuée (RANTES, Angiogénine et PDGF-AB) soit identique (sCD62P, IL-8, EGF et TGF β).

De plus, il est connu que les plaquettes migrent dans certains organes lors d'une infection (notamment les poumons) [320],[321]. Andonegui *et al.* ont montré, par injection de plaquettes marquées chez la souris, que les plaquettes migrent bien dans les poumons après un traitement au LPS [308]. De plus, les plaquettes provenant de souris KO pour le TLR4 ne s'accumulent pas dans les poumons de souris sauvages, montrant que la migration plaquettaire en réponse au LPS est spécifique du TLR4.

En 2009, Zhang *et al.* ont montré des résultats très intéressants sur le rôle du TLR4 plaquettaire. Ils sont en effet allés plus loin dans la signalisation du TLR4 en confirmant la présence du CD14, du MD-2 et du MyD88, éléments primordiaux des réponses au LPS dans des cellules eucaryotes [322]. Le LPS est bien un agoniste plaquettaire qui stimule la sécrétion et augmente l'agrégation par un mécanisme dépendant du complexe TLR4/MD-2. Cependant, ils n'obtiennent aucune agrégation avec le LPS utilisé seul, en fait le LPS va seulement augmenter l'agrégation induite par une concentration faible d'agoniste (collagène ou thrombine). Ils montrent tout de même pour la première fois qu'une partie de la voie de signalisation du TLR4 est présente et que sa stimulation induit la production de cGMP (mono phosphate de guanosine cyclique) et active la PKG (Protein Kinase G). Ils montrent aussi une augmentation des interactions entre les plaquettes stimulées par le LPS et les neutrophiles. Il est aussi important de noter qu'ils détectent du CD14 au sein des plaquettes, contrairement à d'autres groupes [308],[314]. Comme vu précédemment, les plaquettes ne produisent pas de CD14 (pas d'ARNm correspondant) mais leur capacité à internaliser les composants du plasma pourrait être une explication.

C. Fonctionnalités du TLR4 plaquettaire

1. LPS et ARNm

Les plaquettes ne possèdent pas de noyaux et ne peuvent pas transcrire de nouveaux ARNm, pourtant elles contiennent un groupe d'ARNm traduits en protéines d'une manière hautement régulée [124]. Les plaquettes possèdent aussi des transcrits d'ARNm non épissés et un spliceosome fonctionnel, dépendant de l'activation (voir paragraphe I.C.1.b) Parmi ces transcrits, l'IL-1 β est épissé et traduit en protéine après une stimulation par la thrombine.

Shashkin *et al.* montrent par PCR en temps réel, que le LPS d'*E. coli* provoque l'épissage de l'ARNm d'IL-1 β plaquettaire de manière plus forte qu'avec une stimulation par la thrombine. L'augmentation de l'épissage de cet ARNm est d'environ 1000 fois supérieure et elle varie dans le temps : l'épissage maximal se situe 3h après la stimulation mais commence à être significatif après 1h. Ce phénomène est moins rapide que lors de la stimulation par la thrombine (maximum à 1h) mais il est plus important et surtout beaucoup plus prolongé. De plus, l'activation du TLR2 par un agoniste spécifique (Pam₃CSK4, pendant 3h) va aussi stimuler l'épissage de l'ARNm d'IL-1 β mais de manière moins efficace que le LPS [323]. Ils vont confirmer ce résultat grâce à la cyclooxygénase-2 (COX-2). Les plaquettes au repos ne contiennent pas de protéine COX-2. Elles ne contiennent, au repos, qu'une infime quantité d'ARNm de cyclooxygénase-2 épissé. Après activation par du LPS, elles vont alors présenter une grande quantité de l'ARNm épissé. Par contre, l'augmentation de la quantité d'ARNm épissé de COX-2 n'est pas visible en réponse à la stimulation du TLR2.

Le LPS, même s'il n'est pas un agoniste classique plaquettaire, est donc d'un grand intérêt car il permet l'épissage de certains ARNm non mature afin d'augmenter la quantité de protéines d'intérêt, comme l'IL-1 β , ce qu'un agoniste « hémostatique » ne permet que faiblement. Ceci montre, une fois de plus, que les réponses plaquettaires sont finement régulées suivant l'agoniste, même si ce phénomène régulateur n'est pas encore connu [323].

2. L'importance du NFκB plaquettaire

Une première tentative de réponse quant à la finalité de la voie TLR4 a été donnée par l'équipe de Schattner en Argentine, confirmée par nos travaux (voir annexe) [324]. Diverses équipes avaient d'ores et déjà observé la présence du NFκB au sein des plaquettes, l'équipe de Freedman notamment, dans des « data not shown », dit avoir observé des transcrits du NFκB [325]. Ces cellules étant anucléées, il est clair que définir un rôle pour des facteurs de transcription nucléaire semble bien difficile. Néanmoins, certains récepteurs nucléaires ont déjà été décrits pour avoir une fonction « non génomique » dans les plaquettes. Le meilleur exemple est l'œstrogène, connu pour réguler des voies de signalisation spécifiques (notamment Hodgehog, important pour la prolifération cellulaire) grâce à son récepteur α , qui, dans les plaquettes, agit sur la fonction notamment par l'augmentation de l'expression du récepteur GPIV [326].

La famille du facteur de transcription NFκB comprend 5 membres : p50, p52, p65, RelB et c-Rel. Les complexes NFκB sont principalement observés séquestrés dans le cytoplasme, dans un état inactif, fixés aux protéines inhibitrices, les IκB. Dans ce complexe, les IκB masquent la séquence de localisation nucléaire du NFκB. Les combinaisons des dimères de NFκB et d'IκB indiquent les diverses fonctions de cette voie de signalisation. Après libération des IκB, le NFκB est transloqué dans le noyau et va activer la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation et l'immunité, comme cité précédemment. L'activation de NFκB en tant que facteur de transcription se fait par modification post-traductionnelle, notamment par phosphorylation et acétylation [327].

Malaver *et al.* montrent que le NFκB plaquettaire ne semble pas influencer les flux calciques, qui sont pourtant des éléments prédominants de l'activation et de la fonction plaquettaire. Ils montrent aussi que le NFκB est mis en jeu lors de l'activation par la thrombine, l'ADP, l'épinephrine et le collagène mais pas par l'acide arachidonique, pourtant activateur plaquettaire; démontrant alors une certaine régulation [328]. Ils concluent que le NFκB serait impliqué dans la régulation des étapes précoces de l'activation plaquettaire, notamment lors

des réarrangements du cytosquelette menant au changement de forme de la plaquette. De plus, l'inhibition de NF κ B diminue l'activité de la PhosphoLipaseA2 (cPLA2), sachant que la cPLA2 interagit avec la GPIIb/IIIa, il se pourrait que la modulation du NF κ B par les agonistes plaquettaires entraîne la formation d'un complexe incluant GPIIb/IIIa-NF κ B-ERK-cPLA2 [324].

Il est, de plus, intéressant de constater que tous les inhibiteurs de NF κ B diminuent l'expression membranaire du CD62P, ce qui suggère que le rôle non-génomique du NF κ B pourrait être associé à une régulation en particulier à l'activation plaquettaire et plus généralement à des réponses hémostatiques et inflammatoires.

Objectif du travail

Les plaquettes sanguines possèdent un rôle aujourd'hui identifié dans l'immunité innée. Elles semblent être capables de répondre de manière différentielle (en fonction du stimulus) et probablement régulée à l'exposition à de nombreux pathogènes pouvant exposer des signaux de danger différent. Nous avons donc commencé par chercher si les plaquettes étaient capables de répondre à une stimulation par des antigènes du VIH-1, virus pouvant mener au SIDA.

Les plaquettes sanguines expriment plusieurs TLR. Ces molécules sont parmi les récepteurs clés de l'immunité innée et permettent de détecter la présence de pathogènes dans le milieu extracellulaire mais aussi intracellulaire. La stimulation des TLR mène, dans les cellules eucaryotes, à l'induction de voies de signalisation qui engendrent le recrutement et la phosphorylation en cascade de facteurs de transcription nucléaire. Ces molécules vont orienter la réponse immune et permettre, entre autres, une production protéique ou la mobilisation des structures cellulaires avec, par exemple, une dégranulation ou encore un changement de conformation de la cellule. La particularité du TLR4 est qu'il est le seul à utiliser les quatre protéines adaptatrices recrutables en aval de la stimulation, MyD88/TIRAP et TRAM/TRIF. Ces protéines permettent d'avoir les voies MyD88-dépendante et TRIF-dépendante provoquant respectivement l'induction de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type I.

Au sein des plaquettes humaines, la destinée de ces voies de signalisation n'est pas encore connue. En nous intéressant au TLR4, nous avons voulu savoir si les voies MyD88 et TRIF dépendantes, étaient présentes et si oui, étaient fonctionnelles. Alors que la présence de MyD88 et de NF κ B dans les plaquettes humaines a été récemment confirmée, nous avons voulu savoir ce qu'il en était de la voie TRIF-dépendante et cherchant les protéines impliquées dans cette signalisation.

Nous avons ensuite cherché à savoir si les plaquettes étaient en mesure d'utiliser ces deux voies de manière productive et donc de répondre différemment suivant le stimulus ou l'agoniste utilisé. Enfin, pour remettre les plaquettes dans leur contexte physiologique, nous avons voulu savoir si la stimulation des voies de signalisation du TLR4 avait une influence sur l'action des plaquettes avec les cellules environnantes, dont les cellules de l'immunité innée et/ou adaptatives.

Résultats expérimentaux

I) Article I : Altered release of regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein from human, normal platelets: contribution of distinct HIV-1MN gp41 peptides

Fabrice Cognasse^{1,2}, Hind Hamzeh-Cognasse², Julien Berthet^{1,2}, Pauline Damien², Frederic Lucht², Bruno Pozzetto² and Olivier Garraud^{1,2}.

¹ EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France; ² GIMAP-EA3064, Université de Saint-Etienne – Membre de l'Université de Lyon, Faculté de Médecine, Saint-Etienne, France.

Publié dans: AIDS 2009 [329]

A. But de l'étude

Les plaquettes sanguines, cellules primordiales de l'hémostase, sont maintenant reconnues pour leur rôle dans l'immunité, notamment dans l'immunité antivirale [225]. Par exemple, elles sont décrites pour interagir avec les virus *vaccinia*, *influenza* et *cytomegalovirus* [330],[331],[332]. Les plaquettes semblent interagir avec les virus par l'expression de nombreux récepteurs membranaires, entraînant une modulation de l'activation plaquettaire et/ou une diffusion.

Les plaquettes peuvent englober le VIH de type I [61]. De plus, les plaquettes expriment les TLR 2, 4 et 9 ainsi que les corécepteurs du VIH, CXCR1, 2 et 4 ainsi que les CCR1, 3 et 4 [87],[307]. Plusieurs équipes ont étudié les interactions entre les plaquettes et le VIH. Chaipan *et al.* ont montré que le VIH-1 capturé par les plaquettes reste dans un état infectieux au moins deux jours, suggérant que le VIH-1 intra-plaquettaire peut échapper aux réactions immunitaires et diffuser dans la circulation sanguine [333].

Puisque les plaquettes participent aux réponses inflammatoires, et que la physiologie du SIDA a une composante inflammatoire, notamment en ce qui concerne la sécrétion de cytokines pro-

inflammatoire, nous nous sommes donc intéressés à la réponse plaquettaire après activation par la protéine d'enveloppe du VIH, la gp160 [334].

B. Article publié

Altered release of regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein from human, normal platelets: contribution of distinct HIV-1_{MN} gp41 peptides

Fabrice Cognasse^{a,b}, Hind Hamzeh-Cognasse^b, Julien Berthet^{a,b}, Pauline Damien^{a,b}, Frédéric Lucht^b, Bruno Pozzetto^b and Olivier Garraud^{a,b}

Platelets can bind HIV and, in turn, be altered in with respect to and function during HIV progression. This study examines the secretion of normal platelets after exposure to recombinant HIV-1_{MN} gp120 or gp41 peptides. There was a modest but significant decrease in regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein production in the presence of two out of 10 peptides, which was restored by monoclonal antibodies to gp41. Our data provide novel information on possible primary interactions between platelets and HIV env proteins.

Blood platelets are fundamental to hemostasis, but they also have important properties such as the expression of membrane receptors for soluble molecules (e.g. immunoglobulins G) or infectious particles [1–3]; platelets can not only absorb a variety of proteins/glycoproteins from the plasma, but also can release prestored (or even *de novo* synthesized) [2] proteins such as cytokines and chemokines or related molecules; platelets, thus, have important immunomodulatory and inflammatory activities [2,4]. Moreover, platelets also express the HIV coreceptors [chemokine (C-X-C motif) receptor 1 (CXCR1), 2 and 4 and chemokine (C-C motif) receptor (CCR) 1, 3 and 4] on their surface [5]. Platelets can further sense danger by the display of, for example, toll-like receptor 2, 4 and 9 [6], and our group demonstrated that they can even discriminate between danger signals in order to secrete cytokines/chemokines differentially [7].

As platelets have been shown to be able to link HIV and even transport viruses to sanctuaries, and because platelets are usually extremely reactive to infectious and non-infectious danger signals, we sought to address the question of whether platelets may alter their cytokine/chemokine secretion patterns in the situation of early HIV encounter. We thus examined the cytokine/chemokine platelet response in the presence of HIV surface envelope components: env glycoproteins gp120 and gp41 in setting the hypothesis that those glycoproteins may deliver danger signals.

The targeted platelet responses were the secretion of soluble CD62P (sCD62P), platelet factor 4 (PF4) (a typical soluble platelet activation marker) [7] and the chemokine regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES) because it is characteristically known to generate inflammatory responses after HIV antigen stimulation in in-vitro studies [8] and in clinical situations as

well [9], and to compete with HIV for access to one major HIV ligand, CCR5 [10]. Indeed, an excess plasma level of RANTES in response to HIV infection has been reported more than a decade ago, which has been largely attributed to activated platelets [9]; it has been further shown that platelet inhibitors could reverse this excess production of RANTES [11]. Holme *et al.* [9] demonstrated an apparent paradox in the relationship between RANTES production and platelets in HIV infection: platelets from asymptomatic HIV-1-infected patients proved capable of an enhanced release of RANTES, spontaneously and after Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe (SFLLRN) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) stimulation (i.e. SFLLRN being a thrombin receptor agonist peptide), whereas platelets from AIDS patients maintained their capacity of spontaneous production of RANTES but had – in contrast – a depressed release of RANTES after SFLLRN stimulation. We thus were interested in testing the responsibility of the components of the HIV envelope in differentially altering the production of RANTES by platelets.

We used platelets sampled from healthy, HIV-1, HIV-2-negative, normal blood donors who were also volunteering to give blood for research purposes. The preparation of platelet-rich plasma (PRP) was done exactly as previously described [12]. A volume of 225 µl of PRP, without contaminating white blood cells, as estimated by flow cytometry analysis (data not shown), was incubated for 30 min at room temperature after the addition of 25 µl of SFLLRN (30 µg/ml) or HIV env glycoprotein. PRP was centrifuged at 1500 g at room temperature for 10 min; platelet-free supernatant was stored at –20°C until further analyses. Recombinant gp120_{MN} (produced in insect cells using the baculovirus expression system) and synthetic peptides of gp41_{MN} (Table 1) and monoclonal antibodies to gp41, such as D50 and 2F5, were all obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (Bethesda, Maryland, USA). We also used another recombinant gp120_{MN} (also produced in baculovirus-infected insect cells and purchased from ProSpec, Coger, Paris, France).

Table 1. Peptide sequences of HIV-1_{MN} gp41.

Peptide no.	Sequence of synthetic gp41 _{MN} peptides	Localization
2017	GAAGSTMGAAS	525–535
2019	QARLLLSGIVQQQNLLRAI	541–560
2021	EAQQHMLQLTVWGKQLQAR	561–580
2013	ERYLKDQQLLGF	585–596
2025	GKLICTTTPWNASWSNKSL	601–620
2027	DDIWNNTMTWMQWEREIDNYT	621–640
2029	SLIYSLLEKSQTQKEKNEQE	641–660
2031	LLELDKRWASLWNWFDITNWL	661–680
2034	LRIVFAVLSIVNRVR	696–710
2036	QGYSPLSLQTRPPVPRGPDOR	711–730

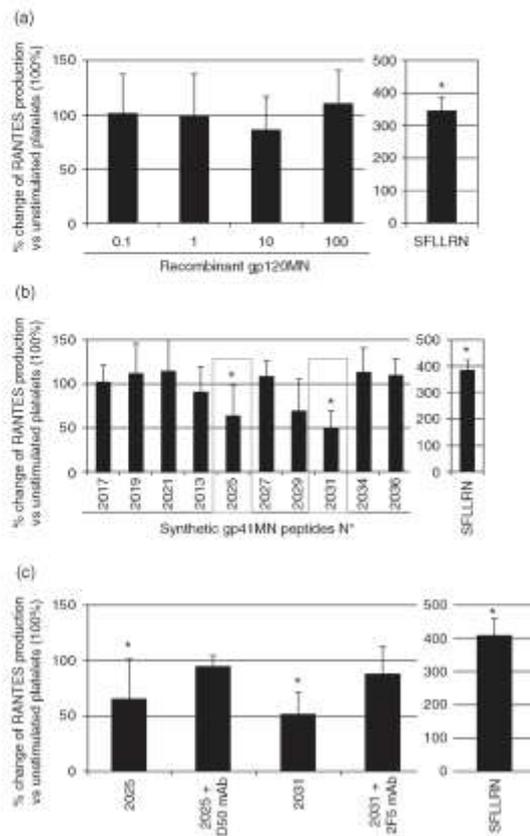


Fig. 1. Effects of HIV-1_{MN} gp120 (a), HIV-1_{MN} gp41 peptides (b) or HIV-1_{MN} gp41 peptides incubated with D50 and 2F5 mAb anti-gp41 (c) on purified human normal HIV-1, HIV-2 negative. Detection of RANTES secretion in platelet supernatant with or without stimulus. Concentration values of unstimulated platelets were set as 100% and the rate of RANTES secretion from treated platelets was calculated as a percentage of control. Data are expressed as the mean \pm SD ($n=10$). Asterisks (*) indicate a statistically significant effect compared with control stimulation ($P < 0.05$, using the *t*-test statistic). RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein.

Cultures were performed in triplicate and comprised of: unstimulated platelets (negative control), SFLLRN-stimulated platelets (positive control) and HIV env glycoprotein-stimulated platelets. sCD62P, PF4 and RANTES production in cultures were measured by a specific enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems Europe Ltd., Lille, France). Concentration values of unstimulated platelets were set as 100%, and the rate of RANTES release from treated platelets was individually expressed as a percentage of control production. The baseline level of RANTES production by unstimulated platelet was 11.21 ± 2.8 ng/ 3.10^8 platelets, confirming previous studies [9]. PF4 and CD62P (*P*-selectin) are

components of α -granule membranes in resting platelets; CD62P can be detected on the surface of activated platelets and be subsequently cleaved in a soluble form (sCD62P). The incubation of platelets ($n=10$) with various HIV-1_{MN} gp120 or gp41_{MN} peptides had no significant effect on PF4 and sCD62P release (data not shown).

In 10 independent experiments, none of the two recombinant gp120_{MN} tested (0–100 μ g/ml) caused any modulation of RANTES release (Fig. 1a). By contrast, the stimulation of platelets with gp41 peptides (used at 50 μ g/ml, described as an optimal concentration [13]) demonstrated that peptides 2025 and 2031 led to a modest but significant reduction of RANTES release ($P < 0.05$) (Fig. 1b), whereas the other eight tested peptides were ineffective. Furthermore, RANTES production could be significantly ($P < 0.05$) restored if platelet cultures with peptides 2025 and 2031 were performed in the concurrent presence of D50 or 2F5 monoclonal antibody anti-gp41 (used at 10 μ g/ml, as described previously [13]) (Fig. 1c). These data indicate that certain peptides of HIV env gp41 exert a negative signal, the precise nature of which remains to be ascertained and further investigated for RANTES production by normal platelets in in-vitro stimulation conditions. PF-4, as RANTES, is a platelet-derived pro-inflammatory cytokine, which is stored in the α -granules and released when platelets are activated. We demonstrated that PF4 release by platelets exposed to HIV native glycoprotein/glycoprotein peptides is unaffected upon stimulation, in contrast to that of RANTES, which is modulated by HIV glycoprotein. The described effect thus appears to be selective for RANTES/chemokine (C–C motif) ligand 5 (CCL5) (or reflects a more general perturbation of the platelet secretory pathway). As RANTES, similar to other β -chemokines [such as macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , and so on], are HIV suppressor factors through their capacity to compete with HIV for access to cell surface CCR5, our data demonstrate that certain peptides of HIV gp41 can counteract the beneficial production of RANTES and participate in HIV pathogenesis. Indeed, the role of platelets in the pathogenesis of HIV has been questioned [14]: do they participate in pathogenesis or are they a target of destruction mechanisms as suggested by the course of HIV-1 thrombocytopenia [15]? Our data provide novel information on possible primary interactions between platelets and HIV in their early encounter in the circulation. Therefore, further studies are needed to clarify its consequence: fair or – more likely – foe?

Acknowledgements

The study was funded in part by Etablissement Français du Sang (EFS) Auvergne-Loire and Mucosal Immunity and Pathogen Agents Group (GIMAP)/EA3064.

F.C. designed, performed the research, analyzed the data and wrote the first and second draft. H.H.-C., J.B. and P.D. designed, performed the research and analyzed the data. E.L. and B.P. performed the research. O.G. designed the research, analyzed the data and wrote the first and second draft. All authors read and approved the final manuscript.

^aEFS Auvergne-Loire, and ^bGIMAP-EA3064, Université de Saint-Etienne – membre de l'Université de Lyon, Faculté de Médecine, Saint-Etienne, France.

Received: 15 May 2009; revised: 8 July 2009; accepted: 15 July 2009.

References

1. Elzey BD, Sprague DL, Ratliff TL. **The emerging role of platelets in adaptive immunity.** *Cell Immunol* 2005; **238**:1–9.
2. Weyrich AS, Zimmerman GA. **Platelets: signaling cells in the immune continuum.** *Trends Immunol* 2004; **25**:489–495.
3. Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM. **Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation.** *Blood* 2002; **99**:4021–4029.
4. Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, et al. **Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments.** *Immunity* 2003; **19**:9–19.
5. Clemetson KJ, Clemetson JM, Proudfoot AE, Power CA, Baggiolini M, Wells TN. **Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets.** *Blood* 2000; **96**:4046–4054.
6. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. **Evidence of toll-like receptor molecules on human platelets.** *Immunol Cell Biol* 2005; **83**:196–198.
7. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O. **Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets.** *Br J Haematol* 2008; **141**:84–91.
8. Bisset LR, Rothen M, Joller-Jemelka HI, Dubs RW, Grob PJ, Opravil M. **Change in circulating levels of the chemokines macrophage inflammatory proteins 1 alpha and 11 beta, RANTES, monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-16 following treatment of severely immunodeficient HIV-infected individuals with indinavir.** *AIDS* 1997; **11**:485–491.
9. Holme PA, Muller F, Solum NO, Brosstad F, Froland SS, Aukrust P. **Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection.** *FASEB J* 1998; **12**:79–89.
10. Simmons G, Clapham PR, Picard L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, et al. **Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist.** *Science* 1997; **276**:276–279.
11. Malnati MS, Tambussi G, Clerici E, Polo S, Algeri M, Nardese V, et al. **Increased plasma levels of the C-C chemokine RANTES in patients with primary HIV-1 infection.** *J Biol Regul Homeost Agents* 1997; **11**:40–42.
12. Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. **Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood.** *Methods Mol Biol* 2004; **272**:13–28.
13. de Paulis A, Florio G, Prevete N, Triggiani M, Fiorentino L, Genovese A, Marone G. **HIV-1 envelope gp41 peptides promote migration of human Fc epsilon RI+ cells and inhibit IL-13 synthesis through interaction with formyl peptide receptors.** *J Immunol* 2002; **169**:4559–4567.
14. Torre D, Pugliese A. **Platelets and HIV-1 infection: old and new aspects.** *Curr HIV Res* 2008; **6**:411–418.
15. Nardi M, Karparkin S. **Antiidiotype antibody against platelet anti-GPIIb contributes to the regulation of thrombocytopenia in HIV-1-ITP patients.** *J Exp Med* 2000; **191**:2093–2100.

DOI:10.1097/QAD.0b013e328330da65

C. Discussion

La majorité des études traitant du rôle des plaquettes sanguines en tant que cellules de l'inflammation dans l'interaction avec le VIH sont réalisées sur des patients infectés sans réelle distinction du stade de la pathologie. Nos résultats après une étude effectuée sur des donneurs sains, s'inscrivent dans une approche originale de l'étude de l'interaction du VIH sur des plaquettes sanguines faiblement activées. La régulation fine du relargage du RANTES plaquettaire (et non du sCD62P) par certains peptides de la gp41, nous permet de penser que les plaquettes se comportent comme des cellules sentinelles de détection du « danger ». Il avait été montré précédemment que les plaquettes de patients HIV-positif stimulées par la thrombine sécrètent une quantité supérieure de RANTES pour des plaquettes issues de patients au stade SIDA [335]. La diminution de sécrétion de RANTES observée dans nos travaux amplifie la versatilité de cette molécule vis-à-vis de la réponse plaquettaire lors d'infection par le VIH-1. En effet, en diminuant la sécrétion de RANTES par les plaquettes, le VIH-1 présent dans le sang pourrait diminuer la réponse plaquettaire anti-virale, la molécule RANTES étant un ligand d'un des co-récepteurs du VIH.

La poursuite de ce travail concerne l'étude d'un plus large panel cytokinique plaquettaire (notamment le MIP-1 α et le PF4), ainsi que la nature des récepteurs impliqués dans ces interactions entre les plaquettes et le VIH. Il semble aussi primordial de rapprocher cette étude sur des études cliniques et prenant grand soin de discriminer le stade d'infection des patients mais aussi et surtout les traitements utilisés.

II) Article II: Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways

Julien Berthet^{1,2}, Pauline Damien², Hind Hamzeh-Cognasse², Bruno Pozzetto¹, Olivier Garraud^{1,2} and Fabrice Cognasse^{1,2}

¹EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France; ²GIMAP-EA3064, Université de Saint-Etienne – Membre de l'Université de Lyon, Faculté de Médecine, Saint-Etienne, France.

Publié dans British Journal of Haematology 2010 [336]

A. But de l'étude

Le TLR4 qui semble être fonctionnel est un récepteur clé dans l'immunité innée de par sa capacité à détecter les bactéries gram-négatif. Après fixation de son agoniste majeur, le lipopolysaccharide (LPS) sur le TLR4, ce dernier va recruter le couple adaptateur TIRAP/MyD88, activant alors la voie de signalisation MyD88-dépendante. De nombreuses protéines sont impliquées dans cette voie, notamment IRAK1, 2 et 4 ou TRAF6, et la finalité de cette voie est principalement l'activation du NFκB et des MAPKinases. Les plaquettes, comme nous l'avons vu, expriment le TLR4, ce dernier étant fonctionnel et provoquant, entre autre, une sécrétion régulée des granules α et denses [308],[159]. Zhang *et al.* ont montré que les plaquettes expriment les protéines MD-2 et MyD88 [322]. De plus, ils ont montré que cette voie semblait fonctionnelle.

Cependant, la signalisation en aval du TLR4 ne se limite pas à la seule voie MyD88-dépendante. En effet, et comme expliqué précédemment, la voie TRIF-dépendante peut aussi être activée mais d'une manière plus complexe. Après fixation du LPS au TLR4, le complexe nouvellement formé avec les protéines adaptatrices TIRAP/MyD88 se retrouve endocyté et une variation de la concentration locale en PIP₂ va alors désengager le couple TIRAP/MyD88 au profit du couple adaptateur TRAM/TRIF [300]. La fixation de ce dernier au TLR4 entraîne

l'activation d'une deuxième voie de signalisation dite TRIF-dépendante. Aucune étude ne s'est penchée sur cette voie au sein des plaquettes. Les plaquettes sont capables d'endocytose et même si le CD14 semble être primordial dans cette voie TRIF-dépendante, les plaquettes sont capables d'utiliser le CD14 soluble plasmatique [301].

Basée sur ces constatations, nous avons donc effectué cette étude afin de savoir si la voie de signalisation du TLR4, TRIF-dépendante, était présente au sein des plaquettes humaines.

B. Article publié

Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways

In addition to their roles in haemostasis and thrombosis, platelets are important players in several other processes and their role in inflammation is also recognized (Weyrich & Zimmerman, 2004). Platelets express transcription factors involved in non-genomic functions, including the positive and negative regulation of platelet activation. Recent studies (Malaver *et al.*, 2009; Spinelli *et al.*, 2010) have proposed that inhibition of platelet nuclear factor κ B (NF κ B) leads to the modulation of platelet function and that NF κ B may be a novel mediator of platelet response. NF κ B is the major transcription factor that regulates the genes involved in immune responses. The thrombin versus "immune" stimulation of platelets and their subsequent differential effects on the activation of signalling pathways as well as on specific protein-protein interactions and alpha granule release have recently been partly examined (Rex *et al.*, 2009). Platelets express the Toll-like receptor (TLR) 2, 4, and 9 molecules (Andonegui *et al.*, 2005; Cognasse *et al.*, 2005). TLRs are hallmarks of innate immunity and usually signal responsive cells to induce genes that produce defence proteins. However, the mechanisms involved in anucleated cells, such as platelets, remain unclear. In eukaryotic cells, activated TLRs recruit adapter molecules (e.g. MyD88 and TRIF) within the cytoplasm of cells in order to propagate a signal including the I κ B kinase kinase (IKK) complex that phosphorylates I κ B and subsequent NF κ B activation. NF κ B is then translocated to the nucleus where it

upregulates the transcription of various inflammatory cytokines genes.

In addition to membrane expression of TLRs, platelets also contain molecules with known immunomodulatory competences, and these molecules may either be accumulated mostly or released upon signalling and, depending on the nature of the molecule and prevailing environmental conditions.

Studies by our group and others have furnished evidence of a functional role for TLR2 and 4 on platelets (Clark *et al.*, 2007; Blair *et al.*, 2008; Cognasse *et al.*, 2008). However, the intracellular signalling pathways that mediate TLR2- and TLR4-induced platelet activation have not been investigated in detail. The aim of this study was to examine the platelet TLR4 machinery pathway.

Peripheral blood was collected from healthy donors in endotoxin-free 3.2% sodium citrate tubes (Vacutainer[®], Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifuging the blood at 150 g for 12 min at room temperature. Contamination (CD3-T cells, CD19-B cells and CD14-monocytes), determined by flow cytometry, was undetectable in PRP (data not shown). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were prepared as described previously (Hamzeh-Cognasse *et al.*, 2008), and cell lysates were prepared for use as positive controls in the Western blotting assay.

Table 1. TLR4 signalling pathway. Recognition of the ligand by TLR4 is aided by two adapter proteins MyD88 and TRIF. Monoclonal antibodies were used to study the proteins involved in signal transduction.

TLR4 signalling pathways	Adapter proteins	Proteins involved in signal transduction	Clone
MyD88-dependent pathways	MyD88 E-11 (Santa Cruz Biotechnology)	IRAK-1	C-2 (Santa Cruz Biotechnology)
		TRAF6	D-10 (Santa Cruz Biotechnology)
		JNKs	Polyclonal (Sigma-Aldrich)
		I κ B- α	Polyclonal (Millipore)
		NF- κ B p65	F-6 (Santa Cruz Biotechnology)
		MAPK	Polyclonal (Sigma-Aldrich)
MyD88-independent pathways	TRIF Polyclonal (Alexis Enzo Life Sciences AG)	TBK-1	108A429 (Imgenex)
		TRAF3	M-20 (Santa Cruz Biotechnology)
		IRF-3	3-F10 (Santa Cruz Biotechnology)
		IKK-i	107A1458 (Santa Cruz Biotechnology)
		I κ B- α	Polyclonal (Millipore)
		NF- κ B p65	F-6 (Santa Cruz Biotechnology)
		MAPK	Polyclonal (Sigma-Aldrich)

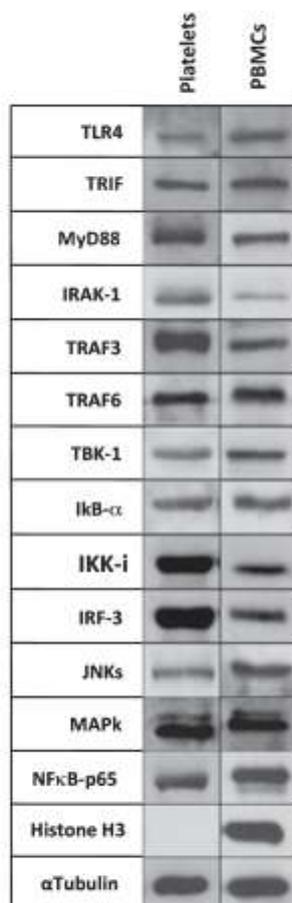


Fig. 1. Toll-like receptor 4 (TLR4) and expression of the molecular signalling pathway on platelets. Western blot analysis of the expression of TRIF, MyD88, TBK-1, IRAK-1, JNKs, MAPk, TRAF3, TRAF6, IRF-3, IKK-i, IκB-α and NF-κB p65 in platelets and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). α-Tubulin was used as the loading control. The histone H3 antibody was used as the negative control of the platelet protein extract. One representative experiment is shown. Western blotting was performed 15 times, and similar results were obtained in all runs.

Platelet protein extract (1 µg) was loaded in each well and separated on a 10% acrylamide gel (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The gel was then transferred onto a 0.45-µm nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia, Orsay, France) by electroblotting using transfer buffer supplemented with 20% methanol (Sigma-Aldrich). The blots were blocked overnight at 4°C in phosphate-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 1% bovine serum albumin (I.D. Bio, Limoges, France). These were then incubated for 60 min at room temperature with the primary antibody against TLR4 (1/500; Imgenex, San Diego, CA, USA) and TLR4 signalling pathway molecules as described in Table I. A histone H3 antibody (diluted 1/1000; Abcam, Cambridge, MA, USA) was used as the negative control for

the platelet protein extract. The blots were washed three times for 10 min with blocking buffer and again incubated for 60 min with the secondary antibody (horseradish peroxidase-linked goat anti-rabbit or anti-mouse antibody, diluted 1/100 000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Next, the blots were incubated with a chemiluminescent substrate according to the manufacturer's instructions (enhanced chemiluminescence [ECL]; Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) and exposed to radiographic film (Sigma-Aldrich).

We confirmed TLR4 expression on human platelets by using Western blotting (Fig 1). This technique was also used to detect the MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in platelets (Fig 1). We ascertained that no TLR protein pathways had originated from non-platelet cells, as there was no PBMC in the platelet preparations (data not shown). PBMC contamination was consistently undetectable (data not shown).

In this study, we found that platelets expressed TLR4, MyD88, IκB-α and NFκB p65, confirming data that has been recently reported by other groups (Spinelli *et al*, 2010). Moreover, the presence of TRIF, TBK-1, IRAK-1, JNKs, MAPk, TRAF3, TRAF6, IRF-3 and IKK-1 was also detected. To the best of our knowledge, this is the first report regarding the presence of these adapter proteins in platelets in general and their interactions with TLR4 in particular.

TLR4 ligands, such as lipopolysaccharide (LPS), bind to platelet TLR4, which differentially modulates the release of cytokines by platelets (Cognasse *et al*, 2008). LPS stimulates platelet secretion and aggregation via the TLR4/MyD88 receptor-signalling complex, as detailed recently. Our results are totally consistent with the finding that TLR4 is expressed on platelets (Andonegui *et al*, 2005; Cognasse *et al*, 2005). These present results also indicate that platelets contain the molecular machinery required for signalling via TLR4 in general (in nucleated eukaryotic cells).

However, it is unclear whether the effect of LPS on *in vivo* platelet activation is indeed due to the direct response of platelets to LPS. Further research is required to determine the relative importance of the TLR4/MyD88-dependent and -independent (TRIF) signalling complexes in platelets and how each of these is involved in the development of the inflammatory response and - in that perspective - drugs that target platelet TLRs and the TLR signalling pathway may be valuable in clinical settings.

Acknowledgements

We would like to thank Drs. C Argaud, C Aubrège, P Chavarin and C De Putter; F Boussoulade and C Antoine Arthaud (EFS Auvergne-Loire, France) for their help in obtaining and preparing the human blood cells. Financial support was received through grants from the Regional Blood Bank-EFS Auvergne-Loire, France.

Disclosure of Conflict of Interest

The authors state that they have no conflict of interest.

Julien Berthet¹
 Pauline Damien¹
 Hind Hamzeh-Cognasse¹
 Bruno Pozzetto¹
 Olivier Garraud^{1,2}
 Fabrice Cognasse^{1,2}

¹Université de Lyon, F-42023, Université de Saint Etienne, Jean Monnet, GIMAP, EA3064, F42023A, and ²EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France.

E-mail: fabrice.cognasse@univ-st-etienne.fr

References

- Andonegui, G., Kerfoot, S.M., McNagny, K., Ebbert, K.V., Patel, K.D. & Kubes, P. (2005) Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*, **106**, 2417–2423.
- Blair, P., Rex, S., Vitseva, O., Beaulieu, L., Tanriverdi, K., Chakrabarti, S., Hayashi, C., Genco, C.A., Jafrazi, M. & Freedman, J.E. (2008) Stimulation of Toll-Like Receptor 2 in Human Platelets Induces a Thromboinflammatory Response Through Activation of Phosphoinositide 3-Kinase. *Circulation Research*, **104**, 346–354.
- Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., Keys, E.M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C.J., Green, F.H. & Kubes, P. (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine*, **13**, 463–469.
- Cognasse, F., Hamzeh, H., Chavarin, P., Acquart, S., Genin, C. & Garraud, O. (2005) Evidence of Toll Like Receptor molecules on human platelets. *Immunology and Cell Biology*, **83**, 196–198.
- Cognasse, F., Hamzeh-Cognasse, H., Lafarge, S., Delezay, O., Pozzetto, B., McNicol, A. & Garraud, O. (2008) Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *British Journal of Haematology*, **141**, 84–91.
- Hamzeh-Cognasse, H., Cognasse, F., Palle, S., Chavarin, P., Olivier, T., Delezay, O., Pozzetto, B. & Garraud, O. (2008) Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation. *BMC Immunology*, **9**, 54.
- Malaver, E., Romaniuk, M.A., D'Atri, L.P., Pozner, R.G., Negrotto, S., Benzadon, R. & Schattner, M. (2009) NF-kappaB inhibitors impair platelet activation responses. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **7**, 1333–1343.
- Rex, S., Beaulieu, L.M., Perlman, D.H., Vitseva, O., Blair, P.S., McComb, M.E., Costello, C.E. & Freedman, J.E. (2009) Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release. *Thrombosis and Haemostasis*, **102**, 97–110.
- Spinelli, S.L., Casey, A.E., Pollock, S.J., Gertz, J.M., McMillan, D.H., Narasipura, S.D., Mody, N.A., King, M.R., Maggirwar, S.B., Francis, C.W., Taubman, M.B., Blumberg, N. & Phipps, R.P. (2010) Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor- κ B. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **30**, 591–598.
- Weyrich, A.S. & Zimmerman, G.A. (2004) Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends in Immunology*, **25**, 489–495.

Keywords: platelets, toll-like receptor, signalling pathway.

C. Discussion

Dans cette lettre, nous avons confirmé la présence du TLR4, du MyD88, de I κ B- α et de NF κ B-p65, déjà observé précédemment [337]. De plus, nous montrons pour la première fois la présence de la majorité des protéines des voies de signalisation MyD88 et TRIF-dépendantes. En effet, nous avons détecté la présence de TRIF, TBK-1, IRAK1, JNK, MAPk, TRAF3, TRAF6, IRF-3 et d'IKKi au sein de plaquettes sanguines humaines.

La présence de ces protéines au sein des plaquettes est la première étape de l'étude de ces voies de signalisation. Cette étude montre donc que les plaquettes semblent posséder la même machinerie moléculaire requise à la signalisation du TLR4 dans les cellules nucléées. Il reste à savoir s'il y a un lien direct entre la présence de ces protéines avec les résultats présentés précédemment qui montraient que le LPS provoque une dégranulation différentielle des granules α et denses plaquettaires [159].

III) Article III : Differential platelet TLR4 engagement and subsequent mononuclear cells mobilization after LPS exposure

Julien Berthet^{1,2}, Pauline Damien², Hind Hamzeh-Cognasse², Bruno Pozzetto², Archie McNicol³, Olivier Garraud^{1,2} and Fabrice Cognasse^{1,2}

¹ EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France; ² GIMAP-EA3064, Université de Saint-Etienne – Membre de l'Université de Lyon, Faculté de Médecine, Saint-Etienne, France ; ³ Department of Oral Biology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada.

Manuscrit en finalisation

A. But de l'étude

Le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram négative est un composant essentiel de la membrane bactérienne. Dans une cellule eucaryote, sa détection est médiée par le récepteur TLR4, dans un complexe pouvant comprendre la LBP, le CD14, le MD-2 mais aussi diverses protéines adaptatrices [293]. Deux voies de signalisation sont possibles après l'engagement du TLR4, une MyD88-dépendante et une TRIF-dépendante, menant à l'induction de cytokines pro-inflammatoires dans les deux cas, et d'interférons de type I pour la voie TRIF-dépendante. Ces deux voies sont différemment stimulées suivant la nature et la composition du LPS, principalement de la taille de sa chaîne polysaccharidique. En effet, les LPS dits « rugueux » au contraire des LPS dits « lisses » peuvent aussi stimuler la voie TRIF-dépendante et pas seulement la voie MyD88-dépendante.

Depuis la découverte des TLR plaquettaire, plusieurs équipes ont voulu savoir s'ils étaient fonctionnels ou seulement résiduels des précurseurs mégacaryocytaires. Il semble aujourd'hui admis que ces TLR plaquettaires, dont le TLR4, sont fonctionnels et leur stimulation peut notamment engendrer une dégranulation de certains granules plaquettaires [319],[322]. La fonctionnalité du TLR4 plaquettaire a été plus approfondie et la stimulation des plaquettes par

le LPS peut provoquer une dégranulation plaquettaire régulée mais aussi augmenter fortement l'épissage de l'ARN pré-messager de l'IL-1 β [159],[323].

Cependant, la signalisation en aval de l'implication du TLR4 plaquettaire n'est, à ce jour, que faiblement étudiée. Récemment, Zhang et al. ont montré que la réponse plaquettaire à la stimulation par le LPS pouvait impliquer le couple TLR4 et MyD88 [322]. Nous avons par la suite montré, pour la première fois, la présence de la majorité des protéines impliquées dans les voies de signalisation du TLR4 [336]. Nous voulons donc montrer que ces voies de signalisations sont fonctionnelles et que leur stimulation peut entraîner une signalisation régulée, à l'image de la signalisation des voies TLR4 dans les cellules eucaryotes.

B. Article en préparation

Differential platelet TLR4 engagement and subsequent mononuclear cells mobilization after LPS exposure

Running Title: **Platelets TLR4 activation**

Julien Berthet^{1,2}, Pauline Damien², Hind Hamzeh-Cognasse², Bruno Pozzetto², Archie McNicol³, Olivier Garraud^{1,2} and Fabrice Cognasse^{1,2*}

¹ EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France; ² GIMAP-EA3064, Université de Saint-Etienne--membre de l'Université de Lyon, Faculté de Médecine, Saint-Etienne, France ; ³ Department of Oral Biology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada.

Address for correspondence and reprint requests to Dr. F. Cognasse, EFS Auvergne-Loire and GIMAP-EA 3064, Université de Saint-Etienne, Faculté de Médecine, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France. Tel.: +33 4 77 42 14 67; Fax: +33 4 77 42 14 86; E-mail address: fabrice.cognasse@efs.sante.fr

Word count: 4878, Abstract: 257, References: 64, Figures: 6, Table: 0

Summary

Platelets are anucleated cells that play a unique role in primary haemostasis; besides, a role for platelets in inflammation has now been recognized. Platelets contain and secrete various cytokines, chemokines and associated molecules and they also express several transcription factors that exert non-genomic functions. We investigated the signaling pathway and release of soluble products upon selective TLR4 surface engagement in normal human platelets with two strains of gram negative bacteria, presenting with different LPS structures. The supernatants of stimulated (or not) platelet short cultures were assayed on PBMCs, considered as reporting (target) cells and their subsequent cytokine/chemokine production was measured as an indication of the differential platelet secretion pattern(s).

Platelet Rich Plasma (PRP) was obtained after soft centrifugation of blood from healthy volunteer donors, in order to preserve soluble molecules necessary for the TLR4 signalling, such as sCD14. We confirmed the expression of TLR4 and showed a differential release of soluble molecules from platelets, including sCD62P, RANTES, PF4, PDGF-AB and sCD40L, following stimulation of platelets with *E.coli* O111 or *S.minnesota* LPS. We demonstrated that two different pathways are involved after the engagement of the TLR4 with *E.coli* O111 or *S.minnesota* LPS. These signalling pathways and particularly α -phosphotyrosine activity were modulated differently dependant on the type of LPS stimulation. *E.coli* O111 or *S.minnesota* LPS stimulated platelets also stimulated differentially blood mononuclear cells IL-6, TNF α and IL-8 production in vitro. This data question the sentinel role of platelets in their environment, their capacity of sensing differentially even through one given PRR (for instance TLR4), and their subsequent immunoregulatory function.

Introduction

Lipopolysaccharides (LPS) are found on the outer leaflet of the outer membrane of Gram-negative bacteria. As the name implies, LPS consists of a lipid region, termed lipid A, covalently linked to a polysaccharide region [1, 2]. Classically, LPS interacts with CD14, a GPI-linked molecule that is however unable to mediate transmembrane signalling. Despite its signalling incapacity, but due to its high affinity for LPS and its interaction with additional transmembrane receptors, CD14, soluble or not, is an important regulator of the induction of the early step of the LPS signal transduction; co-signalling molecules play indeed another crucial role, especially in signal transduction [3]. LPS is separated in two groups depending on the O-polysaccharide chain extension. Indeed, an absence or a short chain correspond to LPS name “rough” because of the aspect of the bacterial colony; reciprocally, the LPS named “smooth” exhibits a long chain but proves a lesser capacity to bind the transmembrane co-signalling receptor for LPS identified as Toll-like receptor (TLR) 4. In eukaryote cells, TLR ligand signalling operates via interactions with adaptor proteins including principally MyD88 and alternatively toll-receptor associated activator of interferon (TRIF) [4, 5]. TLR4 can indeed signal through MyD88 as well as through MyD88-independent pathways, resulting in the activation of various intracellular signalling cascades, and subsequent activation of transcription factors of the nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B). NF- κ B/ $\text{i}\kappa$ B ultimately induces the transcription and the secretion of cell products including the one of inflammatory mediators [6]. The activation of these signalling pathways is dependent on the chemical structure of LPS engaged by the TLR4. As “smooth-type” LPS can activate only MyD88-dependant pathway, while the high affinity “rough-type” LPS is capable of binding TLR4 in such a manner that it can also activate the TRIF-dependant pathway and thus allow the production of IFN type I in mammalian cells [7].

Platelets are central to haemostasis; meanwhile, revisiting long known observations, there have been a recent flurry of investigations on the role of platelets beyond haemostasis, and particularly in innate immunity and inflammation [8-13]. Further, considering the multiple interactions of platelets with other immune cells, one can ever address the issue of their involvement in the linkage of innate and adaptive immunity. Our group has shown the presence of certain TLR molecules on human platelets, and that the percentage of TLR expression is significantly increased following activation [14]. Further, several studies including ours demonstrated a functional role for TLR4 on platelets [15-19]. Additionally, it has shown that stored platelets contain molecules with known immunomodulatory competences and differentially secrete them, at least *ex vivo* upon conservation with or without intended stimulation; moreover, this production varies upon the stimulation or resting conditions [20, 21]. Indeed, non-stimulated platelets and, foremost, stimulated platelets, demonstrate a huge capacity of releasing haemostatic, inflammatory, and immunomodulatory factors that prove to be bioactive in functional assays [22-25].

It is possible that a given pathogen may induce a given type of immune response. The rough *brucellae* attract and infect monocytes more effectively than smooth *brucellae*, but only smooth LPS phenotypes establish a specific host cell compartment permitting successful parasitism and that rough *brucellae* induce higher amounts than smooth *brucellae* of several CXC (GRO α , IL-8) and CC (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES) chemokines, as well as pro- (IL-6, TNF α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines released by challenged monocytes [26]. TLR4-MD-2 complex distinguishes LPS chemotypes [4] and Anas et al, show that CD14 modulates effects of both S-LPS and R-LPS within the lung in a similar way. Except for R-LPS-induced TNF release, S-LPS and R-LPS at low dose induced acute lung inflammation in a CD14-dependent manner, while the inflammatory response triggered by high dose S-LPS or R-LPS was diminished by CD14 [27].

This study now expands basic knowledge on platelets by demonstrating that those anucleated cells express receptor required for LPS signalling. LPS from two different strains of bacteria (smooth LPS of *Escherichia coli* and rough LPS of *S. Minnesota*) signal through the Toll-like receptor 4 (TLR4) complex and activate platelets with a strikingly different panel of platelet cytokines/chemokines subsequent release. To complete the phenotypic observation, we ascertained the functionality of the secreted proteins on reporting immune cells. Platelets can thus sense differentially danger signals such as provided by different LPS and respond consequently with the corresponding level of inflammation.

Materials and Methods

Platelet Preparation and Stimulation

Peripheral blood was collected from healthy donors in endotoxin-free [19, 23] 3.2% sodium citrate tubes (Vacutainer[®], Becton Dickinson, San Jose, California). Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifuging the blood at 150×g for 12 minutes at 22°C. Residual mononuclear cell counts were determined by flow cytometry. Contamination of platelets with mononuclear cells (CD3-T cells, CD19-B cells, and CD14-monocytes) was undetectable (data not shown). Platelets (3×10^8) were stimulated for 30 minutes at room temperature (RT) with either ultrapure LPS from *E. coli* 0111::B4 or *S. Minnesota* (Cayla-Invivogen, Toulouse, France; 1-10 µg/ml, 30 minutes, RT), or – alternatively – Thrombin Receptor Activator Peptide (TRAP) as a positive control (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France; 50µg/ml).

Flow Cytometry and Western Blot

Expression of TLR4 on the platelet surface was determined by flow cytometry analysis of all events positive for CD41, a characteristic platelet surface marker. Platelets

were labeled with a PE-conjugated anti-human TLR4 MoAb (clone HTA125, Imgenex, Flintkote, CA) or CD62p MoAb (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Positive events were recorded with a FACSCalibur (BD Biosciences) flow cytometer and analyzed with CELL QUEST PRO software from BD Biosciences [19, 23].

One microgram of platelet protein extract in each culture condition was loaded in each well and separated on a 10% acrylamide gel (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The gel was then transferred onto a 0.45- μ m nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia, Orsay, France) by electroblotting using transfer buffer supplemented with 20% methanol (Sigma-Aldrich) [28]. The blots were blocked overnight at 4°C in PBS containing 0.1% Tween 20 and 1% BSA (I.D. Bio, Limoges, France). These were then incubated for 60 min at room temperature with the primary antibody against TLR4 (1/500; Imgenex, San Diego, CA), TRIF (1/1000; Alexis Enzo Life Sciences AG, Lausen, Switzerland), MyD88 (1/200; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), TBK-1 (1/500; Imgenex), IRAK-1 (1/100; Santa Cruz Biotechnology), JNKs (1/2000; Sigma-Aldrich), MAPk (1/4000; Sigma-Aldrich), TRAF3 (1/200; Santa Cruz Biotechnology), TRAF6 (1/200; Santa Cruz Biotechnology), IRF-3 (1/100; Santa Cruz Biotechnology), IKK-i (1/100; Santa Cruz Biotechnology), I κ B- α (1/500; Millipore, Billerica, MA), NF- κ B p65 subunit (1/200; Santa Cruz Biotechnology) or phospho-tyrosine antibody 4G10 (1/1000, Upstate, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and α -tubulin (1/5000; Abcam, Paris, France). The blots were washed three times for 5 min with blocking buffer and again incubated for 60 min with the secondary antibody (horseradish peroxidase-linked goat anti-rabbit or anti-mouse antibody, diluted 1/100,000; Santa Cruz Biotechnology). Next, the blots were incubated with a chemiluminescent substrate according to the manufacturer's instructions (ECL Advance; Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) and exposed to radiographic film (Sigma-Aldrich). A histone H3 antibody (diluted 1/1000; Abcam) was used as the negative control for the platelet protein extract [28].

Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Cytokines in Platelet Supernatants

The levels of soluble cytokines sCD62p, RANTES, PDGF-AB, PF4, and sCD40L were measured in triplicate from aliquots of unstimulated (control), TRAP and TLR4 ligand-stimulated platelets using specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) (R&D Systems Europe Ltd., Lille, France or Abcys, Paris, France) as described before [22, 25]. Absorbance at 450 nm was measured with an ELISA reader (Multiskan EX; Labsystem, Helsinki, Finland).

PBMC isolation and stimulation

Human blood was obtained from healthy donors at the Auvergne-Loire Regional Blood Bank. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were prepared from Buffy-Coats as described previously [19, 29, 30]. PBMCs were isolated by gradient density centrifugation using histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). PBMCs were cultured at $5 \cdot 10^6$ /mL in RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (Sigma-Aldrich) supplemented exactly as described previously [19, 29, 30]. PBMCs were stimulated in the presence or absence of homologous platelet supernatant stimulated with TRAP or TLR4 Ligand. PBMC production of IL-6, TNF α , and IL-8 was measured from aliquots of cell-free culture supernatants (n = 10) with or without stimulation. Measurements of cytokine/chemokine production were made using a specific ELISA from commercial kits (R&D Systems Europe Ltd) according to the manufacturer's instructions, as described in the precedent paragraph.

Measurement of endotoxin levels in PLT concentrates

To ensure that bacterial contamination could not influence the observed *in vitro* biologic effects, PLT samples from each pool were tested for bacterial growth using conventional hemoculture techniques [23]. In addition, endotoxin levels were measured using a limulus amoebocyte lysate kit (QCL-1000, Cambrex Bio Science, Walkersville, MD) according to the manufacturer's instructions. Briefly, PLT samples were heated at 70°C for 10 minutes and then diluted in pyrogen-free water (1:20). Samples were at first incubated with limulus amoebocyte lysate for 10 minutes at 37°C, to which the chromagen was then added and incubated for an additional 6 minutes before reading the absorbance at 405 nm. The endotoxin levels were expressed as International Units (IU) per mL.

Statistical Analysis

Inter-experiment comparisons of cytokine concentrations or percentage of activation marker expression for the different culture conditions were analyzed using a Wilcoxon paired test. All values were reported as mean \pm SD and $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Platelets Express Components of the TLR4 Signaling Complex: TLR4, MyD88, and TRIF

TLR4 is expressed on human platelets [14, 15] it is confirmed by Western blot and flow cytometry analyses (Fig1A). The percentage of CD41+ TLR4+ platelets increase after TRAP (Thrombine) stimulation compared to unstimulated control (respectively 71 \pm 6.8% vs 61 \pm 6.8%; $P < 0.05$) (Fig1B).

TLR signaling in nucleated cells is transduced through either one adaptor, MyD88 or TRIF, to trigger the production of inflammatory cytokines or IFN type I. Western blot analyses using antibodies to MyD88 and TRIF subunits showed that both proteins were consistently present in purified human platelet lysates (Figure 1C). Stimulation with TRAP

considerably increased the expression of MyD88 and, to a lesser extent, of TRIF, also it has not been quantitated precisely. To ensure that the detected MyD88 and TRIF was unlikely to have originated from contaminating (nucleated, non-platelet) cells, we enumerated mononuclear cells in platelet preparations using flow cytometry and found that mononuclear cell contamination was consistently undetectable (data not shown). Platelet protein levels for MyD88 – and not of α -tubulin – was higher in the presence of TRAP in platelet culture conditions compared to PBMCs, showing the direct influence of stimulation on platelets and not on an eventually contaminant (Fig. 1C). The negative control consisted of histone H3 (present in PBMCs and absent in platelets) and thus, unstimulated PBMC protein extract was used as the positive control.

Platelet marker expression CD62 and TLR4 in presence of E. coli O111 or S. minnesota LPS

CD62P is a major component of alpha granule membranes in resting platelets and can be exported onto platelets; hence, it can be detected on the surface of activated platelets [31], from where it can be subsequently cleaved into its soluble form (sCD62P) [32]. The level of CD62P on the surface of fresh, non deliberately activated platelets was $48.5 \pm 6.8\%$ (Fig 2), consistent with a baseline level of activation. Following the addition of *E. coli* or *S. minnesota* LPS (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 30 min) there was no significant alteration of this expression ($49.7 \pm 4.3\%$ or $50.3 \pm 4.6\%$, respectively) (Fig 2), indicating that the platelets were not consistently activated by such bacterial components, a data conversely consistent with findings by others [15, 17, 33-35]. The addition of TRAP (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 30 min) was followed by an increase of CD62P expression ($78.9 \pm 16.4\%$ ($P < 0.05$)) (Fig 2), as a positive control for platelet activation. This effect was not due to endotoxin because no endotoxin in PLT sample concentrates was

detected; moreover by the limulus amoebocyte lysate assay (data not shown). Moreover, here, we used different ultrapure LPS preparations as describe by others groups [36, 37].

Modulation of platelet cytokine release after TLR4 engagement

The function of platelet TLR4 in ligand-induced secretory product release was examined; as could be expected from the CD62P membrane expression data, incubation of platelets with *E. coli* LPS (1 to 10 µg/ml for 30 min) had no significant effect on sCD62P release (Fig 3A) for any concentration tested, contrary to with the addition of TRAP (50 µg/ml for 30 min): 61.6±7.8 ng/ml vs 44.1±0.8 ng/ml (P< 0.05). In contrast, incubation of platelets with *E. coli* LPS resulted in a modest but significant increase in sCD40L levels 4.01±0.3 ng/ml vs 3.35±0.1 ng/ml. The optimal concentration of *E. coli* LPS were 3 µg/ml to obtain a significant response of platelet concerning sCD40L release (Fig 3B). On the basis of this analysis, in all additional experiments, we chose doses of stimuli that triggered this equivalent level of sCD40L production, sCD40L being a leading secretory, pro-inflammatory cytokine-like, platelet product [25, 38, 39].

E. coli LPS or S. minnesota LPS elicit distinct responses from platelet and cytokines released

We next examined the secretion of cytokines by platelets in response to exposure to various TLR4 ligands. Interestingly, there were striking differences in the levels of the sCD62P, PF4, RANTES and PDGF-AB induced by two different LPS stimuli. *S. minnesota* LPS, as opposed to *E. coli* LPS (as seen; Fig. 3A), induced a significant production of sCD62P over unstimulated control (52.01±6.4 ng/ml vs 38.23±3.6 ng/ml), corresponding to a 36% increase (Fig. 4A).

Both type of stimulations led to the production of cytokines by platelets exposed to LPS. However, the absolute amounts of cytokine secreted varied substantially from donor to donor; besides, the relative levels of the cytokines induced by both stimuli remained consistent for RANTES, PDGF-AB, sCD40L, whereas sCD62P was produced in the presence of *S. minnesota* LPS only, and PDGF-AB in the presence of *E. coli* LPS only (Fig 4A). Whereas the concentration of sCD40L almost doubled in TRAP stimulated platelets cultures (2.97 ± 0.2 ng/ml vs 1.32 ± 0.1 ng/ml, $P < 0.001$), it was consistently but more modestly augmented after platelet exposure to LPS: 2.26 ± 0.7 ng/ml and 2.60 ± 0.8 ng/ml, respectively, for *E. coli* and *S. minnesota* LPS ($P < 0.05$). No change in baseline PF4 level was observed following *S. minnesota* and *E. coli* LPS exposure (Fig. 4C). And there was a consistent decrease in the level of RANTES (2.59 ± 0.5 ng/ml and 2.34 ± 0.3 ng/ml vs. control: 3.90 ± 0.5 ng/ml; $P < 0.05$), possibly as a result of sequestration in platelet alpha granules [40, 41] whereas the positive control TRAP resulted in a significant increase (5.54 ± 0.6 ng/ml, $P < 0.05$) (Fig 4E). Platelet incubation with *E. coli* but not *S. minnesota* LPS also resulted in a significant decrease in PDGF-AB levels (0.07 ± 0.03 ng/ml vs. control: 0.60 ± 0.02 ng/ml; $P < 0.05$) (Fig 4D) possibly also a result of its sequestration in platelet alpha granules [19]; it remained unchanged with *S. minnesota*. These data demonstrate a different panel of these chosen secreted cytokines that may reflect consistent variation in the composition of platelet supernatants secreted after TLR4 engagement.

Platelet stimulation with E. coli or S. minnesota LPS modulate differentially Toll-like receptor 4 (TLR4) and the molecular expression signalling pathways in platelets

We confirmed TLR4 expression in human platelets lysates by using western blotting (Fig 5A), along with the MyD88-dependent and MyD88-independent molecules used to signal after TLR engagement (Fig 5). Figure 5 further confirms [42] platelet expression of

various molecules downstream of TLR signalling, actually MyD88 and TRIF. The purity of cell extract preparation was clean as no histone H3 was seen (Fig 5B). We next evidenced show that the expression of proteins downstream of the TLR4-engagement pathways differed depending on the biochemical nature of the TLR4::LPS ligation. For example, the expression of proteins TRIF and MyD88 were different after *E. coli* and *S. minnesota* LPS platelet stimulation compare to unstimulated platelet, with an increase of MyD88 preferentially with LPS *E. coli* and a decrease of TRIF expression after stimulation, as well as other downstream phosphoprotein candidates preceding the final target in the I κ B/NF κ B complex. We indeed observed that *E. coli* or *S. minnesota* LPS platelet stimulation modulated phosphorylation protein profiles by using a phosphotyrosine specific antibody 4G10: we found different phosphorylation patterns. Consistent changes and various phosphorylation protein profiles were observed after stimulation with the 2 LPS-types such as proteins ascribed to #1, 7, 8 and 9 as can be seen on figure 5C. The variation of the quantity or the state of phosphorylation of these proteins is consistent with the implication of these signalling molecules after TLR4 involvement and suggests the involvement of different signalling by *E. coli* or *S. minnesota* LPS platelet stimulation (fig 5C).

Supernatants from short term cultured Platelets stimulated with *E. coli* or *S. minnesota* LPS stimulate differentially blood mononuclear cells with different patterns of cytokine secretion

E. coli LPS or *S. minnesota* LPS elicited distinct responses from platelet exposed to it for 30 min; platelets likely responded to this stimulation by releasing platelet products that are bioactive. We thus tested for the effect of supernatants obtained in the various platelet culture conditions on PBMC responses, PBMCs being considered in this essay as reporting (target) cells indicating bioactivity. Only *S. minnesota* LPS proved potent enough to elicit a

substantial production of IL-6, IL-8 and TNF- α by platelets exposed to it, contrary to TRAP and to *E. coli* LPS stimulations (Fig 6A-C). We dosed the PBMC released IL-6 (Fig 6A), TNF α (Fig 6B) and IL-8 (Fig 6C). We noticed a significant increase in the concentration of IL-6, TNF α and IL-8 in *E. coli* LPS stimulation conditions as compared with *S. minnesota* LPS stimulation condition (IL-6: 0.66 ± 0.6 vs 7.71 ± 0.4 ng/ml, $P < 0.05$; TNF- α : 0.02 ± 0.01 vs 1.30 ± 0.07 ng/ml, $P < 0.05$; IL-8: 7.81 ± 1.5 vs 10.8 ± 0.9 ng/ml, $P < 0.05$).

These data emphasizes: 1) the issue that certain TLR4 engagement can ensue with effective signal transduction and protein secretion; 2) the issue that this effect is not generic to TLR4 engagement but depends on certain characteristics of LPS::TLR4 coupling, i.e. linked with the nature of the LPS, mainly the O-polysaccharide chain.

Discussion

The recent discovery of TLRs and particularly TLR4 on platelets [13, 14] was indeed unexpected development of platelet immunology studies, and led to propose a role for platelets in bridging innate to adaptive immunity [13, 43].

Platelets display various receptors that have been reviewed as being members of the innate immunity branch, such as Fc α , - ϵ and - γ receptors, and TLRs [44-46]. Platelets have also been shown to be able to bind and engulf various bacteria and viruses [47], though the precise mechanism remains imprecise: is this at least partly active or truly passive? As platelets cannot destroy those microbes because they are devoid of phago(lyso)some, this property can be regarded as either a disadvantage if such microbes hide in platelets behaving as cargos, leading to escape innate immunity and to dissemination, or to an advantage if platelets can signal themselves as carrying danger (according to the non self infectious danger theory [48]), prompting macrophages in the close environment to their scavenger function.

Because platelets express TLR molecules, one can make the assumption that they can sense external danger (by overexpressing TLR2 and TLR4 – and possibly others) and internal danger (by overexpressing the same PRRs and TLR9 as well) [14, 15, 17-19, 35, 43, 49-54]. As presented above, a functional role of TLR – and particularly TLR4 – in platelets has been studied in various mouse studies. It is controversial whether LPS is able to induce P-selectin expression in platelets, but contrary to findings from Zhang et al [35], several studies have clearly shown that the stimulation of such receptor lead to platelet activation, either if this activation does not display the general hallmarks of stimulated platelets [15, 17, 33, 34]. Nevertheless, a dedicated function of sensor to bacterial LPS - with functional capacity of transmitting information to the cell cytosol apparatus in order to achieve the function by secreting appropriate defence proteins - remains a seducing hypothesis, to be tested. We indeed sought to confirm the varying presence of TLR4 on platelet surfaces, that can increase upon stimulation by engagement with a “natural” TLR4 ligand, namely Gram negative bacterium LPS; we next took advantage of the presentation of LPS coming into two distinct biochemical structures to test whether the intensity and stochiometry of LPS bindings can deliver distinct signaling into the platelet. This hypothesis sounded worth to be tested in the innate immunity and inflammatory functions of platelets, because platelets discriminate between cytosol stored clotting factors to be released during the successive steps of primary haemostasis [12, 50, 55].

The TLR4 signalling pathways are mediated mainly by adaptor proteins such as MyD88 or TRIF which can be modulated by LPS stimulation. Lipopolysaccharides are ‘natural ligands’ of TLR4; they induce the production of various cytokines in mammalian cells, following the activation of transcription factors, including NF-kB and IRF-3, differentially activated depending on the adaptor protein [56, 57]. Despite considerable recent

insights into the TLR4 signalling pathway in anucleated cells, biologic effects of TLR4 ligation by LPS in non-nucleated cells (i.e. platelet) activation, remain largely misunderstood.

The present manuscript reveals: -i) that TLR4 is used differentially by platelets that face bacterial exposure; as platelets can sense two different LPS, one being able to bind TLR4 and not necessarily CD14, and the other being able to bind TLR4 by the help of the CD14 (soluble or not) [4]; -ii) that platelet TLR4 is thus used as a LPS danger sensor capable of increasing the level of transduction adaptor protein in such a manner that it can adapt to the signal received; -iii) that platelets can use two different patterns of cytokines and immunomodulatory secreted factors to respond to the danger signal accordingly; -iv) last, that platelets phosphorylate differentially proteins of the signalosome depending on the nature of the LPS stimulus. This data bring new insight in the understanding of platelets physiology in innate immunity: they do not permit, however, to link these novel information to the gene-encoded program: the still missing link between NF κ B translocator activation – which we showed - and *de novo* protein production (which is hypothesized by others [42, 58], but not as-yet ascertained), is a real cellular and molecular biology challenge.

In the present paper, we demonstrate that various LPS types have the ability to induce different platelet secretory responses that are differentially bioactive on reporting cells (PBMC). We also show here that stimulated platelets (with various LPS) induce platelet supernatants that differ in their contents and stimulate differentially blood mononuclear cells in terms of, e.g, IL-6, TNF α and IL-8 release. The data presented above provide clear evidence for a bimodal role of LPS in the platelet inflammatory responses. We thus, present novel evidence that the two major LPS phenotypes prompt to different platelet sensing and ligation with platelet TLR4 ligands and response with a different chemokine/cytokine pattern release. This work substantiates the work of Anas et al [27] who demonstrated, on a lung inflammation model in mice, by different LPS chemotypes: low doses of rough type LPS (but

not of smooth type LPS) induced TNF secretion in the lung in a CD14-independent manner, whereas PMN recruitment into the lung was induced by either LPS chemotype in a CD14-dependent manner. Moreover, the S. Vogel's group [59] also suggested that *P. gingivalis* LPS activates murine peritoneal macrophages through a TLR4-independent mechanism to elicit the production of IL-6 and TNF- α , but not IL-12(p70); in contrast, *E. coli* LPS does induce IL-12(p70) in macrophages, in addition to IL-6 and TNF- α . We hypothesised that blood platelets can sense danger signals.

Platelets are indeed non-nucleated cell elements that have two fundamental characteristics. 1) They do not possess active nucleic-acid based genomic system as do nucleated cells (meaning also repair systems). 2) Platelets carry a large number of glycoproteins, some to be released and others to be kept stored unless encountered with a given signal; those glycoproteins are considered to originate from three sources: i) inherited from the megakaryocytes; ii) absorbed from the environment (plasma); iii) produced *de novo* (still questioned). Platelets function with both (or eventually all three) glycoprotein sources: TLR4 is an example of the dual presentation of coupling TLR4 and LPS; on the one hand, LPS can signal dimers of TLR4, as shown by using model animals and suggested by our data presented herein; and on the other hand, LPS can signal combined TLR4/membrane absorbed soluble CD14. Attempts to clearly demonstrate those issues in platelets have limits: blockade of signalling pathways on and/or in platelets is technically particularly difficult because platelets cannot use repair systems as nucleated cells do. Further, the blockade of signalling pathways in/on platelets using MAbs – IgG in general – may interfere with binding to Fc γ Rs constitutively expressed on platelets. Platelets express an array of receptors that can interfere with platelet functionality testing; of major importance are Fc γ RII receptors. Moreover, the blockade of signalling pathways in/on platelets using inhibitory peptide was not able to dissect

the pathways in more detail because of a lack of currently available adapted reagents and methods.

The variability of the platelet signalosome seems to cause variability in the release of secretory products, as been already reported [12, 20, 42, 58, 60, 61]. Indeed, As described previously by other groups, we show that platelet responses are different against infectious or non-infectious agonists; thus, an infectious agonist cannot induce the membrane expression of P-selectin (and probably homotypic aggregation), as shown with haemostasis agonists such as thrombin, collagen or ADP [15, 17, 33-35]. Reciprocally, however, platelet supernatants after LPS (*S. minnesota* or *E. coli*) platelet stimulation induces a PBMC responses with cytokines/chemokines release.

In all, our data confirm the role of platelets like a signalling cells in the immune continuum [12]. There is no doubt concerning that platelets play a critical role in haemostasis and that they are also playing various roles in infection, sepsis and inflammation. However, their distinct immune role with proinflammatory soluble mediators as well as the expression of several surface receptors largely known for their involvement in inflammatory or immune processes, such as TLR4. Because of their rapid accumulation, aggregation and activation against pathogen (bacteria [62], virus [47] or parasite [63]), platelets can have early roles in sentinel and information transfer to environment immune cells who will make available advanced clearance mechanisms, which has also been suspected with a role for TLR in development, repair and haemostasis [64]. The demonstration here that platelet responses are finely regulated between infectious or not and more between different kind of bacteria, characterised here with the LPS smooth vs rough, implicates the platelet in the initiation or the perpetuation of a specific immune response against pathogen.

Acknowledgements

We would like to thank Christine Aubrège, Patricia Chavarin, Sophie Acquart, Charles-Antoine Arthaud and Françoise Boussoulade (EFS Auvergne-Loire, France) for their help in obtaining and preparing the human blood cells. We thank Dr A. Ros (Department of Microbiology, Laboratory of Bacteriology-Virology, CHU de Saint- Etienne, Saint-Etienne, France) for performing the endotoxin measurements. Financial support was received through grants from the Regional Blood Bank – EFS Auvergne-Loire, France.

Authorship Contributions and Disclosure of Conflicts of Interest

J.B. designed and performed the research, analyzed data and contributed to writing the paper

P.D. designed and performed the research and analyzed data

H.H.C. designed, performed the research, analyzed data, and contributed to writing the paper

S.L. performed the research and analyzed data

B.P. designed, performed the research, analyzed data, and contributed to writing the paper

A.McN. analyzed data and contributed to writing the paper

O.G. designed the research, analyzed data, wrote the paper, and supervised the entire project

F.C. designed the research, analyzed data, wrote the paper, and supervised the entire project

The authors declare no competing financial interests.

Legends:

Figure 1. Toll-like receptor 4 (TLR4) expression on platelets. **(A)** TLR4 was detected, by antibody labeling and flow cytometric analysis after gating for CD41+. Platelets were pre-treated (30 minutes, RT) with (w) or without (w/o) TRAP as described in Materials and Methods. One representative experiment is shown. **(B)** Summary of the flow cytometric analysis of TLR4 expression on CD41+ platelets, with (w) or without (w/o) TRAP stimulation. The mean percentage of CD41+ platelets positive for TLR4 expression is shown (mean \pm SD from five independent experiments). **(C)** Western blot analysis of TLR4, MyD88, and TRIF protein expression in platelets with (w) or without (w/o) TRAP stimulation. One representative experiment is shown; α -tubulin and Histon H3 was used as the loading control and PBMC protein extracts was showed to Western Blot control. The Western blot was performed five times with similar results.

Figure 2. CD62p expression on platelets. CD62p was detected by antibody labeling and flow cytometric analysis after gating for CD41+. Summary of flow cytometric analyses of CD62p expression by CD41+ platelets with (w) or without (w/o) TRAP, *E. coli* and *S. Minnesota* LPS stimulation. The mean percentage of CD41+ platelets positive for CD62p expression is shown (mean \pm SD from six independent experiments). * $P < 0.05$ (Wilcoxon paired test; stimuli versus unstimulated).

Figure 3. Platelet sCD62p and sCD40L release on platelets with (w) or without (w/o) TRAP or *E. coli* LPS. Platelets were incubated with TRAP or *E. coli* LPS (1 to 10 μ g/mL) as previously reported. The levels of sCD62p **(A)** and sCD40L **(B)** were quantified by ELISA. Background has been subtracted from values shown. Data (mean \pm SD; n = 5 experiments) are expressed in ng/ml. * $P < 0.05$ (Wilcoxon paired test; stimuli versus unstimulated).

Figure 4. Platelet sCD62p, sCD40L, PF4, PDGF-AB and RANTES release on platelets. Platelets were incubated (30 minutes, RT) with (w) or without (w/o) TRAP (50 µg/mL), *E. coli* (3 µg/mL) and *S. Minnesota* (3 µg/mL) LPS stimulation as previously reported. The levels of sCD62p (**A**), sCD40L (**B**), PF4 (**C**), PDGF-AB (**D**) and RANTES (**E**) were quantified by ELISA. Background has been subtracted from values shown. Data (mean ± SD; n = 5 experiments) are expressed in ng/ml. **P* < 0.05 (Wilcoxon paired test; stimuli versus unstimulated).

Figure 5. Toll-like receptor 4 (TLR4) and expression of the molecular signalling pathway on platelets. Western blot analysis of the expression of TLR4, TRIF, MyD88, TBK-1, IRAK-1, JNKs, MAPk, TRAF3, TRAF6, IRF-3, IKK- α , I κ B- α and NF- κ B p65 in platelets and PBMCs with (w) or without (w/o) TRAP (50 µg/mL), *E. coli* (3 µg/mL) and *S. Minnesota* (3 µg/mL) LPS stimulation. α -Tubulin was used as the loading control (**A**). The histone H3 antibody was used as the negative control of the platelet protein extract (**B**). One representative experiment is shown. The western blot was performed 5 times, and similar results were obtained in all runs. TRAP, *E. coli* and *S. Minnesota* LPS stimulation induces tyrosine phosphorylation in platelet protein extract (**C**). Cells were lysed and subjected to Western blot analysis. The blot was probed with an α -phosphotyrosine antibody (4G10). Molecular size markers (kDa) are shown.

Figure 6. Soluble factors IL-6, TNF- α and IL-8 released from PBMCs with (w) or without (w/o) platelet supernatant after TRAP, *E. coli* and *S. Minnesota* LPS stimulation. PBMCs were incubated for 24 hours at 37°C, 5% CO₂, with (w) or without (w/o) platelet supernatant after TRAP, *E. coli* and *S. Minnesota* LPS stimulation as described on Material and Methods.

The levels of IL-6 (**A**), TNF α (**B**) and IL-8 (**D**) were quantified by ELISA. Background has been subtracted from values shown. Data (mean \pm SD; n = 5 experiments) are expressed in ng/ml. * $P < 0.05$ (Wilcoxon paired test; stimuli versus unstimulated).

References

1. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
2. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990;249(4975):1429-31.
3. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(1):36-46.
4. Jiang Z, Georgel P, Du X, *et al.* CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* 2005;6(6):565-70.
5. Chang M, Jin W, Sun SC. Pelid facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nat Immunol* 2009;10(10):1089-95.
6. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*;11(5):373-84.
7. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17(1):1-14.
8. Elzey BD, Sprague DL, Ratliff TL. The emerging role of platelets in adaptive immunity. *Cell Immunol* 2005;238(1):1-9.
9. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005;115(12):3378-84.
10. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 2002;70(12):6524-33.
11. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007;100(1):27-40.
12. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol* 2004;25(9):489-95.
13. Cognasse F, Semple JW, Garraud O. Platelets as Potential Immunomodulators: Is There a Role for Platelet Toll-Like Receptors? *Current Immunology Reviews* 2007;3(2 (May issue)):109-15.
14. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll Like Receptor molecules on human platelets. *Immunology and Cell Biology* 2005;83(2):196-8.
15. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 2005;106(7):2417-23.
16. Cognasse F, Lafarge S, Chavarin P, Acquart S, Garraud O. Lipopolysaccharide induces sCD40L release through human platelets TLR4, but not TLR2 and TLR9. *Intensive Care Med* 2007;33(2):382-4.
17. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007;13(4):463-9.
18. Semple JW, Aslam R, Kim M, Speck ER, Freedman J. Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood* 2007;109(11):4803-5.
19. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br J Haematol* 2008;141(1):84-91.

20. Schubert P, Devine DV. Proteomics meets blood banking: identification of protein targets for the improvement of platelet quality. *J Proteomics* 2010;73(3):436-44.
21. Devine DV, Serrano K. The platelet storage lesion. *Clin Lab Med* 2010;30(2):475-87.
22. Cognasse F, Boussoulade F, Chavarin P, Acquart S, Fabrigli P, Lamy B, Garraud O. Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage. *Transfusion* 2006;46(7):1184-9.
23. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Acquart S, Chavarin P, Courbil R, Fabrigli P, Garraud O. Donor platelets stored for at least 3 days can elicit activation marker expression by the recipient's blood mononuclear cells: an in vitro study. *Transfusion* 2009;49(1):91-8.
24. Cognasse F, Osselaer JC, Payrat JM, Chavarin P, Corash L, Garraud O. Release of immune modulation factors from platelet concentrates during storage after photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion* 2008;48(5):809-13.
25. Cognasse F, Payrat JM, Corash L, Osselaer JC, Garraud O. Platelet components associated with acute transfusion reactions: the role of platelet-derived soluble CD40 ligand. *Blood* 2008;112(12):4779-80.
26. Rittig MG, Kaufmann A, Robins A, *et al.* Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J Leukoc Biol* 2003;74(6):1045-55.
27. Anas AA, Hovius JW, van 't Veer C, van der Poll T, de Vos AF. Role of CD14 in a mouse model of acute lung inflammation induced by different lipopolysaccharide chemotypes. *PLoS One* 2010;5(4):e10183.
28. Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, Garraud O, Cognasse F. Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways. *Br J Haematol* 2010.
29. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Chavarin P, Cogne M, Richard Y, Garraud O. Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins. *Exp Hematol* 2007;35(9):1376-87.
30. Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F, Palle S, Chavarin P, Olivier T, Delezay O, Pozzetto B, Garraud O. Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation. *BMC Immunol* 2008;9:54.
31. Metzelaar MJ, Korteweg J, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. Comparison of platelet membrane markers for the detection of platelet activation in vitro and during platelet storage and cardiopulmonary bypass surgery. *J Lab Clin Med* 1993;121(4):579-87.
32. Divers SG, Kannan K, Stewart RM, Betzing KW, Dempsey D, Fukuda M, Chervenak R, Holcombe RF. Quantitation of CD62, soluble CD62, and lysosome-associated membrane proteins 1 and 2 for evaluation of the quality of stored platelet concentrates. *Transfusion* 1995;35(4):292-7.
33. Ward JR, Bingle L, Judge HM, *et al.* Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. *Thromb Haemost* 2005;94(4):831-8.
34. Rumbaut RE, Bellera RV, Randhawa JK, Shrimpton CN, Dasgupta SK, Dong JF, Burns AR. Endotoxin enhances microvascular thrombosis in mouse cremaster venules via a TLR4-dependent, neutrophil-independent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290(4):H1671-9.
35. Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, Du X, Li Z. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol* 2009;182(12):7997-8004.
36. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440(7081):237-41.

37. Takahashi K, Sugi Y, Hosono A, Kaminogawa S. Epigenetic regulation of TLR4 gene expression in intestinal epithelial cells for the maintenance of intestinal homeostasis. *J Immunol* 2009;183(10):6522-9.
38. Blumberg N, Spinelli SL, Francis CW, Taubman MB, Phipps RP. The platelet as an immune cell-CD40 ligand and transfusion immunomodulation. *Immunol Res* 2009.
39. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczek RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391(6667):591-4.
40. El Golli N, Issertial O, Rosa JP, Briquet-Laugier V. Evidence for a granule targeting sequence within platelet factor 4. *J Biol Chem* 2005;280(34):30329-35.
41. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, Wendling F, Drouin A, Cramer EM. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood* 2000;96(4):1342-7.
42. Spinelli SL, Casey AE, Pollock SJ, *et al*. Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor- κ B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(3):591-8.
43. Aslam R, Speck ER, Kim M, *et al*. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor- α production in vivo. *Blood* 2006;107(2):637-41.
44. Takaya N, Katoh Y, Iwabuchi K, *et al*. Platelets activated by collagen through the immunoreceptor tyrosine-based activation motif in the Fc receptor gamma-chain play a pivotal role in the development of myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39(6):856-64.
45. Tomiyama Y, Kunicki TJ, Zipf TF, Ford SB, Aster RH. Response of human platelets to activating monoclonal antibodies: importance of Fc gamma RII (CD32) phenotype and level of expression. *Blood* 1992;80(9):2261-8.
46. Qian K, Xie F, Gibson AW, Edberg JC, Kimberly RP, Wu J. Functional expression of IgA receptor Fc α RI on human platelets. *J Leukoc Biol* 2008;84(6):1492-500.
47. Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* 2002;99(11):4021-9.
48. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001;13(1):114-9.
49. Hashimoto K, Jayachandran M, Owen WG, Miller VM. Aggregation and microparticle production through toll-like receptor 4 activation in platelets from recently menopausal women. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;54(1):57-62.
50. Rex S, Beaulieu LM, Perlman DH, Vitseva O, Blair PS, McComb ME, Costello CE, Freedman JE. Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release. *Thromb Haemost* 2009;102(1):97-110.
51. Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol* 2008;181(5):3495-502.
52. Blair P, Rex S, Vitseva O, *et al*. Stimulation of Toll-Like Receptor 2 in Human Platelets Induces a Thromboinflammatory Response Through Activation of Phosphoinositide 3-Kinase. *Circ Res* 2008;104(3):346-54.
53. Damas JK, Jensenius M, Ueland T, *et al*. Increased levels of soluble CD40L in African tick bite fever: possible involvement of TLRs in the pathogenic interaction between *Rickettsia africae*, endothelial cells, and platelets. *J Immunol* 2006;177(4):2699-706.

54. Stahl AL, Svensson M, Morgelin M, *et al.* Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets via TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2006;108(21):167-76.
55. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev* 2005;19(2):111-23.
56. Hatada EN, Krappmann D, Scheidereit C. NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000;12(1):52-8.
57. Sakaguchi S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nat Immunol* 2003;4(1):10-1.
58. Schubert P, Devine DV. De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. *Vox Sang* 2010.
59. Salkowski CA, Detore GR, Vogel SN. Lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A differentially regulate interleukin-12, gamma interferon, and interleukin-10 mRNA production in murine macrophages. *Infect Immun* 1997;65(8):3239-47.
60. Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, *et al.* Platelet functions beyond haemostasis. *J Thromb Haemost* 2009;7:1759-66.
61. Bozza FA, Shah AM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Amicus or adversary: platelets in lung biology, acute injury, and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;40(2):123-34.
62. Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(6):445-57.
63. Joseph M, Gounni AS, Kusnierz JP, *et al.* Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *Eur J Immunol* 1997;27(9):2212-8.
64. Medzhitov R. Innate immunity: quo vadis? *Nat Immunol* 2010;11(7):551-3.

Figure 1

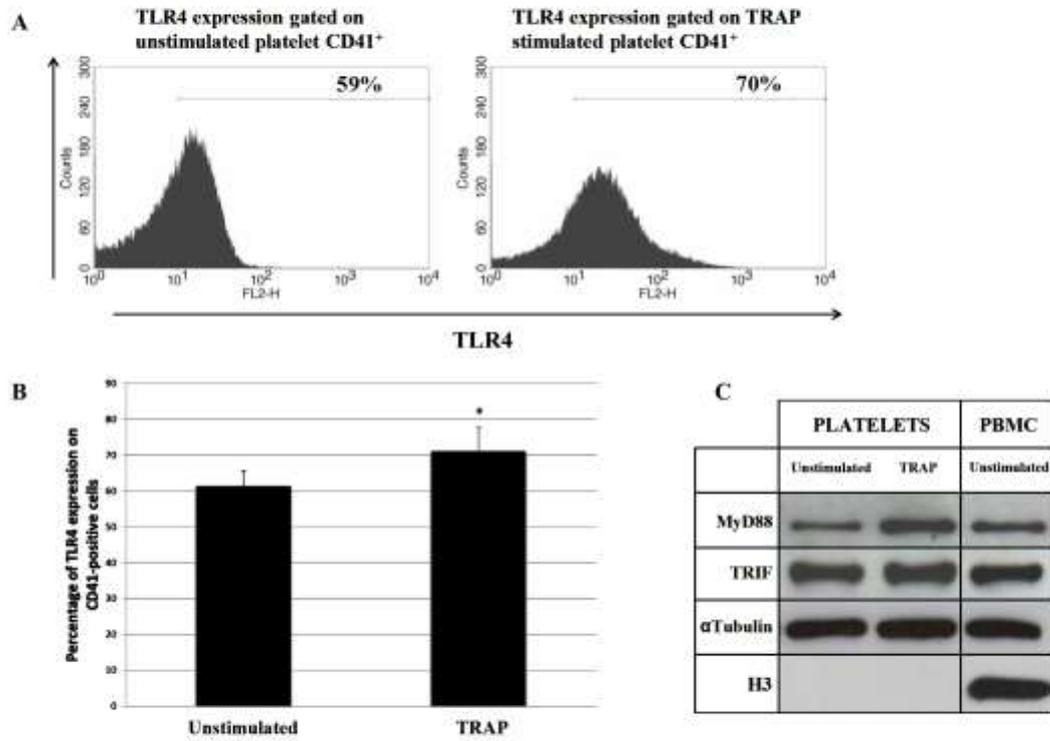


Figure 2

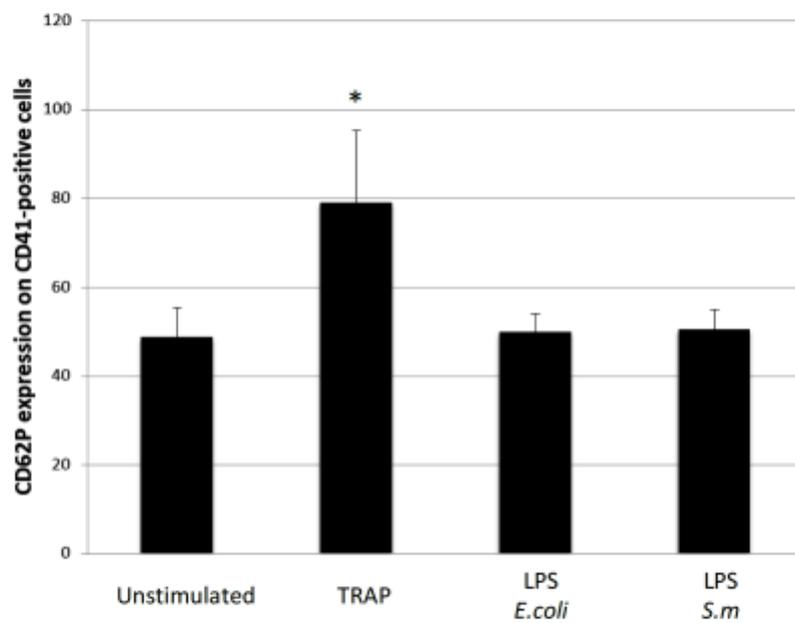


Figure 3

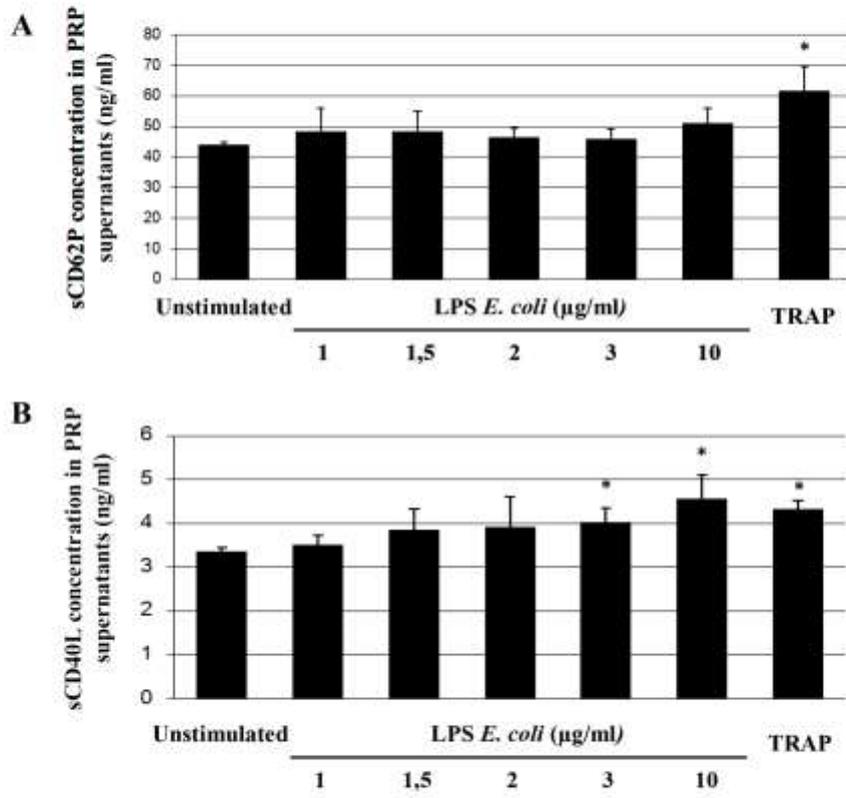


Figure 4

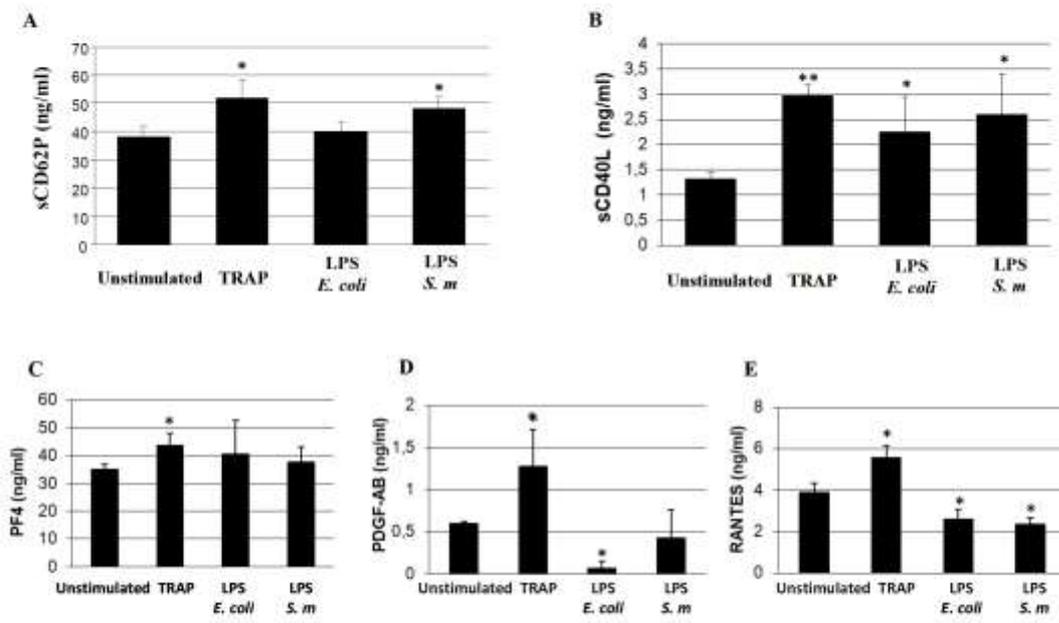


Figure 5

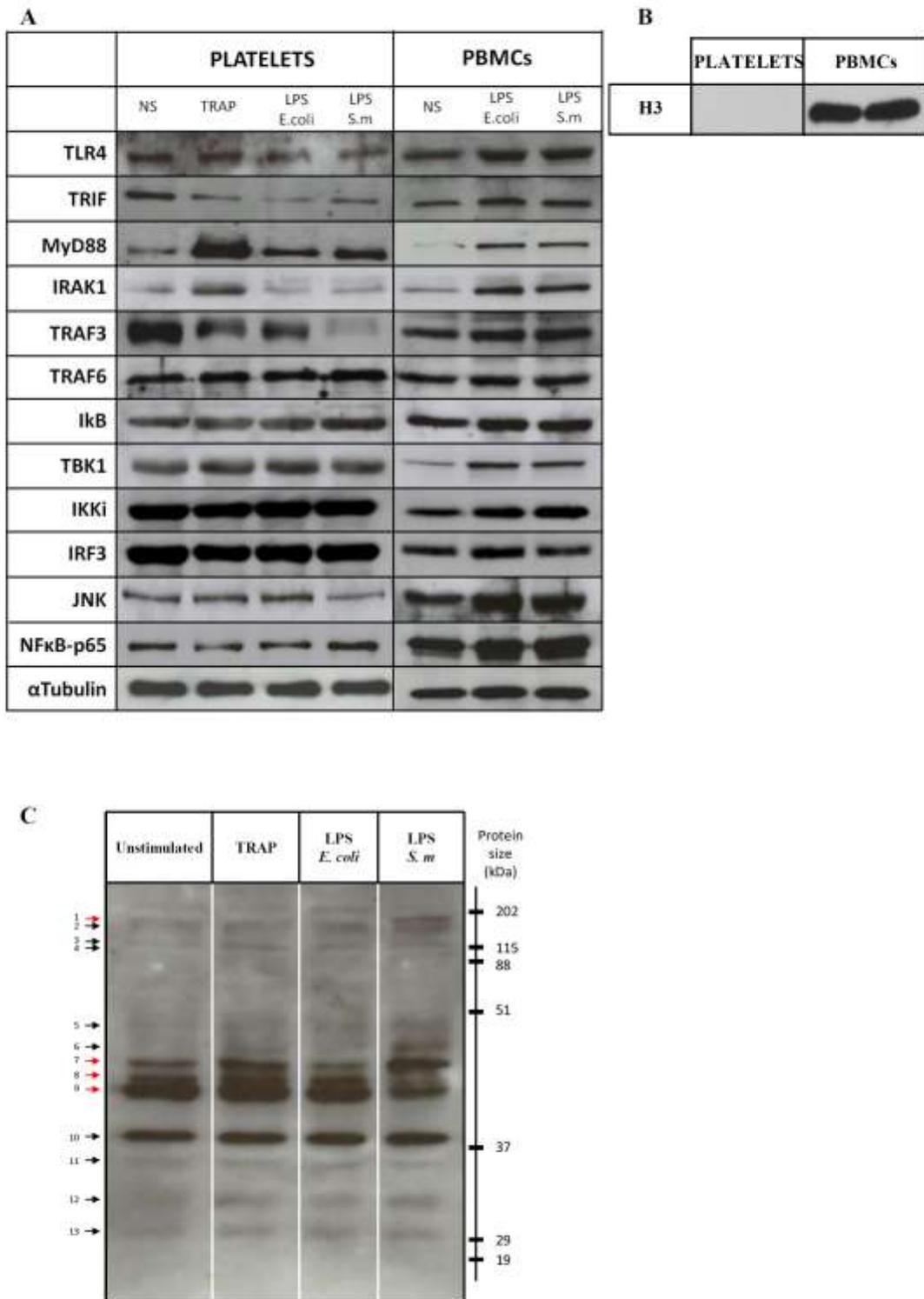
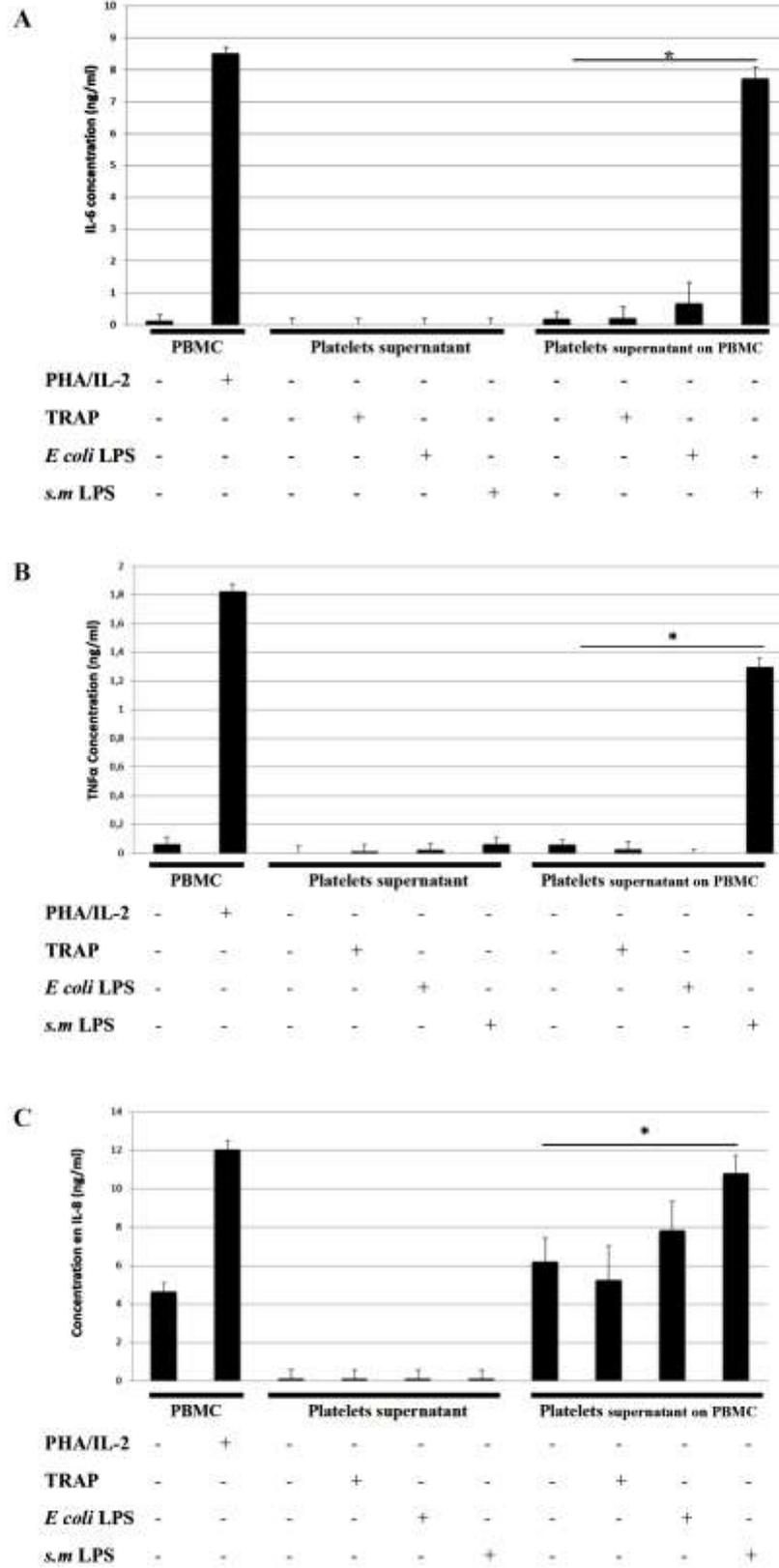


Figure 6



C. Discussion

La régulation des voies de signalisation du TLR4 n'est pas encore totalement élucidée. Pour autant, il est maintenant admis que les protéines adaptatrices jouent un rôle primordial dans cette régulation en orientant la signalisation en aval du complexe TLR4. Aussi, l'importance de l'affinité du ligand, en l'occurrence le LPS, sur le récepteur semble être un biais pour l'orientation de la signalisation dans le sens qu'un LPS possédant une forte affinité va permettre l'internalisation du complexe TLR4, décrochant alors le MyD88 et ainsi permettre à la protéine adaptatrice TRIF de se fixer à ce complexe [301].

Après la découverte récente des TLR plaquettaires, et en particulier du TLR4, les principaux travaux, au sein de ces cellules anucléées, portaient sur leur fonctionnalité. Nous avons, pour la première fois, montré la présence, au sein de plaquettes sanguines humaines, de la majorité des protéines impliquées dans les voies de signalisation du TLR4 [336]. Nous démontrons dans cette étude que la quantité de certaines de ces protéines est, de plus, modulée par un mécanisme inconnu lors de l'ajout de LPS sur les plaquettes. En stimulant les plaquettes par deux types de LPS, un lisse et un rugueux, respectivement les LPS d'*E. coli* et de *S. minnesota*, nous montrons que les plaquettes vont libérer, en partie, le contenu de leurs granules. Cependant, cette libération semble régulée ; les deux LPS ne vont pas permettre la libération de mêmes molécules par les plaquettes.

De plus, nous avons montré, en cultivant des cellules mononucléaires sanguines (PBMC) avec des surnageants de plaquettes stimulées par des LPS différents, que le contenu de ces surnageants diffère selon le type de LPS. En effet, seules les plaquettes stimulées par le LPS de *S. minnesota* peut entraîner une forte libération d'IL-6, de TNF α et d'IL-8 par les PBMC.

Enfin, nous montrons dans cette étude qu'il semble y avoir une réelle dichotomie entre l'effet de stimuli hémostatiques ou de stimuli infectieux sur les plaquettes. En effet, alors que la thrombine (TRAP) engendre une dégranulation plaquettaire forte – toutes les cytokines testées sont fortement libérées après une stimulation par TRAP – le surnageant de plaquettes stimulées par TRAP n'est pas capable, par rapport au surnageant de plaquettes non stimulées, d'entraîner une libération d'IL-6, de TNF α et d'IL-8 par les PBMC [322].

De par leur rapide accumulation, agrégation et activation contre les pathogènes (bactériens, viraux ou parasitaires), les plaquettes peuvent avoir des rôles précoces de sentinelle et de transfert d'information aux cellules immunitaires environnantes afin d'améliorer la clearance de ces pathogènes [217],[225],[231]. Nous démontrons ici que les réponses plaquettaires sont finement régulées entre les stimuli infectieux ou non et, plus important, entre les différents types de bactéries, caractérisées ici avec les LPS lisses ou rugueux. Les plaquettes semblent donc suffisamment armées pour initier ou perpétuer une réponse immune spécifique d'un pathogène.

Discussion et Perspectives

Les plaquettes sanguines ont souvent été mises en avant de par leur rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie et dans la réparation vasculaire. Même si des études du début du siècle dernier montraient un rôle inflammatoire des plaquettes, ce n'est que lors de la dernière décennie que les plaquettes ont été replacées dans le « continuum immunitaire » [8],[182]. En effet, ces éléments cellulaires anucléés expriment de nombreux récepteurs de l'immunité et ont la possibilité de libérer de nombreuses cytokines, chimiokines et facteurs de croissance pouvant influencer la réponse immunitaire, la croissance tissulaire et vasculaire mais aussi permettre la migration cellulaire [180]. Parmi ces éléments, plusieurs travaux ont mis en avant le sCD40L, facteur soluble fortement impliqué dans de multiples réactions immunitaires ; 95% du sCD40L présent dans la circulation sanguine est d'ailleurs d'origine plaquettaire et sous une forme active [118]. En plus de libérer d'autres molécules immunomodulatrices lorsqu'elles sont activées, les plaquettes sanguines sont présentes en forte concentration sur les sites de brèches vasculaires et d'expositions à des agents d'agression exogènes. Il peut notamment y avoir une exclusion de ces agents dans le clou plaquettaire puis dans le caillot de fibrine, faisant des plaquettes des cellules pouvant jouer un rôle majeur dans la mise en place des premières lignes de défense immunitaire.

De nombreuses situations inflammatoires et/ou molécules peuvent activer les plaquettes (thrombine, ADP, forces de cisaillement, etc...), mais les réponses observées, notamment en terme de libération de facteurs solubles immunomodulateurs, varient fortement en fonction de l'agoniste [66], de sa concentration [66], de la quantité de plaquettes [118], du temps de présence de l'agoniste [172], de la température [338] mais aussi de facteurs propres à l'individu étudié (bruit de fond génétique pouvant rendre compte d'éventuels polymorphismes génétiques puis moléculaires (HPA, TLR,..)) [339]. Ces éléments rendent les plaquettes sanguines difficiles à étudier *in vitro* et la méthodologie choisie est un élément important à prendre en compte dans nos travaux. Nous avons privilégié dans notre étude le « Plasma Riche en Plaquettes » (PRP) non lavé afin de conserver des conditions d'études plaquettaires les plus proches possibles de celles retrouvées dans la circulation sanguine. Nous avons pu constater que, contrairement à ce qui était précédemment décrit, les plaquettes ne sont pas de simples « containers à cytokines/chimiokines » libérant la totalité de leur contenu dès qu'elles sont activées. Dans le premier article présenté dans ce manuscrit [329], la

stimulation des plaquettes par certains peptides composants une partie de la protéine d'enveloppe du VIH (gp41) entraîne une diminution de la libération de RANTES dans le surnageant de plaquettes *in vitro* alors que les contrôles *ad hoc*, toutes autres conditions techniques étant identiques par ailleurs, ne permettent pas cette variation. Cette étude vient compléter des travaux précédents allant plus loin que les anciennes hypothèses du « tout ou rien » de la réponse plaquettaire, mais allant plutôt dans le sens d'une régulation, la démonstration de cette régulation demeurant l'enjeu majeur de nos travaux actuels et à venir [158].

En 2005, notre équipe a montré la présence de certains TLR à la surface des plaquettes avec une variation d'expression en fonction de l'état d'activation plaquettaire [307]. Peu de temps après, les travaux de plusieurs équipes ont montré un caractère fonctionnel de ces molécules pour les plaquettes sanguines chez les souris et les hommes [308]. La découverte des TLR plaquettaires fonctionnels a été un élément primordial dans la définition du rôle plaquettaire dans « le continuum immun » [8], [118]. En effet, en exprimant des récepteurs de l'immunité, directement capables de détecter la présence de microbes variés, les plaquettes font montre de l'existence d'un arsenal de détection remarquable « à priori inattendu » pour une cellule anucléée. Le lien entre l'engagement des TLR et l'activation plaquettaire a rapidement été testé et parfois contesté. Des travaux de l'équipe de Sabroe montrent que la stimulation de ces TLR n'entraînait pas d'activation plaquettaire (expression du CD62P membranaire) ni d'agrégation [310]. En effet, et plusieurs équipes dont la nôtre le démontrent également, la présence d'agonistes au TLR4 ne permet pas une surexpression membranaire de CD62P, molécule importante à l'adhésion des plaquettes entre elles, et donc à l'agrégation [94],[158] (Article III). Les plaquettes semblent cependant pouvoir faire la différence entre un stimulus hémostatique et un stimulus infectieux, provoquant des variations dans l'expression membranaire de molécules d'adhésion, d'activation mais aussi dans le relargage du contenu des granules, alimentant bien la discussion d'une certaine « régulation » des produits mobilisés, qui pourraient être différents si le danger est traumatique, vasculaire ou infectieux imposant une réponse inflammatoire « immédiate ».

En concentrant nos travaux sur le TLR4, nous avons tenté d'appréhender les mécanismes permettant de comprendre comment l'engagement d'un récepteur membranaire par un stimulus infectieux (LPS) pouvait provoquer une activation des plaquettes de manière différentielle à l'activation par un stimulus de nature hémostatique (TRAP). L'engagement du TLR4 des cellules eucaryotes conduit à une signalisation complexe et régulée permettant *in fine* l'activation et la translocation de facteurs nucléaires impliqués dans la régulation génique ; le NFκB en est la principale cible en amont du gène. Il a récemment été montré que cette molécule est présente dans les plaquettes, et qu'elle participe à la réponse plaquettaire, même s'il n'est pas encore expliqué comment un facteur nucléaire pouvait agir au sein d'une cellule anucléée [337]. Cependant, il faut prendre en compte que l'étude du NFκB plaquettaire est difficile à mener *in vitro*, car les inhibiteurs du NFκB affectent potentiellement de nombreuses voies de signalisation [324]. Les travaux de l'équipe de Schattner essayent partiellement de comprendre les rôles potentiels non-génomiques du NFκB, grandement impliqués dans les voies de signalisation des TLR [324].

Un élément de réponse pourrait être donné par la découverte récente d'ARN pré-messager en grande quantité dans les plaquettes matures, et surtout que l'épissage de ses ARN pouvait être régulé par l'activation plaquettaire [126]. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que les stimuli infectieux entraînent un épissage des ARN pré-messagers bien supérieur à celui provoqué en réponse à des stimuli hémostatiques [323]. Parmi les stimuli infectieux, les LPS, ligands du TLR4, provoquent notamment un épissage très fort de l'ARNm de l'IL-1β. Nous avons voulu comprendre comment le LPS pouvait agir sur les plaquettes, notamment en se concentrant sur la voie de signalisation du TLR4 plaquettaire et la libération de facteurs immunomodulateurs.

Nous avons confirmé dans un premier temps que l'expression membranaire du CD62P n'augmentait pas après stimulation par les LPS et que la libération de sCD62P n'était pas augmentée par la stimulation des plaquettes par du LPS d'*E. coli* dans nos conditions expérimentales. Cependant, le LPS de *S. minnesota* provoque quant à lui une libération de sCD62P plus forte que les contrôles adaptés.

Il a été démontré depuis plusieurs années que les LPS pouvaient être très différents suivant les espèces bactériennes, mais aussi les souches [269]. Une classification permet de différencier les LPS en deux catégories suivant la longueur de la chaîne polysaccharidique et l'aspect des colonies en résultant ; une longue chaîne provoque des colonies lisses (« smooth »), l'absence, ou une chaîne courte, cause des colonies rugueuses (« rough »). Concernant les cellules eucaryotes portant le TLR4, le LPS lisse possède de faibles capacités de fixation au TLR4 et entraîne une voie de signalisation menant à l'expression de cytokines pro-inflammatoires, le LPS rugueux va quant à lui se fixer plus fortement au TLR4 et provoquer son endocytose afin de permettre, en plus de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, l'expression d'IFN de type I. Les voies de signalisation associées à ces productions sont régulées par des protéines adaptatrices, notamment MyD88 et TRIF, la première étant liée à la production de cytokines pro-inflammatoires, la seconde aux IFN de type I. Dans les cellules eucaryotes, de nombreuses protéines associées sont impliquées dans ces cascades de phosphorylation menant à l'activation et la translocation de facteurs nucléaires tels que le NFκB et IRF3 [293].

Concernant les plaquettes sanguines, nous avons été les premiers à montrer la présence de la majorité des protéines impliquées dans les cascades de signalisation, et notamment, la voie TRIF-dépendante qui, contrairement à la voie MyD88-dépendante, n'était pas encore décrite au sein des plaquettes [322],[336]. En effet, nous avons montré la présence, dans le cytosol des plaquettes humaines, de la majorité des molécules impliquées dans les voies de signalisation du TLR4, c'est-à-dire TRIF, IRAK-1, TRAF3, TRAF6, TBK-1, IKKi et IRF3 et confirmé la présence de MyD88, IκB-α, JNK, MAPk et NFκB-p65 [336].

Nous avons voulu montrer que ces deux voies de signalisation sont fonctionnelles. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser deux types de LPS, un de type lisse (LPS *E. coli* O111:B4) et un de type rugueux (LPS *S. minnesota*), tous deux ultrapures et de référence afin d'éviter les problèmes d'activation de la voie TLR2 que peuvent provoquer des LPS moins purifiés de sociétés commerciales dont les méthodes de purification de LPS sont souvent critiquées par la communauté scientifique. D'une manière semblable à ce que nous avons montré précédemment, la stimulation des plaquettes par le LPS n'engendre pas une libération forte des

facteurs solubles, comme peuvent le faire d'autres agonistes (thrombine) [159]. Mais, la stimulation plaquettaire par l'un ou l'autre des deux types LPS va entraîner une sécrétion différentielle des facteurs solubles. Ainsi, sur un panel de 5 cytokines/chimiokines testées, on constate que deux, le sCD62P et le PDGF-AB, ne sont pas sécrétés de la même façon (article III, fig4). Ces résultats amènent deux constatations : 1) l'utilisation générique d'un seul type de LPS pour les études du rôle inflammatoire des plaquettes ne représente pas la réalité physiologique de l'engagement de la voie TLR4 et, 2) 5 cytokines/chimiokines ne sont certainement pas suffisantes pour représenter les variations de « profils » de libération des facteurs solubles plaquettaires suivant l'agoniste.

L'étude du profil d'expression protéique mais aussi du profil de phosphorylation des protéines plaquettaires nous a permis de mettre en évidence une variation de certaines protéines des voies de signalisation du TLR4. Le MyD88, par exemple, est très fortement surexprimé après stimulation par la thrombine, probablement afin de rendre les plaquettes plus réactives en cas de stimuli infectieux. De plus, le MyD88 est aussi surexprimé de façon différentielle, dans une moindre mesure, lors de stimulation par les deux LPS testés. Cette observation est à mettre en parallèle des travaux de l'équipe de Weyrich qui montraient déjà qu'une stimulation par un agoniste hémostatique augmente l'épissage du pool d'ARN pré-messagers codant notamment pour l'IL-1 β présents au sein des plaquettes mais aussi des travaux de l'équipe de McIntyre qui montrent que la stimulation des plaquettes par du LPS (*E. coli*) entraîne un épissage rapide et important des ARN pré-messagers codant pour l'IL-1 β et la cyclooxygénase-2 [126],[323]. Une majorité d'équipes travaillant sur le TLR4 plaquettaire pré-active les plaquettes par un agoniste tel que la thrombine ou le collagène avant de les mettre en présence de LPS [322]. Aussi, nos travaux permettent d'amener une explication sur le fait que cette pré-activation va mobiliser une partie des protéines nécessaire à la voie MyD88-dépendante, notamment le MyD88, et donc augmenter fortement les réponses obtenues après ajout de LPS. De plus, le profil de phosphorylation (phosphotyrosine) que l'on présente en figure 5B de l'article III montre clairement que ce ne sont pas les mêmes protéines qui sont phosphorylées en fonction du type d'engagement du LPS sur le TLR4 (LPS *E. coli* vs LPS *S. minnesota*).

Afin de mieux appréhender la réponse plaquettaire suivant le type de LPS utilisé pour engager le TLR4, dans un contexte *in vitro*, mais en tenant compte de l'environnement cellulaire des plaquettes, nous avons mis en co-culture le surnageant de plaquettes, préalablement stimulées par le TRAP, le LPS d'*E. coli* ou le LPS de *S. minnesota*, avec des cellules mononucléées de la circulation sanguine (PBMC), utilisées comme cellules reportrices dans cette étude. Le surnageant provenant de plaquettes stimulées par le LPS *S. minnesota* a provoqué une très forte augmentation de libération d'IL-6 et de TNF- α , phénomène non observé avec le surnageant provenant de plaquettes stimulées par le LPS d'*E. coli*. Les plaquettes stimulées par la thrombine n'ont, elles, pas libéré, en culture, d'éléments activateurs des PBMC susceptibles d'augmenter la sécrétion de facteurs solubles. En effet, dans notre modèle d'étude, le surnageant des plaquettes stimulées par TRAP n'active pas plus les PBMC que le surnageant de plaquettes non activées. De nouveau, les conclusions de nos observations peuvent être multiples : 1) une stimulation non infectieuse mais hémostatique (TRAP) ne semble pas provoquer la libération, par les plaquettes, de molécules pouvant activer les PBMC, 2) tous les stimuli infectieux utilisés pour activer les plaquettes ne pourront pas, en réponse, faire relarguer systématiquement des molécules pouvant activer les PBMC, permettant alors d'émettre l'hypothèse d'une certaine régulation de la réponse plaquettaire et de son influence sur les cellules environnantes et enfin 3) le panel de cytokines/chimiokines testé précédemment est effectivement trop restreint dans le sens que toutes les cytokines/chimiokines que nous avons testées sont libérées de manière statistiquement supérieures par les plaquettes après une stimulation par un analogue de la thrombine mais que ce même surnageant est incapable d'activer seul les PBMC, dans notre modèle d'étude, contrairement aux surnageants de plaquettes stimulées par le LPS *S. minnesota*. Une des limites à notre étude sur les variations cytokiniques provient des qualités intrinsèques des plaquettes à sur-exprimer les récepteurs à certaines cytokines sécrétées après activation, limitant alors la détection de ces molécules dans les surnageants dosés.

Même si l'on est loin de comprendre et d'apporter tous les éléments de réponse concernant la régulation de la réponse plaquettaire après engagement du TLR4, nous constatons qu'une boucle de régulation est mise en place. Notre démonstration prouve qu'une réponse plaquettaire dirigée est possible suivant les molécules et/ou les pathogènes avec

lesquels elles sont en présence. Au sein du laboratoire des études publiées [210] et en cours de publication (Annexe I) montrent une différence entre les interactions directes ou indirectes des plaquettes et des cellules dendritiques ou des PBMC, complexifiant ainsi nos résultats. Il nous semble donc important de prendre en compte la physiologie plaquettaire, en terme de réponse inflammatoire, lors d'infections bactériennes, virales ou parasitaires, comme cela peut être le cas dans un sepsis, ensemble inflammatoire aigu consécutif et/ou associé à une septicémie. La forme sévère affecte en France plus de 50000 personnes par an, pour une mortalité dépassant les 20000 décès annuels (Institut de Veille Sanitaire). Le sepsis est défini comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique résultant d'une infection (bactérienne, virale, fongique, ou parasitaire). L'augmentation des complications peut mener au sepsis sévère, choc septique, voire à la défaillance multiviscérale, résultant souvent au décès. Le sepsis provoque une réponse complexe impliquant de nombreux types cellulaires et médiateurs biologiques [340]. Plusieurs arguments sont en faveur d'une activation massive des plaquettes et des neutrophiles dans le sepsis, et que ces cellules contribuent ensemble à la réponse hyper-inflammatoire [214],[321], [341], [342].

Les causes de sepsis sont multiples, indépendamment de la source microbienne, un patient septicémique a, dans son sang périphérique, des neutrophiles activés qui vont préférentiellement aller se loger dans les capillaires des poumons et dans les sinusoides du foie provoquant des dysfonctionnements, voire des défaillances de ces deux organes [340]. Des études physiopathologiques montrent que le LPS, en activant les neutrophiles, peut provoquer une capture des neutrophiles dans les poumons. Ce pourrait être soit un mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire des pathogènes qui séquestrent les neutrophiles loin des sites d'infection, soit un mécanisme de défense actif des neutrophiles qui migreraient dans les poumons et le foie pour coordonner la réponse de l'hôte [214].

Tout comme les neutrophiles, les plaquettes, lors de thrombocytopenie, migrent aussi dans les poumons et le foie [308],[320]. Les patients atteints de sepsis ont des signes d'activation plaquettaire (augmentation de la quantité de thrombospondine et de CD41 membranaire) et d'adhésion aux neutrophiles et à l'endothélium exacerbés [341]. Il a été montré que les plaquettes exposées au LPS (*E. coli*) se fixent avec une plus grande avidité aux neutrophiles immobilisés [342]. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les concentrations de LPS utilisées dans certaines études ne sont pas toujours comparables à celles pouvant être

retrouvées dans un sepsis. En effet, les concentrations de LPS habituellement observées dans les sérums (ou plasma) des patients atteints de sepsis varient entre 1 à 5µg/ml, ce qui explique le choix de notre gamme de concentration de LPS utilisée dans nos études (3µg/ml), alors que, par exemple, la concentration de LPS utilisée dans l'étude de Shashkin *et al.* est de 100ng/ml [323],[342].

Un mécanisme physiopathologique du sepsis a été décrit récemment par l'équipe de Kubes au Canada, montrant une augmentation des interactions plaquettes-neutrophiles dans des sinusoides murins, après ajout de LPS, ce qui augmente la capture des bactéries [342]. Ils montrent, *in vivo* dans des souris et *in vitro*, que la fixation des plaquettes aux neutrophiles semble dépendante de l'état d'activation des plaquettes après engagement du TLR4 par le LPS [342]. Cette fixation plaquettes-neutrophiles est intéressante puisqu'en plus de libérer le contenu de leurs granules, les neutrophiles libèrent une partie de leur ADN sous forme de toile, ce qui contribue à la capture des bactéries. Il en résulte des structures nommées NET, pour Neutrophil Extracellular Traps, qui ont été décrites originalement par Brinkmann *et al.* en 2004 [343].

Le plasma provenant de patients septiques, mis en co-culture avec des plaquettes provenant de donneurs sains, peut induire *in vitro* la formation d'interactions plaquettes-neutrophiles, dépendantes du TLR4, entraînant la formation de NET [342]. Comparé avec le LPS *E. coli* seul, la formation de NET est grandement augmentée lorsque ce sont des plaquettes activées par le LPS qui sont fixées aux neutrophiles. Ce mécanisme arrive de manière spontanée au cours de l'infection et ne semble pas provoquer l'apoptose des neutrophiles [342].

Des complexes circulants plaquettes-neutrophiles ont été identifiés dans le sang de patients septicémiques et représentent une partie des neutrophiles activés qui ont une capacité supérieure d'adhésion, de phagocytose et de production de superoxyde [344]. La fixation des plaquettes aux neutrophiles circulants se fait via le couple CD62P/CD162. Le CD162 est notamment retrouvé sur les neutrophiles mais aussi sur d'autres leucocytes [94]. Les plaquettes activées ayant adhéré à la paroi vasculaire, sont connues pour « capter » les neutrophiles de la circulation et les faire « rouler » le long des vaisseaux en partie grâce au couple CD62P/CD162 et aux intégrines. Mais, dans le cas des NET, la fixation des plaquettes aux neutrophiles immobilisés est un processus totalement différent. En effet, et comme nous venons de le confirmer, le CD62P membranaire plaquettaire n'est pas surexprimé après

stimulation au LPS d'*E. coli* et donc il n'est pas surprenant que cette fixation soit indépendante du CD62P [214]. Cependant, ces études sont peu nombreuses et restent confinées à l'utilisation du seul LPS d'*E. coli*, lisse, et donc activateur potentiel d'une seule voie de signalisation. Aussi, une perspective intéressante dans le cadre de nos travaux sur l'interaction entre les LPS et les plaquettes est de comprendre ces relations entre les plaquettes et les leucocytes dans le cadre de sepsis. Étant donné que le LPS de *S. minnesota* provoque une activation des PBMC par les plaquettes beaucoup plus forte que le LPS *E. coli*, il semble donc intéressant de comprendre comment les plaquettes répondent suivant la souche bactérienne (ou la structure biochimique du LPS) impliquée dans le cadre du sepsis. Les plaquettes exprimant les TLR2 et 4 avec un rôle fonctionnel défini, le LPS n'est pas le seul ligand potentiellement activateur des plaquettes lors d'un sepsis. Des études d'interaction entre des plaquettes et des pathogènes entiers (et non pas des composants de type LPS, Pam3CSK4, Pam2CSK4) sont donc à envisager afin d'approfondir nos études. Enfin, les nouveaux challenges sur l'étude plaquettaire, afin d'aller plus loin dans la compréhension de ces réponses à des stimuli infectieux, sont d'étudier le signalosome plaquettaire mais aussi le but et le devenir des facteurs de transcription au sein de ces cellules anucléées.

Annexes

I) Participation aux activités de recherche du laboratoire

Human platelets use membrane expressed TLR2 molecules to secrete a panel of cytokines in a NF- κ B/MyD88-dependent mechanism.

Pauline Damien¹, Julien Berthet^{1,2}, Hind Hamzeh-Cognasse¹, Sandrine Lafarge¹, Bruno Pozzetto¹, Olivier Garraud^{1,2} and Fabrice Cognasse^{1,2}

¹ GIMAP-EA3064, Université de Saint-Etienne – Membre de l'Université de Lyon, Faculté de Médecine, Saint-Etienne, France ; ² EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France

En révision

Abstract

We investigated the release of soluble products upon selective TLR2 surface engagement in normal human platelets. Although of questionable importance in anucleate platelets, in nucleated cells, engagement of extracellular ligands by TLR2 activates signaling through NF- κ B p65 and MyD88. Using ELISAs specific to signaling and secretory proteins we found that engagement of TLR2 with Pam3CSK4 significantly increased the level of sCD62p, RANTES, and sCD40L. The production of each of these molecules was significantly attenuated, however, when platelets were pre-incubated for 30 minutes at room temperature with an anti-TLR2 MoAb indicating that secretion of cytokines and related platelet products was a specific consequence of TLR2 stimulation. Modulation of soluble factors released from platelets was observed if platelets were pre-treated with NF- κ B p65 inhibitors prior to engagement of platelet TLR2 with Pam3CSK4 or thrombin receptor activating peptide. Our observations support the concept that, in addition to its reported role in platelet aggregation, NF- κ B is a central player in platelet inflammatory functions. We believe that it is now appropriate for therapeutic research to focus on TLR-dependent transcription factors such as NF- κ B inhibitory drugs.

Pathogen sensing, subsequent signaling, and signalosome in human platelets

Olivier Garraud¹, Julien Berthet^{1,2}, Hind Hamzeh-Cognasse², Fabrice Cognasse^{1,2}

¹ EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France ; ² GIMAP-EA3064, Université de Saint-Etienne – Membre de l'Université de Lyon, Faculté de Médecine, Saint-Etienne, France

Brief Review commissioned by "Thrombosis & Haemostasis" (Dr R Phipps, Ed).

Revue publiée dans Thrombosis Research [345]



Contents lists available at ScienceDirect

Thrombosis Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/thromres

Review Article

Pathogen sensing, subsequent signalling, and signalosome in human platelets

Olivier Garraud*, Julien Berthet, Hind Hamzeh-Cognasse, Fabrice Cognasse

Etablissement Français du Sang Auvergne-Loire & EA 3064, Faculty of Medicine, University of Saint-Etienne, a Member of the University of Lyon, France
25 Boulevard Pasteur, 42023 Saint-Etienne cedex 02, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2010

Received in revised form 15 October 2010

Accepted 17 October 2010

Available online xxxxx

ABSTRACT

Beyond haemostasis, platelets exert a potent role in innate immunity and particularly in its inflammatory arm. The extent of this action remains however debatable, despite clear – and old – evidence of a link between platelets and infection. Platelets can sense infectious pathogens by pathogen recognition receptors and they can even discriminate between various types of infectious signatures. In reply, they can shape their capacity to respond by activating a signalosome and by producing different profiles of pro-inflammatory cytokines and related products. The links between pathogen sensing, signalosome activation and protein production, and their finely tuned regulation are still under investigation since platelets lack a nucleus and thus, canonical molecular biology and genomics apparatus.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

Introduction	0
Platelets shape their surfaces and cytosol content in response to stimuli and secrete hemostatic and inflammatory products	0
Platelets express machinery permitting mRNA transcription	0
Platelets display molecules that sense nonself infectious danger	0
The link between pathogen sensing and secretory activity in platelets: the signalosome	0
Regulated production of inflammatory proteins after surface sensor engagement	0
Platelets and innate immunity directed at microbial infection	0
Platelets and inflammatory pathologies	0
Concluding remarks	0
Conflict of interest statement	0
References	0

Introduction

The field of innate immunity has undergone considerable progress over the past decade, largely due to the identification of pathways and mechanisms of innate immunity recognition and innate control of adaptive immunity and recognition of the physiological and therapeutic functions of cytokines/chemokines and their receptors.

Several families of pattern recognition receptors (PRRs) have been identified, as have Toll-like receptor (TLR) family members; these receptor families have been implicated in the recognition of pathogens—principally microbial pathogens—and the activation of different arms of innate and adaptive immunity [1,2].

Following initial microbial sensing by innate immune cells—which use externally deployed PRRs on sensing cells—internal sensors are

activated to recognize either retroviruses or modified self-proteins, leading to a theory that is referred to as “guard proteins.” The key sensors of this group are NLR family-pyrin domain containing (NLRP) inflammasome molecules, such as NLRP3 [3,4].

Recent discoveries have broadened the basic concept of immune cells and have implicated certain other cells as important mediators of immunity, such as platelets [5–7]. One of the oldest observations with regard to defence responses toward infections has been the clear link between primary haemostasis (and platelet count) and sepsis [8–10]. However, the mechanisms through which platelets react when they face an infectious agent or an inflammatory situation in the intravascular system has been poorly described, until recently [11]. Due to the abundance of acute phase inflammatory mediators, such as histamine and serotonin in platelets, as well as platelet surface expression of Fc receptors for various isotypes, platelets have been proposed to mediate allergy and inflammation [12–14].

Because platelets are non-nucleated cellular fragments of megakaryocytes (MKs), their capacity to secrete products differentially and

* Corresponding author. Tel.: +33 477 814 255.
E-mail address: olivier.garraud@efs.sante.fr (O. Garraud).

their *de novo* production of mediators has only recently been considered. Meanwhile, it has become obvious that platelets sense dangerous situations and release serotonin and other mediators of inflammation when binding molecules that trigger signals from the surface to the cytosol [15].

Platelets shape their surfaces and cytosol content in response to stimuli and secrete hemostatic and inflammatory products

Ex vivo-stored platelets undergo surface changes and cytosol secretory activity; for example, surface concentration of GPIIb-IIIa and GMP-140 increases, which is followed by shedding of platelet membrane microparticles [16]. After activation on altered vascular endothelium or (*in vitro*) by an agonist, such as thrombin, cytosol α -granules fuse with the plasma membrane; platelets then release their cargo and increase their surface area considerably [17]. The mechanisms that control this fusion have begun to be elucidated at the molecular level, with the identification of control molecules, such as SNARE and accessory proteins [17].

Although storage of platelets over time is not physiological, it is vital in order to store platelet components (PCs) for transfusion; in general, PCs are kept for a maximum of 5 (in exceptions, 7) days after collection, under specific conditions. During this time, platelets release many bioactive factors with a noticeable release of cytokines and chemokines—and related products—which exert immunomodulatory activities and target circulating immune cells in the recipient [18–21]. The levels of secreted cytokines and related molecules plateau on Day 3 and persist [18,22–24].

The most well-characterised products released from stored platelets are sCD40L (platelets have been ascribed to purvey 95% of this mediator in plasma [25]), RANTES, PF4, PDGF-AB, and sCD62p [22,26–29]. These mediators—which are sometimes undesired companions of the intended haemostatic factors—have been hypothesized to regulate minor and major transfusion reactions [6,30–32].

Platelets express machinery permitting mRNA transcription

A group at the University of Utah, Salt Lake City, recently observed functional pre-mRNA in platelets, which are characteristically non-nucleated cell fragments that are devoid of organized nucleic acids (apart from mitochondrial DNA) [15,33,34]. Such pre-mRNA originates from the MK nucleus—maintained and stabilized in the platelet cytosol through an as-yet unknown mechanism. This group discovered components of a spliceosome and associated proteins (UAF65 and SF2/ASF) in MKs, proplatelets, and mature platelets, leading them to conclude that platelets can splice pre-mRNA [15,33,34].

They showed further evidence that translation of IL-1 β and tissue factor is repressed in quiescent platelets until cell activation by an agonist; mRNA splicing by a functional spliceosome is indeed signal-dependent after recognition of “outside-in” signalling [35,36]. These findings have been confirmed by a group at the University of British Columbia, Vancouver, which observed high protein secretion by platelets (i.e., thrombin, collagen, actin, albumin, Bcl-3, fibrinogen, GPIIb/IIIa, TF, and vWF [37,38]).

Platelets display molecules that sense nonself infectious danger

Because platelets can decipher between external signals to exert appropriate haemostatic functions and form and release preformed, stored mediators, several groups, including ours, were prompted to study external signalling by pathogens with regard to the nonself infectious danger theory [39]. We observed the presence of certain TLRs on human platelets [40,41], which have now been shown to express TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-6, TLR-8, and TLR-9 [40,42] and upregulate TLR-2 and TLR-9 following activation [40].

The role of platelet TLRs, however, remains unclear. There have been elegant mouse studies that have suggested that engagement of TLR-4 by its “natural” ligand, Gram-negative bacterial LPS, stimulates α IIb β 3-mediated binding of platelets to fibrinogen, in the absence of P-selectin expression [7,43] and that LPS binding to TLR-4 causes thrombocytopenia and, in the presence of anti-platelet antibodies, decreases TNF α production [44,45]. Further, platelet-bound LPS, presumably via TLR-4, synergizes with anti-platelet antibodies, thereby enhancing Fc receptor-mediated phagocytosis [44].

Other studies have dissected the mechanisms of LPS/TLR4-mediated signalling in mouse and human platelets [43–51] and examined whether there is a functional relationship between LPS/TLR4 and primary haemostasis to better understand the observations that have been made during bacterial invasion and sepsis [8,46,50].

Further studies have focused on TLR2 (and its companion TLR1 or TLR6) engagement with its “natural” ligands, glycans and lipoproteins; mimicked experimentally by PAM2CSK4 and PAM3CSK4; we recently observed that PAM3CSK4/TLR2 engagement on human platelets is fully functional and is followed by phosphorylation of adaptor proteins and cytokine secretion [52–54]. Collectively, these studies implicate platelets as important mediators in TLR sensing-related vascular inflammation and their involvement in cardiovascular disease [51–53,55].

The link between pathogen sensing and secretory activity in platelets: the signalosome

The capacity of platelets to sense non-self infectious danger (using TLRs), provided that they do not have nuclei or perform DNA synthesis to sense with regard to protein production, remains an unresolved phenomenon; however, platelets have a tremendous capacity of secreting haemostatic and inflammatory proteins that might exceed the inherited cargo of such mediators.

Thus, several teams have examined whether platelets have a partial signalosome. Zhang et al. have described that TLR4:MD2 and MyD88 accessory and adaptor proteins, respectively, are present and functional after agonistic engagement [50]; this result was confirmed simultaneously by our team [56]. Numerous cytosolic proteins that signal are also upregulated on platelet activation (MyD88, I κ B- α , aNf κ B p65, TRIF, TBK-1, IRAK-1, JNKs, MAPK, TRAF3, TRAF6, IRF-3, and IKK-1 [56]). Proteins that are downstream of MyD88, which signals for the majority of canonical cytokines/chemokines, and downstream of TRIF, which signals for type I interferons, have been characterized as well; all of these proteins result in the phosphorylation of the translocator protein NF κ B [57,58].

Further, platelets can endocytose; in addition to the TLR4 pathway, platelets can bind soluble CD14 from the plasma and activate the MyD88 and TRIF pathways. These phenomena are evidence that platelets possess the machinery to signal through not only the canonical TLR (-2, -4, and possibly -1 and -6) pathways but also accessory pathways (via bound CD14 or bound Ig on Fc γ , α , or ϵ receptors).

Regulated production of inflammatory proteins after surface sensor engagement

Platelet factors, first described to be essential in primary haemostasis, originate from three principal sources—they: are inherited from the MK; come from the plasma environment and absorbed at the surface or internalized; and are synthesized *de novo*. The level of haemostatic factors that are provided locally by the platelet has long been shown to depend on the stimulus that is received, suggesting controlled regulation of platelet protein secretion [59,60].

The regulation of haemostatic factors is similar for other factors, especially proinflammatory molecules that, for example, accumulate during platelet storage *ex vivo* or extrude from the platelets to bind a

relevant membrane receptor, in a likely autocrine activation loop, or to be released in the supernatant. Dozens of inflammatory molecules (such as by histamine and serotonin) and proinflammatory cytokines/chemokines (such as RANTES, TNF α , sCD40L) have been reported, as have dozens of membrane receptors of cytokines/chemokines (such as CD40, CXCR4, IL-8 receptor, substance P receptors, and TRAIL).

We recently observed that cytokine/chemokine production in platelets depends on the nature of the agonistic stimulus that is received through the TLR/MyD88/NF- κ B pathway [50,56] and that the platelet differentially senses the ligands that target TLR2 and not TLR4, and vice versa. We also noted that at least two TLR4 ligands differ with regard to molecular stretching, such as the so-called "smooth" vs "rough" types of LPS, to which platelets respond *in vitro* by producing different patterns of inflammatory products and reciprocally modulating the levels of phosphorylated cytosolic signaling molecules [56]. These data suggest that platelets have certain functions in local environments where they participate in sensing and counteracting bacterial (and possibly viral [14,61,62]) pathogens [7,15].

Platelets and innate immunity directed at microbial infection

It has been observed for years that bacterial species cause platelet aggregation through several mechanisms. For example, *Staphylococcus aureus* (and other bacteria) activate platelets through mechanisms that involve, for example, IgG and its associated platelet receptor Fc γ RIIA; fibrinogen and its receptor α IIb β 3; vWF and its receptor GPIb/IX/V; and complement. Other bacteria activate platelets using similar strategies [63].

Further, activated platelets can secrete antimicrobial peptides, such as thymosin- α 4, PBP, RANTES, and PF-4, which have been reported to be effective against *E. coli* and *S. aureus* *in vitro* [64]. The thrombin-induced platelet factors PF-4, CTAP-3, RANTES, and fibrinopeptide B have microbicidal activity against bacteria and fungi [65]. Finally, platelet α -granules contain thrombocidins, which are bactericidal against several organisms, including *E. coli* and *S. aureus*, and are fungicidal against *Cryptococcus neoformans* [5].

Platelets and inflammatory pathologies

Platelets are involved in the pathophysiology of sepsis, as suggested by the frequent occurrence of thrombocytopenia in sepsis [66]. This thrombocytopenia is likely related to platelet consumption due to the ongoing generation of thrombin [67] or to the phagocytosis of IgG-opsonized platelets [44]. Further, platelets can be activated during sepsis, directly by endotoxins; by coagulation proteases, such as thrombin; or by proinflammatory cytokines [10].

Indeed, when activated, platelets secrete considerable amounts of proinflammatory cytokines, such as soluble CD40 ligand, which is implicated in type 1 diabetes [68] and atherosclerosis [69,70]; and a platelet-associated factor, myeloid-related protein 8/14, in which appears to regulate thrombus formation in cardiovascular pathology [71]. Much evidence supports a role for platelets in inflammatory bowel disease (IBD) [72-74]; platelets express activation markers, and the platelet products β -TG, PF4, and sCD40L become considerably elevated [73]. Moreover, platelet recruitment to and translocation through the inflammatory intestinal mucosa has been observed *in vitro* [75].

Concluding remarks

Platelets intervene in innate immunity in various ways: through their haemostatic molecules (known to affect this branch of immunity similarly to the complement system); through their robust expression of cytokines/chemokines (and receptors) taking place in the process of inflammation; and through the production of antimicrobial (microbicidal) peptides.

Like other innate immune cells, platelets can also cause side effects, best exemplified by excess platelet consumption during generalized infections and by pathological inflammation (sometimes encountered after CP transfusion, although the donor and host factors that mediate it are unknown). Also, like other innate immune cells, platelets can engulf microbes (viruses and bacteria), but because they can not destroy them, it is unknown whether this function is detrimental (if platelets cargo such microbes to tissues and organs) or beneficial to the host (if platelets are themselves sensed by macrophages as dangerous and are subsequently phagocytosed).

Further, similar to what has been described regarding other innate immune cells, do platelets participate in physiological inflammation and engage the body in a dialogue to inform it of friendly or foe-like events in the environment? Many questions remain concerning the roles and functions of platelets, particularly over the missing steps between NF- κ B phosphorylation, without target DNA, and transcription.

Conflict of interest statement

No conflict of interest is declared by the authors.

References

- [1] Imler JL, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol* 2001;11:304-11.
- [2] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
- [3] Erndt C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol* 2010;87:989-99.
- [4] Bauer S, Muller T, Hamm S. Pattern recognition by Toll-like receptors. *Adv Exp Med Biol* 2009;653:15-34.
- [5] von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007;100:27-40.
- [6] Blumberg N, Spinelli SL, Francis CW, et al. The platelet as an immune cell-CD40 ligand and transfusion immunomodulation. *Immunol Res* 2009.
- [7] O. Garraud, F. Cognasse. Platelet Toll-Like Receptor Expression: The Link Between "Danger" Ligands and Inflammation. *Inflammation & Allergy - Drug Targets* 2010 June 3 [Electronic publication ahead of print].
- [8] Clark SR, Ma AC, Tavernier SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007;13:463-9.
- [9] Levi M. Platelets in sepsis. *Hematology* 2005;10(Suppl 1):129-31.
- [10] Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL, et al. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004;2:2096-102.
- [11] Clauzer S, Cramer-Borde E. Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:213-23.
- [12] Qian K, Xie F, Gibson AW, et al. Functional expression of IgA receptor Fc α 1b β RI on human platelets. *J Leukoc Biol* 2008;84:1492-500.
- [13] Joseph M, Gounni AS, Kusnierz JP, et al. Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *Eur J Immunol* 1997;27:2212-8.
- [14] Clemenson KJ. Platelets and pathogens. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:495-8.
- [15] Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol* 2004;25:489-95.
- [16] George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355:1531-9.
- [17] Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1152-60.
- [18] Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, et al. Donor platelets stored for at least 3 days can elicit activation marker expression by the recipient's blood mononuclear cells: an *in vitro* study. *Transfusion* 2009;49:91-8.
- [19] Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 2005;96:612-6.
- [20] Diacovo TG, Catalina MD, Siegelman MH, et al. Circulating activated platelets reconstitute lymphocyte homing and immunity in L-selectin-deficient mice. *J Exp Med* 1998;187:197-204.
- [21] Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, et al. Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins. *Exp Hematol* 2007;35:1376-87.
- [22] Cognasse F, Boussoulade F, Chavarin P, et al. Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage. *Transfusion* 2006;46:1184-9.
- [23] Cognasse F, Osselaer JC, Payrat JM, et al. Release of immune modulation factors from platelet concentrates during storage after photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion* 2008;48:809-13.
- [24] Cognasse F, Payrat JM, Corash L, et al. Platelet components associated with acute transfusion reactions: the role of platelet-derived soluble CD40 ligand. *Blood* 2008;112:4779-80.
- [25] Phipps RP, Kaufman J, Blumberg N. Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet* 2001;357:2023-4.

Please cite this article as: Garraud O, et al. Pathogen sensing, subsequent signalling, and signalosome in human platelets, *Thromb Res* (2010), doi:10.1016/j.thromres.2010.10.015

- [26] Boehlen F, Cirmetson KJ. Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice? *Transfus Med* 2001;11:403–17.
- [27] Shattwell A, Falke C, Cullissoon H. Storage of platelets in additive solutions: the effects of magnesium and potassium on the release of RANTES, beta-thromboglobulin, platelet factor 4 and interleukin-7, during storage. *Vox Sang* 2003;85:206–12.
- [28] El Gohi N, Issertial O, Rosa JP, et al. Evidence for a granule targeting sequence within platelet factor 4. *J Biol Chem* 2005;280:30329–35.
- [29] Blumberg N, Gettings KF, Turner C, et al. An association of soluble CD40 ligand (CD154) with adverse reactions to platelet transfusions. *Transfusion* 2006;46:1813–21.
- [30] Sakagawa H, Miyazaki T, Fujihara M, et al. Generation of inflammatory cytokines and chemokines from peripheral blood mononuclear cells by HLA Class II antibody-containing plasma unit that was associated with severe nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion* 2007;47:154–61.
- [31] Heddele NM. Pathophysiology of febrile nonhemolytic transfusion reactions. *Curr Opin Hematol* 1999;5:420–6.
- [32] Heddele NM, Klama L, Singer J, et al. The role of the plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. *N Engl J Med* 1994;331:625–8.
- [33] Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med* 2006;203:2433–40.
- [34] Denis MM, Tolley ND, Bunting M, et al. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 2005;122:379–91.
- [35] Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004;104:1606–15.
- [36] Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, et al. The platelet-activating factor signalling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 2002;30:S294–301.
- [37] Schubert P, Devine DV. De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. *Vox Sang* 2010.
- [38] Schubert P, Devine DV. Proteomics meets blood banking: identification of protein targets for the improvement of platelet quality. *J Proteomics* 2010;73:436–44.
- [39] Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001;13:114–9.
- [40] Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, et al. Evidence of Toll Like Receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* 2005;83:196–8.
- [41] Cognasse F, Sempke JW, Garraud O. Platelets as Potential Immunomodulators: Is There a Role for Platelet Toll-Like Receptors? *Curr Immunol Rev* 2007;3:109–15.
- [42] Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb Res* 2004;113:379–85.
- [43] Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, et al. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br J Haematol* 2008;141:84–91.
- [44] Sempke JW, Aslam R, Kim M, et al. Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood* 2007;109:4803–5.
- [45] Aslam R, Speck ER, Kim M, et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood* 2006;107:637–41.
- [46] Andonegui G, Kerfoot SM, McNaghy K, et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 2005;106:2417–23.
- [47] Stahl AL, Svensson M, Morgelin M, et al. Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets via TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2006;108:167–76.
- [48] Jayachandran M, Brunn GJ, Karnicki K, et al. In vivo effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. *J Appl Physiol* 2007;102:429–33.
- [49] Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, et al. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol* 2008;181:3495–502.
- [50] Zhang C, Han J, Welch EJ, et al. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol* 2009;182:7997–8004.
- [51] Hashimoto K, Jayachandran M, Owen WG, et al. Aggregation and microparticle production through toll-like receptor 4 activation in platelets from recently menopausal women. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;54:57–62.
- [52] Rex S, Beaulieu LM, Perlman DH, et al. Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release. *Thromb Haemost* 2009;102:97–110.
- [53] Blair P, Rex S, Vitseva O, et al. Stimulation of Toll-Like Receptor 2 in Human Platelets Induces a Thromboinflammatory Response Through Activation of Phosphoinositide 3-Kinase. *Circ Res* 2008;104:346–54.
- [54] Damas JK, Jensenius M, Ueland T, et al. Increased levels of soluble CD40L in African tick bite fever: possible involvement of TLRs in the pathogenic interaction between *Rickettsia africae*, endothelial cells, and platelets. *J Immunol* 2006;177:2699–706.
- [55] Lefebvre JS, Marleau S, Milot V, et al. Toll-like receptor ligands induce polymorphonuclear leukocyte migration: key roles for leukotriene B4 and platelet-activating factor. *FASEB J* 2009.
- [56] Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, et al. Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways. *Br J Haematol* 2010.
- [57] Liu F, Morris S, Epps J, et al. Demonstration of an activation regulated NF-kappaB-kappaB complex in human platelets. *Thromb Res* 2002;106:199–203.
- [58] Spinelli SL, Casey AE, Pollock SJ, et al. Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:591–8.
- [59] Tucker KL, Sage T, Stevens JM, et al. A dual role for integrin-linked kinase in platelets: regulating integrin function and [alpha]-granule secretion. *Blood* 2008;112:4523–31.
- [60] Dole VS, Bergmeier W, Paton IS, et al. PSGL-1 regulates platelet P-selectin-mediated endothelial activation and shedding of P-selectin from activated platelets. *Thromb Haemost* 2007;98:806–12.
- [61] Yousserian T, Drouin A, Masse JM, et al. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* 2002;99:4021–9.
- [62] Klinger MH, Jellmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22:913–22.
- [63] Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:445–57.
- [64] Yeaman MR, Bayer AS. Antimicrobial peptides versus invasive infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;306:111–52.
- [65] Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 2002;70:6524–31.
- [66] Vincent JL, Yaguchi A, Pradier O. Platelet function in sepsis. *Crit Care Med* 2002;30:5313–7.
- [67] Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999;341:586–92.
- [68] Harding SA, Sommerfield AJ, Sarma J, et al. Increased CD40 ligand and platelet-monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2004;176:321–5.
- [69] Garlicks CD, Eskafi S, Raaz D, et al. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart* 2001;86:649–55.
- [70] Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003;348:1104–11.
- [71] Hotala AM, Pickard MD, Pradhan AD, et al. Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. *Circulation* 2006;113:2278–84.
- [72] Danese S, Mutte Cd Cde L, Focchi C. Platelets in inflammatory bowel disease: clinical, pathogenic, and therapeutic implications. *Am J Gastroenterol* 2004;99:938–45.
- [73] Danese S, Katz JA, Saibeni S, et al. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients. *Gut* 2003;52:1435–41.
- [74] Yuksef O, Helvacı K, Basar O, et al. An overlooked indicator of disease activity in ulcerative colitis: mean platelet volume. *Platelets* 2009;20:277–81.
- [75] Weissmuller T, Campbell EL, Rosenberger P, et al. PMPs facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis via epithelial cell-expressed ecto-NTPases. *J Clin Invest* 2008;118:3682–92.

II) Communications affichées et orales

Lipopolysaccharide bacteria can modulate the release of human platelet cytokines by Toll-Like Receptor 4

J. Berthet, F. Cognasse, B. Pozzetto and O. Garraud.

Poster et Communication orale présentés à:

- 11^{ème} Colloque Cytokines du Croisic (Société Française d'Immunologie), Le Croisic 2008

Rôle fonctionnel du TLR4 plaquettaire

J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, O. Garraud, F. Cognasse

Présenté à :

- Journée de l'ED488, Saint-Etienne 2008

Platelet responses to TLR4 stimulation are dependent on lipopolysaccharide bacterial type

J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, O. Garraud, F. Cognasse

Présenté à :

- European Congress of Immunology, Berlin 2009
- Société Française d'Immunologie, Paris 2008
- 1st French-UK Platelet meeting, Toulouse 2009
- Journée de l'IFRESIS, Saint-Etienne 2009

Functionally role of Platelet TLR4

J. Berthet, H. Hamzeh-Cognasse, P. Damien, B. Pozzetto, O. Garraud, F. Cognasse

Présenté à:

- Journée de l'ED488, Saint-Etienne 2009

Differential platelet TLR4 engagement and subsequent mononuclear cells mobilization after LPS exposure

J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, A. McNicol, O. Garraud, F. Cognasse

Présenté à:

- XIth European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology, Beaune 2010
- Société Française d'Immunologie, Marseille 2010
- Journée de l'IFRESIS, Saint-Etienne 2010

III) Curriculum vitae

BERTHET Julien

Né le 20 février 1984 à Bourgoin-Jallieu
Célibataire
Permis B



21 rue Lisfranc
42100 St Etienne
Tel. 0622893177
@ : berthet.julien@yahoo.fr

Doctorant en Immunologie

FORMATIONS

Depuis 2007	Doctorat en immunologie, Université Jean Monnet, St Etienne (Membre de l'université de Lyon)
2009-2010	Diplôme Universitaire d'Ouverture Professionnelle au Bio-industries (DUOP), Institut de Professionnalisation en Biotechnologies (IPROB)
2007	Master Recherche en Biologie Cellulaire et Intégrative, Université Joseph Fourier , Grenoble (Mention Assez Bien)
2005	Licence en Sciences de la Vie, Université Joseph Fourier , Grenoble
2002	Baccalauréat Scientifique ; Lycée E. Cartan , La Tour du Pin (Mention Assez Bien)

EXPÉRIENCE PROFESSIONNELLE

Depuis 2007	Doctorat au Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (EA 3064) à l'UJM de St Etienne, financé par l' Etablissement Français du Sang Auvergne-Loire (EFS) . « Rôle fonctionnel du Toll-Like Receptor 4 exprimé par les plaquettes sanguines en tant que cellules inflammatoires de l'immunité ».
2007	Stage de Master 2 au Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM/UMR 5249) au CEA Grenoble . « Etude du rôle du domaine transmembranaire 6 de la Protéine CFTR sauvage et mutée ($\Delta F508$) ».
2006	Stage de Master 1 à l' Etablissement Français du Sang Rhone-Alpes (EFS) à La Tronche. « Etude de l'influence de La PhotoChimiothérapie Extracorporelle sur des plaquettes issues d'aphérèse de donneurs sains ».

ASSOCIATIF ET LOISIRS

- **Président du réseau national BIOTechno 2009** (www.biotechno.asso.fr)
- Organisateur des journées BIOTechno Rhone-Alpes 2008, 2009 et 2010
- **Membre des BioVision.Nxt.Staff lors du colloque BioVision 2009** (www.biovision.org)

- Coordinateur des BioVision.Nxt 2011, alumni BioVision.Nxt 2011
- Membre actif de l'Association Stéphanoise des JEunes Chercheurs (ASEC) 2007 à 2009 (<http://asec.apinc.org/>)
- **Membre actif de Biodocs-Lyon** (<http://www.biodocslyon.com>), Webmaster 2010, membre du CA 2011.
- Organisateur de la journée du Collège Doctoral de Saint-Etienne 2008
- Membre temporaire du bureau du Collège Doctoral de Saint-Etienne
- Sports collectifs (principalement football)
- Informatique et jeux video
- Musique
- Lecture

COMPÉTENCES

Biochimie :

- Extraction et purification de protéines
- Électrophorèse (SDS-PAGE)

Immunobiologie :

- Western blot
- ELISA
- Immunoprécipitation
- Cytométrie en flux (4 couleurs)

Biologie Moléculaire :

- PCR (classique et real time)
- Mutagenèse dirigée par Splicing by Overlap Extension PCR
- Transformation de bactéries compétentes
- Isolement de plasmides (midi-prep)

Biologie cellulaire :

- Culture de plaquettes sanguines humaines (anucléées)
- Culture de cellules adhérentes ou en suspension
- Transfections cellulaires transitoires ou stables (Méthotrexate)
- Purification de cellules sanguines par Ficoll (monocytes et plaquettes)

Imagerie :

- Microscopie confocale (UV + visible)
- Microscopie électronique à balayage
- Immunofluorescence

Traitement informatique des données :

- Logiciels de traitement d'image (Adobe Photoshop, GIMP)
- Microsoft Office (Word, Excel, Publisher, Powerpoint)
- Logiciel d'analyse de séquences (Vector NTI)
- Logiciel d'analyse de cytométrie en flux (FACSscan)

Management :

- Encadrement et formation de stagiaires et de techniciens
- Gestion de réunions et d'assemblées générales
- Animation de tables rondes et de séances plénières
- Gestion de plusieurs associations françaises
- Respect de contraintes financières et temporelles

Autres :

- Rédaction
- Anglais scientifique
- Création de dossiers et flyers
- Gestion de site internet

PUBLICATIONS ET PRINCIPAUX CONGRÈS

- O. Garraud, J. Berthet, H. Hamzeh-Cognasse, et F. Cognasse, "Pathogen sensing, subsequent signalling, and signalosome in human platelets" **Thrombosis Research**, Nov. 2010
- J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, O. Garraud, et F. Cognasse, "Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways" **British Journal of Haematology**, Juil. 2010
- Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Berthet J, Damien P, Lucht F, Pozzetto B, Garraud O. Altered release of regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein from human, normal platelets: contribution of distinct HIV-1MN gp41 peptides. **AIDS**, 2009 Aug1
- J. Berthet, P. Damien, H Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, A. McNicol, O. Garraud, F. Cognasse. "Differential platelet TLR4 engagement and subsequent mononuclear cells mobilization after LPS exposure" **XIth European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology**, Beaune 2010. *Poster*
- J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, O. Garraud, F. Cognasse. "Platelet responses to TLR4 stimulation are dependent on lipopolysaccharide bacterial type" **European Congress of Immunology**, Berlin 2009. *Poster*
- Berthet J., Hamzeh-Cognasse H., Damien P., Pozzetto B., Garraud O. Cognasse F. Platelet TLR4 response is dependant on LPS structure **Annual Meeting of the French Society for Immunology**, Société Française d'Immunologie, 25 au 27 novembre 2008 Paris (France). *Poster*
- Berthet J, Cognasse F., Pozzetto B., Garraud O. Rôle fonctionnel du TLR4 plaquettaire. **11^{ème} Colloque Cytokines du Croisic**, Société Française d'Immunologie, 5 au 7 mai 2008 Le Croisic (France). *Communication orale et poster*
- Micoud J, De Keukeleire B, Berthet J, Donadio S, Piccarreta F et Benharouga M. Le couple NBD1/NBD2 et la protéine CFTR. **Colloque des jeunes chercheurs sur la Mucoviscidose**, 16 mars 2007 Paris (France). *Poster*

ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT

- **Centre International D'Ostéopathie (CIDO) :**
 - Physiologie digestive (2009-2010)

- **Ecole Doctorale Sciences, Ingénierie, Santé (ED488) :**
 - TLR, Signalisation et nouvelles applications sur les plaquettes sanguines humaines (2010)
 - Participation des plaquettes sanguines aux réponses inflammatoires / étude des cytokines et des récepteurs de l'immunité (2009)

Références bibliographiques

- [1] S. Lindemann, B. Krämer, P. Seizer, et M. Gawaz, "Platelets, inflammation and atherosclerosis," *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 5, p. 203-211, Juil. 2007.
- [2] M. M. Denis et al., "Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets," *Cell*, vol. 122, n° 3, p. 379-391, Aoû. 2005.
- [3] A. Zarbock, R. K. Polanowska-Grabowska, et K. Ley, "Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation," *Blood Reviews*, vol. 21, n° 2, p. 99-111, Mar. 2007.
- [4] J. G. White et M. Krumwiede, "Some contributions of electron microscopy to knowledge of human platelets," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 98, n° 1, p. 69-72, Juil. 2007.
- [5] M. H. Klinger, "Platelets and inflammation," *Anatomy and Embryology*, vol. 196, n° 1, p. 1-11, Juil. 1997.
- [6] R. Medzhitov et C. A. Janeway, "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition," *Cell*, vol. 91, n° 3, p. 295-298, Oct. 1997.
- [7] C. Nathan, "Points of control in inflammation," *Nature*, vol. 420, n° 6917, p. 846-852, Déc. 2002.
- [8] A. S. Weyrich et G. A. Zimmerman, "Platelets: signaling cells in the immune continuum," *Trends in Immunology*, vol. 25, n° 9, p. 489-495, Sep. 2004.
- [9] M. H. F. Klinger et W. Jelkmann, "Role of blood platelets in infection and inflammation," *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, vol. 22, n° 9, p. 913-922, Sep. 2002.
- [10] M. R. Yeaman, "The role of platelets in antimicrobial host defense," *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 25, n° 5, p. 951-968; quiz 969-970, Nov. 1997.
- [11] J. E. Italiano et R. A. Shivdasani, "Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets," *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 1, n° 6, p. 1174-1182, Juin. 2003.
- [12] V. R. Deutsch et A. Tomer, "Megakaryocyte development and platelet production," *British Journal of Haematology*, vol. 134, n° 5, p. 453-466, Sep. 2006.
- [13] K. Dorshkind, "Not a split decision for human hematopoiesis," *Nature Immunology*, vol. 11, n° 7, p. 569-570, Juil. 2010.
- [14] S. L. Nutt, D. Metcalf, A. D'Amico, M. Polli, et L. Wu, "Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 201, n° 2, p. 221-231, Jan. 2005.
- [15] R. A. Briddell, J. E. Brandt, J. E. Straneva, E. F. Srouf, et R. Hoffman, "Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte," *Blood*, vol. 74, n° 1, p. 145-151, Juil. 1989.
- [16] A. Tomer, L. A. Harker, et S. A. Burstein, "Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes," *Blood*, vol. 71, n° 5, p. 1244-1252, Mai. 1988.
- [17] A. Tomer, L. A. Harker, et S. A. Burstein, "Purification of human megakaryocytes by fluorescence-activated cell sorting," *Blood*, vol. 70, n° 6, p. 1735-1742, Déc. 1987.
- [18] J. E. Italiano, P. Lecine, R. A. Shivdasani, et J. H. Hartwig, "Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated

- megakaryocytes,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 147, n° 6, p. 1299-1312, Déc. 1999.
- [19] C. Poujol et al., “Ultrastructural analysis of bone marrow hematopoiesis in mice transgenic for the thymidine kinase gene driven by the alpha I**II**b promoter,” *Blood*, vol. 92, n° 6, p. 2012-2023, Sep. 1998.
- [20] E. S. Choi, J. L. Nichol, M. M. Hokom, A. C. Hornkohl, et P. Hunt, “Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional,” *Blood*, vol. 85, n° 2, p. 402-413, Jan. 1995.
- [21] D. Bluteau et al., “Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 7, p. 227-234, Juil. 2009.
- [22] T. Junt et al., “Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 317, n° 5845, p. 1767-1770, Sep. 2007.
- [23] E. A. Trowbridge, J. F. Martin, et D. N. Slater, “Evidence for a theory of physical fragmentation of megakaryocytes, implying that all platelets are produced in the pulmonary circulation,” *Thrombosis Research*, vol. 28, n° 4, p. 461-475, Nov. 1982.
- [24] J. M. Radley et C. J. Haller, “The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer?,” *Blood*, vol. 60, n° 1, p. 213-219, Juil. 1982.
- [25] H. Schulze et al., “Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis,” *Blood*, vol. 107, n° 10, p. 3868-3875, Mai. 2006.
- [26] S. R. Patel et al., “Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes,” *Blood*, vol. 106, n° 13, p. 4076-4085, Déc. 2005.
- [27] J. L. Richardson, R. A. Shivdasani, C. Boers, J. H. Hartwig, et J. E. Italiano, “Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production,” *Blood*, vol. 106, n° 13, p. 4066-4075, Déc. 2005.
- [28] J. E. Italiano, M. Stewart, et T. M. Roberts, “Localized depolymerization of the major sperm protein cytoskeleton correlates with the forward movement of the cell body in the amoeboid movement of nematode sperm,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 146, n° 5, p. 1087-1096, Sep. 1999.
- [29] S. Massberg et al., “Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, n° 5, p. 1221-1233, Mai. 2006.
- [30] K. Hodohara, N. Fujii, N. Yamamoto, et K. Kaushansky, “Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK),” *Blood*, vol. 95, n° 3, p. 769-775, Fév. 2000.
- [31] J. N. George, “Platelets,” *Lancet*, vol. 355, n° 9214, p. 1531-1539, Avr. 2000.
- [32] M. P. Lambert, L. Rauova, M. Bailey, M. C. Sola-Visner, M. A. Kowalska, et M. Poncz, “Platelet factor 4 is a negative autocrine in vivo regulator of megakaryopoiesis: clinical and therapeutic implications,” *Blood*, vol. 110, n° 4, p. 1153-1160, Aoû. 2007.
- [33] M. K. Larson et S. P. Watson, “A product of their environment: do megakaryocytes rely on extracellular cues for proplatelet formation?,” *Platelets*, vol. 17, n° 7, p. 435-440, Nov. 2006.
- [34] J. Li et D. J. Kuter, “The end is just the beginning: megakaryocyte apoptosis and platelet release,” *International Journal of Hematology*, vol. 74, n° 4, p. 365-374, Déc. 2001.

- [35] S. De Botton et al., "Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes," *Blood*, vol. 100, n°. 4, p. 1310-1317, Aoû. 2002.
- [36] H. Schwertz et al., "Anucleate platelets generate progeny," *Blood*, Jan. 2010.
- [37] A. J. Webber et B. G. Firkin, "Two Populations of Platelets," *Nature*, vol. 205, n°. 4978, p. 1332-1332, 1965.
- [38] O. Behnke, "Blood platelet heterogeneity: a functional hierarchy in the platelet population," *British Journal of Haematology*, vol. 91, n°. 4, p. 991-999, Déc. 1995.
- [39] J. M. Pasquet, J. Dachary-Prigent, et A. T. Nurden, "Microvesicle release is associated with extensive protein tyrosine dephosphorylation in platelets stimulated by A23187 or a mixture of thrombin and collagen," *The Biochemical Journal*, vol. 333, p. 591-599, Aoû. 1998.
- [40] D. Patel, H. Väänänen, M. Jirousková, T. Hoffmann, C. Bodian, et B. S. Coller, "Dynamics of GPIIb/IIIa-mediated platelet-platelet interactions in platelet adhesion/thrombus formation on collagen in vitro as revealed by videomicroscopy," *Blood*, vol. 101, n°. 3, p. 929-936, Fév. 2003.
- [41] L. Alberio, O. Safa, K. J. Clemetson, C. T. Esmon, et G. L. Dale, "Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin," *Blood*, vol. 95, n°. 5, p. 1694-1702, Mar. 2000.
- [42] G. L. Dale et al., "Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface," *Nature*, vol. 415, n°. 6868, p. 175-179, Jan. 2002.
- [43] G. L. Dale, "Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response," *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 3, n°. 10, p. 2185-2192, Oct. 2005.
- [44] S. Kulkarni et S. P. Jackson, "Platelet factor XIII and calpain negatively regulate integrin alphaIIb beta3 adhesive function and thrombus growth," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n°. 29, p. 30697-30706, Juil. 2004.
- [45] S. Bodin, H. Tronchère, et B. Payrastre, "Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1610, n°. 2, p. 247-257, Mar. 2003.
- [46] T. Harder, P. Scheiffele, P. Verkade, et K. Simons, "Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components," *The Journal of Cell Biology*, vol. 141, n°. 4, p. 929-942, Mai. 1998.
- [47] D. Locke, H. Chen, Y. Liu, C. Liu, et M. L. Kahn, "Lipid rafts orchestrate signaling by the platelet receptor glycoprotein VI," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n°. 21, p. 18801-18809, Mai. 2002.
- [48] C. N. Shrimpton, G. Borthakur, S. Larrucea, M. A. Cruz, J. Dong, et J. A. López, "Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib-IX-V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 196, n°. 8, p. 1057-1066, Oct. 2002.
- [49] K. Jurk et B. E. Kehrel, "Platelets: physiology and biochemistry," *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 31, n°. 4, p. 381-392, 2005.
- [50] S. Bodin et al., "Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in

- activated human platelets,” *Journal of Cell Science*, vol. 118, n° 4, p. 759-769, Fév. 2005.
- [51] K. Gousset et al., “Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 190, n° 1, p. 117-128, Jan. 2002.
- [52] J. H. Hartwig, “The platelet: form and function,” *Seminars in Hematology*, vol. 43, n° 1, p. S94-100, Jan. 2006.
- [53] K. Freson et al., “The TUBB1 Q43P functional polymorphism reduces the risk of cardiovascular disease in men by modulating platelet function and structure,” *Blood*, vol. 106, n° 7, p. 2356-2362, Oct. 2005.
- [54] D. Cerecedo, B. Cisneros, R. Suárez-Sánchez, E. Hernández-González, et I. Galván, “beta-Dystroglycan modulates the interplay between actin and microtubules in human-adhered platelets,” *British Journal of Haematology*, vol. 141, n° 4, p. 517-528, Mai. 2008.
- [55] S. M. King et G. L. Reed, “Development of platelet secretory granules,” *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 13, n° 4, p. 293-302, Aoû. 2002.
- [56] G. L. Reed, M. L. Fitzgerald, et J. Polgár, “Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes,” *Blood*, vol. 96, n° 10, p. 3334-3342, Nov. 2000.
- [57] P. Harrison et al., “Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 84, n° 4, p. 1320-1324, Oct. 1989.
- [58] J. J. Sixma, A. van den Berg, A. Hasilik, K. von Figura, et H. J. Geuze, “Immuno-electron microscopical demonstration of lysosomes in human blood platelets and megakaryocytes using anti-cathepsin D,” *Blood*, vol. 65, n° 5, p. 1287-1291, Mai. 1985.
- [59] P. E. Stenberg, “Ultrastructural organization of maturing megakaryocytes,” *Progress in Clinical and Biological Research*, vol. 215, p. 373-386, 1986.
- [60] M. E. Bentfeld-Barker et D. F. Bainton, “Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets,” *Blood*, vol. 59, n° 3, p. 472-481, Mar. 1982.
- [61] T. Youssefian, A. Drouin, J. Massé, J. Guichard, et E. M. Cramer, “Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation,” *Blood*, vol. 99, n° 11, p. 4021-4029, Juin. 2002.
- [62] J. Cazenave, P. Ohlmann, D. Cassel, A. Eckly, B. Hechler, et C. Gachet, “Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood,” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 272, p. 13-28, 2004.
- [63] F. Cognasse et al., “Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage,” *Transfusion*, vol. 46, n° 7, p. 1184-1189, Juil. 2006.
- [64] S. Tanaka, T. Hayashi, Y. Tani, et F. Hirayama, “Removal by adsorbent beads of biological response modifiers released from platelets, accumulated during storage, and potentially associated with platelet transfusion reactions,” *Transfusion*, vol. 50, n° 5, p. 1096-1105, Mai. 2010.
- [65] A. Vetlesen, M. R. Mirlashari, F. Ezligini, et J. Kjeldsen-Kragh, “Evaluation of platelet activation and cytokine release during storage of platelet concentrates processed from buffy coats either manually or by the automated OrbiSac system,” *Transfusion*, vol. 47, n° 1, p. 126-132, Jan. 2007.

- [66] L. F. Brass, "Thrombin and platelet activation," *Chest*, vol. 124, n^o. 3, p. 18S-25S, Sep. 2003.
- [67] S. R. Coughlin, "Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology," *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 3, n^o. 8, p. 1800-1814, Aoû. 2005.
- [68] T. K. Vu, D. T. Hung, V. I. Wheaton, et S. R. Coughlin, "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation," *Cell*, vol. 64, n^o. 6, p. 1057-1068, Mar. 1991.
- [69] U. B. Rasmussen et al., "cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization," *FEBS Letters*, vol. 288, n^o. 1, p. 123-128, Aoû. 1991.
- [70] S. R. Coughlin et E. Camerer, "PARTicipation in inflammation," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 111, n^o. 1, p. 25-27, Jan. 2003.
- [71] E. Camerer et al., "Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the egr-1 gene," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n^o. 45, p. 32225-32233, Nov. 1999.
- [72] G.R. Sambrano, E. J. Weiss, Y. W. Zheng, W. Huang, et S. R. Coughlin, "Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis," *Nature*, vol. 413, n^o. 6851, p. 74-78, Sep. 2001.
- [73] W. F. Xu et al., "Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, n^o. 12, p. 6642-6646, Juin. 1998.
- [74] M. L. Kahn et al., "A dual thrombin receptor system for platelet activation," *Nature*, vol. 394, n^o. 6694, p. 690-694, Aoû. 1998.
- [75] S. Murugappan, H. Shankar, S. Bhamidipati, R. T. Dorsam, J. Jin, et S. P. Kunapuli, "Molecular mechanism and functional implications of thrombin-mediated tyrosine phosphorylation of PKCdelta in platelets," *Blood*, vol. 106, n^o. 2, p. 550-557, Jul. 2005.
- [76] M. Holinstat, B. Voss, M. L. Bilodeau, J. N. McLaughlin, J. Cleator, et H. E. Hamm, "PAR4, but not PAR1, signals human platelet aggregation via Ca²⁺ mobilization and synergistic P2Y₁₂ receptor activation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, n^o. 36, p. 26665-26674, Sep. 2006.
- [77] S. Offermanns, "Activation of platelet function through G protein-coupled receptors," *Circulation Research*, vol. 99, n^o. 12, p. 1293-1304, Déc. 2006.
- [78] P. Savi et al., "Role of P2Y₁ purinoceptor in ADP-induced platelet activation," *FEBS Letters*, vol. 422, n^o. 3, p. 291-295, Fév. 1998.
- [79] P. Ohlmann et al., "The human platelet ADP receptor activates Gi₂ proteins," *The Biochemical Journal*, vol. 312, p. 775-779, Déc. 1995.
- [80] C. Léon et al., "Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y₁ receptor-null mice," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 104, n^o. 12, p. 1731-1737, Déc. 1999.
- [81] J. E. Fabre et al., "Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y₁-deficient mice," *Nature Medicine*, vol. 5, n^o. 10, p. 1199-1202, Oct. 1999.

- [82] C. J. Foster et al., "Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 107, n° 12, p. 1591-1598, Juin. 2001.
- [83] P. Andre et al., "P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, n° 3, p. 398-406, Aoû. 2003.
- [84] D. W. Thomas et al., "Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 102, n° 11, p. 1994-2001, Déc. 1998.
- [85] M. Pozgajová, U. J. H. Sachs, L. Hein, et B. Nieswandt, "Reduced thrombus stability in mice lacking the alpha2A-adrenergic receptor," *Blood*, vol. 108, n° 2, p. 510-514, Juil. 2006.
- [86] H. Ma et al., "Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3)," *Circulation*, vol. 104, n° 10, p. 1176-1180, Sep. 2001.
- [87] K. J. Clemetson, J. M. Clemetson, A. E. Proudfoot, C. A. Power, M. Baggiolini, et T. N. Wells, "Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets," *Blood*, vol. 96, n° 13, p. 4046-4054, Déc. 2000.
- [88] J. S. Bennett, B. W. Berger, et P. C. Billings, "The structure and function of platelet integrins," *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 7, p. 200-205, Juil. 2009.
- [89] B. S. Coller et S. J. Shattil, "The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIb beta3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend," *Blood*, vol. 112, n° 8, p. 3011-3025, Oct. 2008.
- [90] S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, et J. S. Brugge, "Adhesive signaling in platelets," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 6, n° 5, p. 695-704, Oct. 1994.
- [91] B. T. Colvin, "Physiology of haemostasis," *Vox Sanguinis*, vol. 87, p. 43-46, Juil. 2004.
- [92] A. J. Marcus et L. B. Safier, "Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis," *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 7, n° 6, p. 516-522, Avr. 1993.
- [93] B. Nieswandt et S. P. Watson, "Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?," *Blood*, vol. 102, n° 2, p. 449-461, Juil. 2003.
- [94] M. Chen et J. Geng, "P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis," *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, vol. 54, n° 2, p. 75-84, Avr. 2006.
- [95] M. T. Santos et al., "Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 87, n° 2, p. 571-580, Fév. 1991.
- [96] A. J. Marcus et al., "Platelet-neutrophil interactions. (12S)-hydroxyeicosatetraen-1,20-dioic acid: a new eicosanoid synthesized by unstimulated neutrophils from (12S)-20-dihydroxyeicosatetraenoic acid," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, n° 5, p. 2223-2229, Fév. 1988.
- [97] P. Siljander et R. Lassila, "Studies of adhesion-dependent platelet activation: distinct roles

- for different participating receptors can be dissociated by proteolysis of collagen,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 19, n°. 12, p. 3033-3043, Déc. 1999.
- [98] T. Nakamura, G. A. Jamieson, M. Okuma, J. Kambayashi, et N. N. Tandon, “Platelet adhesion to native type I collagen fibrils. Role of GPVI in divalent cation-dependent and -independent adhesion and thromboxane A₂ generation,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, n°. 8, p. 4338-4344, Fév. 1998.
- [99] G. G. Levy, D. G. Motto, et D. Ginsburg, “ADAMTS13 turns 3,” *Blood*, vol. 106, n°. 1, p. 11-17, Juil. 2005.
- [100] N. A. Turner, J. L. Moake, et L. V. McIntire, “Blockade of adenosine diphosphate receptors P₂Y(12) and P₂Y(1) is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow,” *Blood*, vol. 98, n°. 12, p. 3340-3345, Déc. 2001.
- [101] K. Jurk et al., “Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor,” *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 17, n°. 11, p. 1490-1492, Aoû. 2003.
- [102] P. S. Frenette et al., “P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 191, n°. 8, p. 1413-1422, Avr. 2000.
- [103] G. M. Romo et al., “The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 190, n°. 6, p. 803-814, Sep. 1999.
- [104] M. C. Berndt, Y. Shen, S. M. Dopheide, E. E. Gardiner, et R. K. Andrews, “The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 86, n°. 1, p. 178-188, Juil. 2001.
- [105] A. Kasirer-Friede, M. R. Cozzi, M. Mazzucato, L. De Marco, Z. M. Ruggeri, et S. J. Shattil, “Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors,” *Blood*, vol. 103, n°. 9, p. 3403-3411, Mai. 2004.
- [106] A. H. Wei, S. M. Schoenwaelder, R. K. Andrews, et S. P. Jackson, “New insights into the haemostatic function of platelets,” *British Journal of Haematology*, vol. 147, n°. 4, p. 415-430, Nov. 2009.
- [107] E. F. Lüscher et S. Weber, “The formation of the haemostatic plug--a special case of platelet aggregation. An experiment and a survey of the literature,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 70, n°. 2, p. 234-237, Aoû. 1993.
- [108] Z. M. Ruggeri, “Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 70, n°. 1, p. 119-123, Juil. 1993.
- [109] H. F. Heijnen, A. E. Schiel, R. Fijnheer, H. J. Geuze, et J. J. Sixma, “Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules,” *Blood*, vol. 94, n°. 11, p. 3791-3799, Déc. 1999.
- [110] R. Voss, E. Morgenstern, W. Waas, et A. Matzdorff, “No increase in CD62P-positive single platelets after acute platelet activation in vivo,” *Thrombosis Research*, vol. 117, n°. 4, p. 393-399, 2006.
- [111] M. R. Cahill, M. G. Macey, J. R. Dawson, et A. C. Newland, “Platelet surface activation antigen expression at baseline and during elective angioplasty in patients with mild to

- moderate coronary artery disease,” *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, vol. 7, n°. 2, p. 165-168, Mar. 1996.
- [112] R. E. Scharf, A. Tomer, U. M. Marzec, P. S. Teirstein, Z. M. Ruggeri, et L. A. Harker, “Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection,” *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology / American Heart Association*, vol. 12, n°. 12, p. 1475-1487, Déc. 1992.
- [113] M. Gawaz et al., “Effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 80, n°. 6, p. 994-1001, Déc. 1998.
- [114] A. D. Michelson, M. R. Barnard, L. A. Krueger, C. R. Valeri, et M. I. Furman, “Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction,” *Circulation*, vol. 104, n°. 13, p. 1533-1537, Sep. 2001.
- [115] F. Cognasse, J. C. Osselaer, et O. Garraud, “[Platelets cytokines and their effects on platelet transfusion],” *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Société Française De Transfusion Sanguine*, vol. 14, n°. 1, p. 69-78, Mai. 2007.
- [116] P. André, L. Nannizzi-Alaimo, S. K. Prasad, et D. R. Phillips, “Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease,” *Circulation*, vol. 106, n°. 8, p. 896-899, Aoû. 2002.
- [117] T. Wagner et al., “Ultrastructural changes and activation differences in platelet concentrates stored in plasma and additive solution,” *Transfusion*, vol. 42, n°. 6, p. 719-727, Juin. 2002.
- [118] B. D. Elzey, D. L. Sprague, et T. L. Ratliff, “The emerging role of platelets in adaptive immunity,” *Cellular Immunology*, vol. 238, n°. 1, p. 1-9, Nov. 2005.
- [119] V. Henn et al., “CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells,” *Nature*, vol. 391, n°. 6667, p. 591-594, Fév. 1998.
- [120] L. Nannizzi-Alaimo, V. L. Alves, et D. R. Phillips, “Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation,” *Circulation*, vol. 107, n°. 8, p. 1123-1128, Mar. 2003.
- [121] A. S. Weyrich, H. Schwertz, L. W. Kraiss, et G. A. Zimmerman, “Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 7, n°. 2, p. 241-246, Fév. 2009.
- [122] T. Maniatis et R. Reed, “An extensive network of coupling among gene expression machines,” *Nature*, vol. 416, n°. 6880, p. 499-506, Avr. 2002.
- [123] Z. Zhou, L. J. Licklider, S. P. Gygi, et R. Reed, “Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome,” *Nature*, vol. 419, n°. 6903, p. 182-185, Sep. 2002.
- [124] S. Lindemann et al., “Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 154, n°. 3, p. 485-490, Aoû. 2001.
- [125] J. Guhaniyogi et G. Brewer, “Regulation of mRNA stability in mammalian cells,” *Gene*, vol. 265, n°. 1, p. 11-23, Mar. 2001.
- [126] M. M. Denis et al., “Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing

- in anucleate platelets,” *Cell*, vol. 122, n° 3, p. 379-391, Aoû. 2005.
- [127] P. Landry, I. Plante, D. L. Ouellet, M. P. Perron, G. Rousseau, et P. Provost, “Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets,” *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 16, n° 9, p. 961-966, Sep. 2009.
- [128] C. M. Hawrylowicz, S. A. Santoro, F. M. Platt, et E. R. Unanue, “Activated platelets express IL-1 activity,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 143, n° 12, p. 4015-4018, Déc. 1989.
- [129] C. M. Hawrylowicz, G. L. Howells, et M. Feldmann, “Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 174, n° 4, p. 785-790, Oct. 1991.
- [130] N. Matter, P. Herrlich, et H. König, “Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68,” *Nature*, vol. 420, n° 6916, p. 691-695, Déc. 2002.
- [131] R. Reed et K. Magni, “A new view of mRNA export: separating the wheat from the chaff,” *Nature Cell Biology*, vol. 3, n° 9, p. E201-204, Sep. 2001.
- [132] W. F. Bahou et D. V. Gnatenko, “Platelet transcriptome: the application of microarray analysis to platelets,” *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 30, n° 4, p. 473-484, Aoû. 2004.
- [133] J. P. McRedmond et al., “Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes,” *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, vol. 3, n° 2, p. 133-144, Fév. 2004.
- [134] P. Schubert et D. V. Devine, “De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine,” *Vox Sanguinis*, vol. 99, n° 2, p. 112-122, Aoû. 2010.
- [135] K. GRETTE, “Studies on the mechanism of thrombin-catalyzed hemostatic reactions in blood platelets,” *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, vol. 195, p. 1-93, 1962.
- [136] J. G. White, “Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate,” *Blood*, vol. 31, n° 5, p. 604-622, Mai. 1968.
- [137] J. G. White et G. H. Rao, “Influence of a microtubule stabilizing agent on platelet structural physiology,” *The American Journal of Pathology*, vol. 112, n° 2, p. 207-217, Aoû. 1983.
- [138] J. G. White et G. H. Rao, “Effects of a microtubule stabilizing agent on the response of platelets to vincristine,” *Blood*, vol. 60, n° 2, p. 474-483, Aoû. 1982.
- [139] P. Lefebvre, J. G. White, M. D. Krumwiede, et I. Cohen, “Role of actin in platelet function,” *European Journal of Cell Biology*, vol. 62, n° 2, p. 194-204, Déc. 1993.
- [140] S. Ferro-Novick et R. Jahn, “Vesicle fusion from yeast to man,” *Nature*, vol. 370, n° 6486, p. 191-193, Juil. 1994.
- [141] R. Flaumenhaft, “Molecular basis of platelet granule secretion,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 23, n° 7, p. 1152-1160, Juil. 2003.
- [142] D. Fasshauer, R. B. Sutton, A. T. Brunger, et R. Jahn, “Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, n° 26, p. 15781-15786, Déc. 1998.

- [143] R. Jahn et T. C. Südhof, "Membrane fusion and exocytosis," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 68, p. 863-911, 1999.
- [144] G. L. Reed, A. K. Hough, et M. L. Fitzgerald, "Human platelets contain SNARE proteins and a Sec1p homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation: implications for platelet secretion," *Blood*, vol. 93, n° 8, p. 2617-2626, Avr. 1999.
- [145] J. Zimmerberg, S. S. Vogel, et L. V. Chernomordik, "Mechanisms of membrane fusion," *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 22, p. 433-466, 1993.
- [146] D. Jones, C. Morgan, et S. Cockcroft, "Phospholipase D and membrane traffic. Potential roles in regulated exocytosis, membrane delivery and vesicle budding," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1439, n° 2, p. 229-244, Juil. 1999.
- [147] N. Rozenvayn et R. Flaumenhaft, "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates Ca²⁺-induced platelet alpha-granule secretion: evidence for type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase function," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n° 25, p. 22410-22419, Juin. 2001.
- [148] N. Rozenvayn et R. Flaumenhaft, "Protein kinase C mediates translocation of type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase required for platelet alpha-granule secretion," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 10, p. 8126-8134, Mar. 2003.
- [149] P. A. Janmey, W. Xian, et L. A. Flanagan, "Controlling cytoskeleton structure by phosphoinositide-protein interactions: phosphoinositide binding protein domains and effects of lipid packing," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 101, n° 1, p. 93-107, Aoû. 1999.
- [150] M. L. Wagner et L. K. Tamm, "Reconstituted syntaxin1a/SNAP25 interacts with negatively charged lipids as measured by lateral diffusion in planar supported bilayers," *Biophysical Journal*, vol. 81, n° 1, p. 266-275, Juil. 2001.
- [151] T. F. Martin, "PI(4,5)P₂ regulation of surface membrane traffic," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 13, n° 4, p. 493-499, Aoû. 2001.
- [152] P. P. Lemons, D. Chen, et S. W. Whiteheart, "Molecular mechanisms of platelet exocytosis: requirements for alpha-granule release," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 267, n° 3, p. 875-880, Jan. 2000.
- [153] J. Polgár et G. L. Reed, "A critical role for N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) in platelet granule secretion," *Blood*, vol. 94, n° 4, p. 1313-1318, Aoû. 1999.
- [154] D. O. Clary, I. C. Griff, et J. E. Rothman, "SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast," *Cell*, vol. 61, n° 4, p. 709-721, Mai. 1990.
- [155] M. Zerial et H. McBride, "Rab proteins as membrane organizers," *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 2, n° 2, p. 107-117, Fév. 2001.
- [156] J. G. White et C. C. Clawson, "The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system," *The American Journal of Pathology*, vol. 101, n° 2, p. 353-364, Nov. 1980.
- [157] P. E. Stenberg, M. A. Shuman, S. P. Levine, et D. F. Bainton, "Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets," *The Journal of Cell Biology*, vol. 98, n° 2, p. 748-760, Fév. 1984.

- [158] S. Rex et al., "Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 102, n° 1, p. 97-110, Juil. 2009.
- [159] F. Cognasse et al., "Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets," *British Journal of Haematology*, vol. 141, n° 1, p. 84-91, Avr. 2008.
- [160] D. E. Knight et M. C. Scrutton, "Direct evidence for a role for Ca²⁺ in amine storage granule secretion by human platelets," *Thrombosis Research*, vol. 20, n° 4, p. 437-446, Nov. 1980.
- [161] S. H. Chung, J. Polgar, et G. L. Reed, "Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n° 33, p. 25286-25291, Aoû. 2000.
- [162] A. Elzagallaai, S. D. Rosé, et J. M. Trifaró, "Platelet secretion induced by phorbol esters stimulation is mediated through phosphorylation of MARCKS: a MARCKS-derived peptide blocks MARCKS phosphorylation and serotonin release without affecting pleckstrin phosphorylation," *Blood*, vol. 95, n° 3, p. 894-902, Fév. 2000.
- [163] P. Siljander, O. Carpen, et R. Lassila, "Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis," *Blood*, vol. 87, n° 11, p. 4651-4663, Juin. 1996.
- [164] M. Baj-Krzyworzeka et al., "Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells," *Experimental Hematology*, vol. 30, n° 5, p. 450-459, Mai. 2002.
- [165] B. A. Garcia, D. M. Smalley, H. Cho, J. Shabanowitz, K. Ley, et D. F. Hunt, "The platelet microparticle proteome," *Journal of Proteome Research*, vol. 4, n° 5, p. 1516-1521, Oct. 2005.
- [166] D. L. Sprague, B. D. Elzey, S. A. Crist, T. J. Waldschmidt, R. J. Jensen, et T. L. Ratliff, "Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles," *Blood*, vol. 111, n° 10, p. 5028-5036, Mai. 2008.
- [167] M. Z. Ratajczak, "Microvesicles as immune orchestra conductors," *Blood*, vol. 111, n° 10, p. 4832-4833, Mai. 2008.
- [168] T. Rozmyslowicz et al., "Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV," *AIDS (London, England)*, vol. 17, n° 1, p. 33-42, Jan. 2003.
- [169] F. Cognasse, J. M. Payrat, L. Corash, J. C. Osselaer, et O. Garraud, "Platelet components associated with acute transfusion reactions: the role of platelet-derived soluble CD40 ligand," *Blood*, vol. 112, n° 12, p. 4779-4780; author reply 4780-4781, Déc. 2008.
- [170] S. Y. Khan et al., "Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury," *Blood*, vol. 108, n° 7, p. 2455-2462, Oct. 2006.
- [171] J. A. Grass et al., "Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by photochemical treatment with psoralen plus UVA," *Blood*, vol. 91, n° 6, p. 2180-2188, Mar. 1998.
- [172] A. S. Weyrich, S. Lindemann, et G. A. Zimmerman, "The evolving role of platelets in inflammation," *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 1, n° 9, p. 1897-1905, Sep. 2003.

- [173] L. Yang et al., "Contributions of TRAIL mediated megakaryocyte apoptosis to impaired megakaryocyte and platelet production in immune thrombocytopenia," *Blood*, Juil. 2010.
- [174] J. M. Sowa, S. A. Crist, T. L. Ratliff, et B. D. Elzey, "Platelet influence on T- and B-cell responses," *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, vol. 57, n°. 4, p. 235-241, Aoû. 2009.
- [175] R. D. Stout et J. Suttles, "The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses," *Immunology Today*, vol. 17, n°. 10, p. 487-492, Oct. 1996.
- [176] B. Moser, M. Wolf, A. Walz, et P. Loetscher, "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control," *Trends in Immunology*, vol. 25, n°. 2, p. 75-84, Fév. 2004.
- [177] J. P. Ridge, F. Di Rosa, et P. Matzinger, "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell," *Nature*, vol. 393, n°. 6684, p. 474-478, Juin. 1998.
- [178] S. P. Schoenberger, R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa, et C. J. Melief, "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions," *Nature*, vol. 393, n°. 6684, p. 480-483, Juin. 1998.
- [179] B. R. Renshaw et al., "Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 180, n°. 5, p. 1889-1900, Nov. 1994.
- [180] B. D. Elzey et al., "Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments," *Immunity*, vol. 19, n°. 1, p. 9-19, Juil. 2003.
- [181] F. Cognasse et al., "Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins," *Experimental Hematology*, vol. 35, n°. 9, p. 1376-1387, Sep. 2007.
- [182] G. de Gaetano et C. Cerletti, "Platelet adhesion and aggregation and fibrin formation in flowing blood: a historical contribution by Giulio Bizzozero," *Platelets*, vol. 13, n°. 2, p. 85-89, Mar. 2002.
- [183] N. Li, "Platelet-lymphocyte cross-talk," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 83, n°. 5, p. 1069-1078, Mai. 2008.
- [184] P. Lalor et G. B. Nash, "Adhesion of flowing leucocytes to immobilized platelets," *British Journal of Haematology*, vol. 89, n°. 4, p. 725-732, Avr. 1995.
- [185] A. Solpov et al., "Platelets enhance CD4+ lymphocyte adhesion to extracellular matrix under flow conditions: role of platelet aggregation, integrins, and non-integrin receptors," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 95, n°. 5, p. 815-821, Mai. 2006.
- [186] T. G. Diacovo, M. D. Catalina, M. H. Siegelman, et U. H. von Andrian, "Circulating activated platelets reconstitute lymphocyte homing and immunity in L-selectin-deficient mice," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 187, n°. 2, p. 197-204, Jan. 1998.
- [187] U. H. von Andrian et C. M'Rini, "In situ analysis of lymphocyte migration to lymph nodes," *Cell Adhesion and Communication*, vol. 6, n°. 2, p. 85-96, 1998.
- [188] S. C. Pitchford et al., "Platelet P-selectin is required for pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment in a murine model of allergic inflammation," *Blood*, vol. 105, n°. 5, p. 2074-2081, Mar. 2005.
- [189] A. Khandoga, M. Hanschen, J. S. Kessler, et F. Krombach, "CD4+ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and

- platelets,” *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 43, n° 2, p. 306-315, Fév. 2006.
- [190] J. Fleischer et al., “Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 169, n° 2, p. 770-777, Juil. 2002.
- [191] C. Y. Liu, M. Battaglia, S. H. Lee, Q. Sun, R. H. Aster, et G. P. Visentin, “Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+CD25- (nonregulatory) T cells,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 174, n° 5, p. 2680-2686, Mar. 2005.
- [192] H. Matsuda, H. Ushio, G. P. Geba, et P. W. Askenase, “Human platelets can initiate T cell-dependent contact sensitivity through local serotonin release mediated by IgE antibodies,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 158, n° 6, p. 2891-2897, Mar. 1997.
- [193] A. S. Weyrich et al., “Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 97, n° 6, p. 1525-1534, Mar. 1996.
- [194] G. F. Nash, L. F. Turner, M. F. Scully, et A. K. Kakkar, “Platelets and cancer,” *The Lancet Oncology*, vol. 3, n° 7, p. 425-430, Juil. 2002.
- [195] K. V. Honn, D. G. Tang, et J. D. Crissman, “Platelets and cancer metastasis: a causal relationship?,” *Cancer Metastasis Reviews*, vol. 11, n° 3, p. 325-351, Nov. 1992.
- [196] M. Trikha et al., “Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and alphavbeta3 integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis,” *Cancer Research*, vol. 62, n° 10, p. 2824-2833, Mai. 2002.
- [197] J. S. Palumbo et al., “Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells,” *Blood*, vol. 105, n° 1, p. 178-185, Jan. 2005.
- [198] S. Sheikh, R. S. Parhar, R. Bakheet, S. Saleh, K. Collison, et F. Al-Mohanna, “Immobilization of rolling NK cells on platelet-borne P-selectin under flow by proinflammatory stimuli, interleukin-12, and leukotriene B4,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 76, n° 3, p. 603-608, Sep. 2004.
- [199] A. Capron, M. Joseph, J. C. Ameisen, M. Capron, V. Pancré, et C. Auriault, “Platelets as effectors in immune and hypersensitivity reactions,” *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, vol. 82, n° 3, p. 307-312, 1987.
- [200] M. Joseph, C. Auriault, A. Capron, H. Vorng, et P. Viens, “A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes,” *Nature*, vol. 303, n° 5920, p. 810-812, Juin. 1983.
- [201] V. Pancre, M. Joseph, C. Mazingue, J. Wietzerbin, A. Capron, et C. Auriault, “Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines: role of interferon-gamma,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 138, n° 12, p. 4490-4495, Juin. 1987.
- [202] V. Pancré, C. Auriault, M. Joseph, J. Y. Cesbron, J. P. Kusnierz, et A. Capron, “A suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 137, n° 2, p. 585-591, Juil. 1986.
- [203] V. Pancré et al., “Effect of ubiquitin on platelet functions: possible identity with platelet activity suppressive lymphokine (PASL),” *European Journal of Immunology*, vol. 21, n° 11, p. 2735-2741, Nov. 1991.

- [204] N. Todoroki et al., "Enhancement by IL-1 beta and IFN-gamma of platelet activation: adhesion to leukocytes via GMP-140/PADGEM protein (CD62)," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 179, n°. 2, p. 756-761, Sep. 1991.
- [205] L. Oleksowicz, P. A. Paciucci, D. Zuckerman, A. Colorito, J. H. Rand, et J. F. Holland, "Alterations of platelet function induced by interleukin-2," *Journal of Immunotherapy: Official Journal of the Society for Biological Therapy*, vol. 10, n°. 5, p. 363-370, Oct. 1991.
- [206] T. M. McIntyre, S. M. Prescott, A. S. Weyrich, et G. A. Zimmerman, "Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions," *Current Opinion in Hematology*, vol. 10, n°. 2, p. 150-158, Mar. 2003.
- [207] T. S. Mahoney, A. S. Weyrich, D. A. Dixon, T. McIntyre, S. M. Prescott, et G. A. Zimmerman, "Cell adhesion regulates gene expression at translational checkpoints in human myeloid leukocytes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, n°. 18, p. 10284-10289, Aoû. 2001.
- [208] T. Weissmüller et al., "PMNs facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis via epithelial cell-expressed ecto-NTPDases," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, n°. 11, p. 3682-3692, Nov. 2008.
- [209] G. Li, Y. Kim, C. Mantel, et H. E. Broxmeyer, "P-selectin enhances generation of CD14+CD16+ dendritic-like cells and inhibits macrophage maturation from human peripheral blood monocytes," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 171, n°. 2, p. 669-677, Juil. 2003.
- [210] H. Hamzeh-Cognasse et al., "Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation," *BMC Immunology*, vol. 9, p. 54, 2008.
- [211] A. C. Issekutz, M. Ripley, et J. R. Jackson, "Role of neutrophils in the deposition of platelets during acute inflammation," *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, vol. 49, n°. 6, p. 716-724, Déc. 1983.
- [212] G. de Gaetano, C. Cerletti, et V. Evangelista, "Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction," *Haemostasis*, vol. 29, n°. 1, p. 41-49, Sep. 1999.
- [213] E. Brandt, A. Ludwig, F. Petersen, et H. D. Flad, "Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games," *Immunological Reviews*, vol. 177, p. 204-216, Oct. 2000.
- [214] A. C. Ma et P. Kubes, "Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis," *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 6, n°. 3, p. 415-420, Mar. 2008.
- [215] M. R. Yeaman, "Bacterial-platelet interactions: virulence meets host defense," *Future Microbiology*, vol. 5, n°. 3, p. 471-506, Mar. 2010.
- [216] S. W. Kerrigan et D. Cox, "Platelet-bacterial interactions," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 67, n°. 4, p. 513-523, Fév. 2010.
- [217] J. R. Fitzgerald, T. J. Foster, et D. Cox, "The interaction of bacterial pathogens with platelets," *Nature Reviews. Microbiology*, vol. 4, n°. 6, p. 445-457, Juin. 2006.
- [218] M. R. Yeaman, "Platelets in defense against bacterial pathogens," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 67, n°. 4, p. 525-544, Fév. 2010.

- [219] A. S. Bayer, M. D. Ramos, B. E. Menzies, M. R. Yeaman, A. J. Shen, et A. L. Cheung, "Hyperproduction of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus* results in paradoxically reduced virulence in experimental endocarditis: a host defense role for platelet microbicidal proteins," *Infection and Immunity*, vol. 65, n°. 11, p. 4652-4660, Nov. 1997.
- [220] C. C. Clawson et J. G. White, "Platelet interaction with bacteria. I. Reaction phases and effects of inhibitors," *The American Journal of Pathology*, vol. 65, n°. 2, p. 367-380, Nov. 1971.
- [221] M. R. Yeaman et al., "Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1768, n°. 3, p. 609-619, Mar. 2007.
- [222] D. DANON, Z. JERUSHALMY, et A. DE VRIES, "Incorporation of influenza virus in human blood platelets in vitro. Electron microscopical observation," *Virology*, vol. 9, p. 719-722, Déc. 1959.
- [223] Y. H. Kouri, W. Borkowsky, M. Nardi, S. Karpatkin, et R. S. Basch, "Human megakaryocytes have a CD4 molecule capable of binding human immunodeficiency virus-1," *Blood*, vol. 81, n°. 10, p. 2664-2670, Mai. 1993.
- [224] J. G. White, "Platelets are coverocytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system," *Platelets*, vol. 16, n°. 2, p. 121-131, Mar. 2005.
- [225] C. Flaujac, S. Boukour, et E. Cramer-Bordé, "Platelets and viruses: an ambivalent relationship," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 67, n°. 4, p. 545-556, Fév. 2010.
- [226] D. Nunez, C. Charriaut-Marlangue, M. Barel, J. Benveniste, et R. Frade, "Activation of human platelets through gp140, the C3d/EBV receptor (CR2)," *European Journal of Immunology*, vol. 17, n°. 4, p. 515-520, Avr. 1987.
- [227] A. Zahn, N. Jennings, W. H. Ouwehand, et J. Allain, "Hepatitis C virus interacts with human platelet glycoprotein VI," *The Journal of General Virology*, vol. 87, n°. 8, p. 2243-2251, Aoû. 2006.
- [228] C. Rogier, P. Gerardin, et P. Imbert, "Thrombocytopenia is predictive of lethality in severe childhood falciparum malaria," *Archives of Disease in Childhood*, vol. 89, n°. 8, p. 795-796, Aoû. 2004.
- [229] D. Cox et S. McConkey, "The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 67, n°. 4, p. 557-568, Fév. 2010.
- [230] B. J. McMorran et al., "Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 323, n°. 5915, p. 797-800, Fév. 2009.
- [231] K. J. Clemetson, "Platelets and pathogens," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 67, n°. 4, p. 495-498, Fév. 2010.
- [232] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, et C. A. Janeway, "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity," *Nature*, vol. 388, n°. 6640, p. 394-397, Juil. 1997.
- [233] C. A. Janeway et R. Medzhitov, "Innate immune recognition," *Annual Review of Immunology*, vol. 20, p. 197-216, 2002.
- [234] C. A. Janeway, "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology," *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 54, p. 1-13, 1989.

- [235] B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, et J. A. Hoffmann, "The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults," *Cell*, vol. 86, n° 6, p. 973-983, Sep. 1996.
- [236] T. Kawai et S. Akira, "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors," *Nature Immunology*, vol. 11, n° 5, p. 373-384, Mai. 2010.
- [237] N. A. Balenga et N. A. Balenga, "Human TLR11 gene is repressed due to its probable interaction with profilin expressed in human," *Medical Hypotheses*, vol. 68, n° 2, p. 456, 2007.
- [238] F. N. Lauw, D. R. Caffrey, et D. T. Golenbock, "Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin," *Trends in Immunology*, vol. 26, n° 10, p. 509-511, Oct. 2005.
- [239] M. S. Jin et J. Lee, "Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes," *Immunity*, vol. 29, n° 2, p. 182-191, Aoû. 2008.
- [240] S. Akira, S. Uematsu, et O. Takeuchi, "Pathogen recognition and innate immunity," *Cell*, vol. 124, n° 4, p. 783-801, Fév. 2006.
- [241] E. A. Kurt-Jones et al., "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus," *Nature Immunology*, vol. 1, n° 5, p. 398-401, Nov. 2000.
- [242] K. Kawasaki, S. Akashi, R. Shimazu, T. Yoshida, K. Miyake, et M. Nishijima, "Mouse toll-like receptor 4/MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n° 4, p. 2251-2254, Jan. 2000.
- [243] M. S. Jin et al., "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide," *Cell*, vol. 130, n° 6, p. 1071-1082, Sep. 2007.
- [244] J. Y. Kang et al., "Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer," *Immunity*, vol. 31, n° 6, p. 873-884, Déc. 2009.
- [245] K. Hoebe et al., "CD36 is a sensor of diacylglycerides," *Nature*, vol. 433, n° 7025, p. 523-527, Fév. 2005.
- [246] S. B. Mizel, A. P. West, et R. R. Hantgan, "Identification of a sequence in human toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 26, p. 23624-23629, Juin. 2003.
- [247] S. Uematsu et S. Akira, "Immune responses of TLR5(+) lamina propria dendritic cells in enterobacterial infection," *Journal of Gastroenterology*, vol. 44, n° 8, p. 803-811, 2009.
- [248] J. Choe, M. S. Kelker, et I. A. Wilson, "Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 309, n° 5734, p. 581-585, Juil. 2005.
- [249] J. K. Bell, J. Askins, P. R. Hall, D. R. Davies, et D. M. Segal, "The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, n° 23, p. 8792-8797, Juin. 2006.
- [250] M. Cristina Gauzzi, M. Del Cornò, et S. Gessani, "Dissecting TLR3 signalling in dendritic cells," *Immunobiology*, vol. 215, n° 9, p. 713-723, Oct. 2010.
- [251] L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, et R. A. Flavell, "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3," *Nature*, vol. 413, n° 6857, p. 732-738, Oct. 2001.
- [252] T. Kawai et S. Akira, "Innate immune recognition of viral infection," *Nature Immunology*,

- vol. 7, n° 2, p. 131-137, Fév. 2006.
- [253] R. L. Miller, T. Meng, et M. A. Tomai, "The antiviral activity of Toll-like receptor 7 and 7/8 agonists," *Drug News & Perspectives*, vol. 21, n° 2, p. 69-87, Mar. 2008.
- [254] V. Hornung et al., "Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7," *Nature Medicine*, vol. 11, n° 3, p. 263-270, Mar. 2005.
- [255] S. L. Peng, "Signaling in B cells via Toll-like receptors," *Current Opinion in Immunology*, vol. 17, n° 3, p. 230-236, Juin. 2005.
- [256] Y. Kim, M. M. Brinkmann, M. Paquet, et H. L. Ploegh, "UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes," *Nature*, vol. 452, n° 7184, p. 234-238, Mar. 2008.
- [257] A. L. Blasius et B. Beutler, "Intracellular toll-like receptors," *Immunity*, vol. 32, n° 3, p. 305-315, Mar. 2010.
- [258] K. Takahashi et al., "A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, n° 12, p. 2963-2976, Nov. 2007.
- [259] S. E. Ewald et al., "The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor," *Nature*, vol. 456, n° 7222, p. 658-662, Déc. 2008.
- [260] A. N. R. Weber, M. C. Moncrieffe, M. Gangloff, J. Imler, et N. J. Gay, "Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the Drosophila toll pathway," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n° 24, p. 22793-22799, Juin. 2005.
- [261] X. Hu, Y. Yagi, T. Tanji, S. Zhou, et Y. T. Ip, "Multimerization and interaction of Toll and Spätzle in Drosophila," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, n° 25, p. 9369-9374, Juin. 2004.
- [262] A. Dunne, M. Ejdeback, P. L. Ludidi, L. A. J. O'Neill, et N. J. Gay, "Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 42, p. 41443-41451, Oct. 2003.
- [263] J. K. Gautam, Ashish, L. D. Comeau, J. K. Krueger, et M. F. Smith, "Structural and functional evidence for the role of the TLR2 DD loop in TLR1/TLR2 heterodimerization and signaling," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, n° 40, p. 30132-30142, Oct. 2006.
- [264] K. A. Lord, B. Hoffman-Liebermann, et D. A. Liebermann, "Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6," *Oncogene*, vol. 5, n° 7, p. 1095-1097, Juil. 1990.
- [265] M. Muzio, J. Ni, P. Feng, et V. M. Dixit, "IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 278, n° 5343, p. 1612-1615, Nov. 1997.
- [266] T. Kawai, O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, et S. Akira, "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin," *Immunity*, vol. 11, n° 1, p. 115-122, Juil. 1999.
- [267] T. Kawai et al., "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of

- lipopolysaccharide-inducible genes,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 167, n°. 10, p. 5887-5894, Nov. 2001.
- [268] M. Yamamoto et al., “Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4,” *Nature*, vol. 420, n°. 6913, p. 324-329, Nov. 2002.
- [269] Y. Lu, W. Yeh, et P. S. Ohashi, “LPS/TLR4 signal transduction pathway,” *Cytokine*, vol. 42, n°. 2, p. 145-151, Mai. 2008.
- [270] M. Yamamoto et al., “TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway,” *Nature Immunology*, vol. 4, n°. 11, p. 1144-1150, Nov. 2003.
- [271] M. Yamamoto et al., “Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 301, n°. 5633, p. 640-643, Aoû. 2003.
- [272] D. C. Rowe et al., “The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, n°. 16, p. 6299-6304, Avr. 2006.
- [273] N. Suzuki et al., “Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4,” *Nature*, vol. 416, n°. 6882, p. 750-756, Avr. 2002.
- [274] E. Lye, C. Mirtsos, N. Suzuki, S. Suzuki, et W. Yeh, “The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n°. 39, p. 40653-40658, Sep. 2004.
- [275] T. Kawagoe et al., “Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2,” *Nature Immunology*, vol. 9, n°. 6, p. 684-691, Juin. 2008.
- [276] J. Gohda, T. Matsumura, et J. Inoue, “Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 173, n°. 5, p. 2913-2917, Sep. 2004.
- [277] M. Yamamoto et al., “Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta,” *Nature*, vol. 430, n°. 6996, p. 218-222, Juil. 2004.
- [278] A. Takaoka et al., “Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors,” *Nature*, vol. 434, n°. 7030, p. 243-249, Mar. 2005.
- [279] M. Yamamoto et al., “Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 169, n°. 12, p. 6668-6672, Déc. 2002.
- [280] Y. L. Pobeziinskaya et al., “The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors,” *Nature Immunology*, vol. 9, n°. 9, p. 1047-1054, Sep. 2008.
- [281] M. Chang, W. Jin, et S. Sun, “Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production,” *Nature Immunology*, vol. 10, n°. 10, p. 1089-1095, Oct. 2009.
- [282] G. Oganessian et al., “Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response,” *Nature*, vol. 439, n°. 7073, p. 208-211, Jan. 2006.
- [283] T. Kawagoe et al., “TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis,” *Nature Immunology*, vol. 10, n°. 9, p. 965-972, Sep. 2009.

- [284] E. M. Palsson-McDermott et al., "TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway," *Nature Immunology*, vol. 10, n° 6, p. 579-586, Juin. 2009.
- [285] R. Allam et H. Anders, "The role of innate immunity in autoimmune tissue injury," *Current Opinion in Rheumatology*, vol. 20, n° 5, p. 538-544, Sep. 2008.
- [286] H. Yang et K. J. Tracey, "Targeting HMGB1 in inflammation," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1799, n° 1, p. 149-156, Fév. 2010.
- [287] H. Yanai et al., "HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses," *Nature*, vol. 462, n° 7269, p. 99-103, Nov. 2009.
- [288] M. Tsan et B. Gao, "Heat shock proteins and immune system," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 85, n° 6, p. 905-910, Juin. 2009.
- [289] F. Martinon, A. Mayor, et J. Tschopp, "The inflammasomes: guardians of the body," *Annual Review of Immunology*, vol. 27, p. 229-265, 2009.
- [290] M. Yoneyama et T. Fujita, "RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors," *Immunological Reviews*, vol. 227, n° 1, p. 54-65, Jan. 2009.
- [291] K. J. Ishii et al., "A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA," *Nature Immunology*, vol. 7, n° 1, p. 40-48, Jan. 2006.
- [292] A. Takaoka et al., "DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response," *Nature*, vol. 448, n° 7152, p. 501-505, Juil. 2007.
- [293] N. J. Gay et M. Gangloff, "Structure and function of Toll receptors and their ligands," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 76, p. 141-165, 2007.
- [294] A. O. Aliprantis, R. B. Yang, D. S. Weiss, P. Godowski, et A. Zychlinsky, "The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2," *The EMBO Journal*, vol. 19, n° 13, p. 3325-3336, Juil. 2000.
- [295] W. J. Kaiser et M. K. Offermann, "Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 174, n° 8, p. 4942-4952, Avr. 2005.
- [296] K. R. Bortoluci et R. Medzhitov, "Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 67, n° 10, p. 1643-1651, Mai. 2010.
- [297] B. S. Park, D. H. Song, H. M. Kim, B. Choi, H. Lee, et J. Lee, "The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex," *Nature*, vol. 458, n° 7242, p. 1191-1195, Avr. 2009.
- [298] J. C. Kagan, T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, et R. Medzhitov, "TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta," *Nature Immunology*, vol. 9, n° 4, p. 361-368, Avr. 2008.
- [299] R. J. Botelho et al., "Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis," *The Journal of Cell Biology*, vol. 151, n° 7, p. 1353-1368, Déc. 2000.
- [300] R. Núñez Miguel et al., "A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins," *PLoS One*, vol. 2, n° 8, p. e788, 2007.

- [301] Z. Jiang et al., "CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling," *Nature Immunology*, vol. 6, n° 6, p. 565-570, Juin. 2005.
- [302] C. Galanos et al., "Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities," *European Journal of Biochemistry / FEBS*, vol. 148, n° 1, p. 1-5, Avr. 1985.
- [303] S. D. Wright, "CD14 and innate recognition of bacteria," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 155, n° 1, p. 6-8, Juil. 1995.
- [304] J. Kim et al., "Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n° 12, p. 11347-11351, Mar. 2005.
- [305] A. Anas, T. van der Poll, et A. F. de Vos, "Role of CD14 in lung inflammation and infection," *Critical Care (London, England)*, vol. 14, n° 2, p. 209, 2010.
- [306] R. Shiraki et al., "Expression of Toll-like receptors on human platelets," *Thrombosis Research*, vol. 113, n° 6, p. 379-385, 2004.
- [307] F. Cognasse, H. Hamzeh, P. Chavarin, S. Acquart, C. Genin, et O. Garraud, "Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets," *Immunology and Cell Biology*, vol. 83, n° 2, p. 196-198, Avr. 2005.
- [308] G. Andonegui, S. M. Kerfoot, K. McNagny, K. V. J. Ebbert, K. D. Patel, et P. Kubes, "Platelets express functional Toll-like receptor-4," *Blood*, vol. 106, n° 7, p. 2417-2423, Oct. 2005.
- [309] R. Aslam et al., "Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo," *Blood*, vol. 107, n° 2, p. 637-641, Jan. 2006.
- [310] J. R. Ward et al., "Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 94, n° 4, p. 831-838, Oct. 2005.
- [311] T. Tremblay, E. Aubin, R. Lemieux, et R. Bazin, "Picogram doses of lipopolysaccharide exacerbate antibody-mediated thrombocytopenia and reduce the therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin in mice," *British Journal of Haematology*, vol. 139, n° 2, p. 297-302, Oct. 2007.
- [312] J. W. Semple, R. Aslam, M. Kim, E. R. Speck, et J. Freedman, "Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets," *Blood*, vol. 109, n° 11, p. 4803-4805, Juin. 2007.
- [313] M. Jayachandran, G. J. Brunn, K. Karnicki, R. S. Miller, W. G. Owen, et V. M. Miller, "In vivo effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk," *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, vol. 102, n° 1, p. 429-433, Jan. 2007.
- [314] A. Ståhl et al., "Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome," *Blood*, vol. 108, n° 1, p. 167-176, Juil. 2006.
- [315] J. K. Damås et al., "Increased levels of soluble CD40L in African tick bite fever: possible involvement of TLRs in the pathogenic interaction between *Rickettsia africae*, endothelial cells, and platelets," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 177, n° 4, p. 2699-2706, Aoû. 2006.

- [316] S. P. Jackson, C. L. Yap, et K. E. Anderson, "Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of platelet function," *Biochemical Society Transactions*, vol. 32, n°. 2, p. 387-392, Avr. 2004.
- [317] P. Blair et al., "Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase," *Circulation Research*, vol. 104, n°. 3, p. 346-354, Fév. 2009.
- [318] Y. Kanno et H. Matsuno, "The possibility of novel antiplatelet peptides: the physiological effects of low molecular weight HSPs on platelets," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 12, n°. 7, p. 887-892, 2006.
- [319] F. Cognasse, S. Lafarge, P. Chavarin, S. Acquart, et O. Garraud, "Lipopolysaccharide induces sCD40L release through human platelets TLR4, but not TLR2 and TLR9," *Intensive Care Medicine*, vol. 33, n°. 2, p. 382-384, Fév. 2007.
- [320] M. Shibazaki, M. Nakamura, et Y. Endo, "Biphasic, organ-specific, and strain-specific accumulation of platelets induced in mice by a lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and its possible involvement in shock," *Infection and Immunity*, vol. 64, n°. 12, p. 5290-5294, Déc. 1996.
- [321] A. Yaguchi, F. L. M. Lobo, J. Vincent, et O. Pradier, "Platelet function in sepsis," *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 2, n°. 12, p. 2096-2102, Déc. 2004.
- [322] G. Zhang et al., "Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 182, n°. 12, p. 7997-8004, Juin. 2009.
- [323] P. N. Shashkin, G. T. Brown, A. Ghosh, G. K. Marathe, et T. M. McIntyre, "Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 181, n°. 5, p. 3495-3502, Sep. 2008.
- [324] E. Malaver et al., "NF-kappaB inhibitors impair platelet activation responses," *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 7, n°. 8, p. 1333-1343, Aoû. 2009.
- [325] L. M. Beaulieu et J. E. Freedman, "NFkappaB regulation of platelet function: no nucleus, no genes, no problem?," *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, vol. 7, n°. 8, p. 1329-1332, Aoû. 2009.
- [326] V. M. Miller, M. Jayachandran, K. Hashimoto, J. A. Heit, et W. G. Owen, "Estrogen, inflammation, and platelet phenotype," *Gender Medicine: Official Journal of the Partnership for Gender-Specific Medicine at Columbia University*, vol. 5, p. S91-S102, 2008.
- [327] S. Ghosh et M. S. Hayden, "New regulators of NF-kappaB in inflammation," *Nature Reviews. Immunology*, vol. 8, n°. 11, p. 837-848, Nov. 2008.
- [328] J. S. Rao et S. I. Rapoport, "Mood-stabilizers target the brain arachidonic acid cascade," *Current Molecular Pharmacology*, vol. 2, n°. 2, p. 207-214, Juin. 2009.
- [329] F. Cognasse et al., "Altered release of regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein from human, normal platelets: contribution of distinct HIV-1MN gp41 peptides," *AIDS (London, England)*, vol. 23, n°. 15, p. 2057-2059, Sep. 2009.
- [330] H. Terada, M. Baldini, S. Ebbe, et M. A. Madoff, "Interaction of influenza virus with blood platelets," *Blood*, vol. 28, n°. 2, p. 213-228, Aoû. 1966.
- [331] T. Bik, I. Sarov, et A. Livne, "Interaction between vaccinia virus and human blood

- platelets,” *Blood*, vol. 59, n°. 3, p. 482-487, Mar. 1982.
- [332] F. R. Agbanyo et S. Wasi, “Human cytomegalovirus interaction with platelets and adhesive glycoproteins: significance in viral pathogenesis,” *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 170, n°. 5, p. 1120-1127, Nov. 1994.
- [333] C. Chaipan et al., “DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets,” *Journal of Virology*, vol. 80, n°. 18, p. 8951-8960, Sep. 2006.
- [334] A. Z. Decrion, I. Dichamp, A. Varin, et G. Herbein, “HIV and inflammation,” *Current HIV Research*, vol. 3, n°. 3, p. 243-259, Juil. 2005.
- [335] P. A. Holme, F. Müller, N. O. Solum, F. Brosstad, S. S. Frøland, et P. Aukrust, “Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection,” *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 12, n°. 1, p. 79-89, Jan. 1998.
- [336] J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, O. Garraud, et F. Cognasse, “Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways,” *British Journal of Haematology*, Juil. 2010.
- [337] S. L. Spinelli et al., “Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor-kappaB,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, n°. 3, p. 591-598, Mar. 2010.
- [338] K. Gousset et al., “Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 190, n°. 1, p. 117-128, Jan. 2002.
- [339] P. Rozman, “Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation,” *Transplant Immunology*, vol. 10, n°. 2, p. 165-181, Aoû. 2002.
- [340] C. R. Welbourn et Y. Young, “Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators,” *The British Journal of Surgery*, vol. 79, n°. 10, p. 998-1003, Oct. 1992.
- [341] M. Gawaz, T. Dickfeld, C. Bogner, S. Fateh-Moghadam, et F. J. Neumann, “Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome,” *Intensive Care Medicine*, vol. 23, n°. 4, p. 379-385, Avr. 1997.
- [342] S. R. Clark et al., “Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood,” *Nature Medicine*, vol. 13, n°. 4, p. 463-469, Avr. 2007.
- [343] V. Brinkmann et al., “Neutrophil extracellular traps kill bacteria,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, n°. 5663, p. 1532-1535, Mar. 2004.
- [344] M. J. Peters, G. Dixon, K. T. Kotowicz, D. J. Hatch, R. S. Heyderman, et N. J. Klein, “Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing,” *British Journal of Haematology*, vol. 106, n°. 2, p. 391-399, Aoû. 1999.
- [345] O. Garraud, J. Berthet, H. Hamzeh-Cognasse, et F. Cognasse, “Pathogen sensing, subsequent signalling, and signalosome in human platelets,” *Thrombosis Research*, Nov. 2010.

Abstract

Blood platelets are anucleated cells which play a major role on primary hemostasis and well demonstrated other functions in inflammation. Platelets store and secrete a great variety of soluble factors, with immunomodulatory functions. They also contain transcription factors such as NF κ B that exert non-genomic activities.

Among numerous receptors expressed at the surface of platelets, they display Toll-Like Receptors (TLR) that are key molecules for the interaction between innate and adaptive immunity. Platelets can be activated in response to infectious stimulation, such as with a bacterial gram-negative Lipopolysaccharide (LPS) - the natural ligand of the TLR4, or peptides from the gp41, part of the HIV envelope. Moreover, stimulation with hemostatic (i.e. thrombin) or infectious (i.e. LPS) agonists results in the differential secretion of panels of immunomodulatory products, that seems to be finely regulated. To further understand this regulatory process, we have studied the presence in the platelet cytosol of the majority of eukaryotic TLR4 pathways proteins. The engagement of the platelet TLR4 with two biochemically distinct LPS (smooth vs. rough) leads to a differential release of immunomodulatory products in platelet supernatants; those supernatants can then differently activate target cells such as peripheral blood mononuclear cells.

These results demonstrate that the inflammatory response of human platelets is regulated by the nature of the stimulus, showing new evidence on the sentry role of these cells. Thus, my work is part of a novel study of the inflammatory function of blood platelets and the role of these cells as immune cells, essentially in the innate and inflammatory branch.

Les plaquettes sanguines sont des cellules anucléées qui jouent un rôle majeur dans l'hémostase primaire et ont aussi un rôle dans l'inflammation, aujourd'hui bien démontré. Les plaquettes contiennent et sécrètent une grande variété de facteurs solubles, dont des molécules immunomodulatrices, et elles contiennent plusieurs facteurs de transcription exerçant des activités non génomiques, notamment le NFκB.

Parmi les nombreux récepteurs qu'elles expriment à leur surface, les plaquettes expriment les « Toll-Like Receptor » (TLR), récepteurs clés de l'interaction entre l'immunité innée et adaptative. En réponse à un stimulus infectieux, comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram-négative, ligand naturel du TLR4, ou des peptides issus d'une partie de la protéine d'enveloppe du VIH (gp41), les plaquettes vont s'activer de manière différentielle. L'activation plaquettaire est variable en fonction de leur activation par un stimulus hémostatique (exemple : la thrombine) vs. infectieux (exemple : le LPS) ; le panel de cytokines/chimiokines libéré dans le surnageant plaquettaire semble en fait finement régulé. Afin d'approfondir l'étude de cette régulation, nous avons démontré, dans un premier temps, la présence intra-plaquettaire de la majorité des protéines composant les voies de signalisation du TLR4 eucaryote. Nous avons ensuite montré que ces voies pouvaient être modulées. L'engagement du TLR4 plaquettaire par deux types biochimiques de LPS (smooth vs. rough) entraîne un relargage différentiel des facteurs solubles immunomodulateurs dans le surnageant de culture ; ce surnageant génère une activation différentielle des cellules cibles, comme les cellules mononucléées du sang circulant.

Ces travaux montrent que la réponse inflammatoire plaquettaire est régulée en fonction du stimulus, permettant d'argumenter sur le rôle présumé de sentinelle des plaquettes sanguines humaines. Ainsi, mes travaux s'inscrivent dans la ré-exploration de la fonction inflammatoire des plaquettes sanguines et l'étude du rôle des plaquettes comme cellules de l'immunité innée à composante inflammatoire.

Blood platelets are anucleated cells which play a major role on primary hemostasis and well demonstrated other functions in inflammation. Platelets store and secrete a great variety of soluble factors, with immunomodulatory functions. They also contain transcription factors such as NFκB that exert non-genomic activities.

Among numerous receptors expressed at the surface of platelets, they display Toll-Like Receptors (TLR) that are key molecules for the interaction between innate and adaptive immunity. Platelets can be activated in response to infectious stimulation, such as with a bacterial gram-negative Lipopolysaccharide (LPS) - the natural ligand of the TLR4, or peptides from the gp41, part of the HIV envelope. Moreover, stimulation with hemostatic (i.e. thrombine) or infectious (i.e. LPS) agonists results in the differential secretion of panels of immunomodulatory products, that seems to be finely regulated. To further understand this regulatory process, we have studied the presence in the platelet cytosol of the majority of eukaryotic TLR4 pathways proteins. The engagement of the platelet TLR4 with two biochemically distinct LPS (smooth vs. rough) leads to a differential release of immunomodulatory products in platelet supernatants; those supernatants can then differently activate target cells such as peripheral blood mononuclear cells.

These results demonstrate that the inflammatory response of human platelets is regulated by the nature of the stimulus, showing new evidence on the sentry role of these cells. Thus, my work is part of a novel study of the inflammatory function of blood platelets and the role of these cells as immune cells, essentially in the innate and inflammatory branch.